

Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación sobre la coloración de los huevos de aves de colección, mediante espectroscopía de reflectancia uv-vis.

Liliana Gutiérrez Niño

Trabajo de Grado presentado para Optar el título de Bióloga

Tutor

Rafael Cabanzo Hernandez

MSc. Física

Codirector

José Gregorio Moreno Patiño

MSc. Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias Básicas

Escuela de Biología

2018

Agradecimientos

A Dios infinitamente por brindarme su espíritu, fortalecer mi corazón e iluminar mi camino.

A mi familia por estar presentes en las distintas etapas de mi vida, por su compañía y amor.

A mi director el profesor Rafael Cabanzo Hernández por estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos, por todas sus enseñanzas sobre la espectroscopía y la vida misma. Infinitas gracias por tanta dedicación y tiempo.

Al mi codirector el profesor José Gregorio Moreno por toda su iniciativa en hacer de la biología un área interdisciplinaria, por todos y cada uno de sus aportes para el desarrollo de mi pasantía. Gracias por todo su tiempo.

A todos los profesores y técnicos de la carrera que me brindaron herramientas necesarias para poder realizar de manera satisfactoria esta pasantía.

Al Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular (LEAM) por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en sus instalaciones y por tan grata acogida.

Al Instituto de Investigación de Recursos biológicos Alexander Von Humboldt por permitirnos emplear muestras de su colección oológica, por sus enseñanzas y tan amable acogida.

Finalmente, deseo expresar mi sincera gratitud a todas aquellas personas de la carrera, del LEAM y aquellas que hacen parte de mi día a día, que con su presencia permitieron que esta práctica fuera muy provechosa y de mi completo agrado.

Tabla de contenido

Introducción	15
1. Objetivos	17
1.1 Objetivo general.....	17
1.2 Objetivos específicos	17
2. Competencias de la pasantía de investigación	18
3. Materiales y métodos	19
3.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos.....	20
3.1.1 Diseño del sistema de posicionamiento de la muestra.....	20
3.1.2 Efecto del ángulo de iluminación y distancia óptima de ubicación de la fibra óptica.	21
3.2 Fase II: Evaluación del efecto de preparación de huevos para su preservación en las colecciones de referencia	22
3.2.1 Selección de muestras, limpieza y preparación.....	22
3.2.2 Espectrofotometría de Reflectancia	24
3.2.3 Análisis de la métrica del color.....	26
3.2.4 Análisis morfológico y composicional de las muestras	26
3.3 Fase III: Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección	28
3.3.1 Selección de muestras	28
3.3.2 Espectrofotometría de Reflectancia	29
3.3.3 Análisis de la métrica del color.....	29
4. Resultados	29
4.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos.....	30
4.1.1 Sistema de posicionamiento de la muestra.....	30
4.1.2 Efecto del ángulo de iluminación y distancia óptima de ubicación de la fibra óptica	31
4.2 Fase II: Evaluación del efecto de preparación de huevos para su preservación en las colecciones de referencia	32

4.2.1 Reflectancia UV-VIS de huevos de criadero	32
4.2.2 Micrografías de fragmentos de cáscaras de huevo	38
4.3 Fase III: Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección	40
5. Discusión.....	43
5.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos.....	43
5.2 Variaciones asociadas a los espectros en los tres diferentes puntos del huevo (pm, Ecu, PM)	43
5.3 Efecto de la limpieza y vaciado de los huevos	45
5.4 Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección	46
6. Conclusiones	47
7. Recomendaciones.....	48
Referencias bibliográficas.....	49
Apéndices.....	53

Lista de tablas

	Página
Tabla 3.1 Parámetros instrumentales para la adquisición de espectros de reflectancia.....	25
Tabla 3.2 Parámetros utilizados para la adquisición de imágenes por MEB.....	27
Tabla 4.1 Promedios y CoV de los descriptores de coloración para las 5 muestra, sucias, limpias y preparadas.	37

Lista de figuras

	Página
Figura 3.1 Diagrama de flujo del desarrollo de la metodología del estudio.	19
Figura 3.2 Porta-fibra irradiar con diferente ángulo de incidencia: (A) y (B) 90 ⁰ , (C) 45°	22
Figura 3.3 (a) Localidades de colecta de los huevos silvestres en el departamento de Santander, Colombia. (b) Nidadas de las especies silvestres utilizadas: <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> (1b) y <i>Gallus gallus domesticus</i> (2b-5b).....	23
Figura 3.4 Procedimiento para la preparación del huevo limpio (orificio, extracción del contenido del huevo y limpieza).	24
Figura 3.5 Imágenes representativas del huevo preparado, para cada una de las nidadas. <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> (1a) y <i>Gallus gallus domesticus</i> (2a-5a).....	24
Figura 3.6 (a) Localidades de colecta de los huevos de <i>Ploceus</i> , en su mayoría de Kolwezi Ht. Katanga, el Congo. (b) Nidadas representativas de cada especie estudiada (<i>P. cucullatus cucullatus</i> (1b), <i>P. cucullatus bohndorffi</i> (2b), <i>P. cucullatus collaris</i> (3b), <i>P. cucullatus</i> (4b) y <i>Zonotrichia capensis</i> (5b).....	29
Figura 4.1 (a) Caja-rectangular oscura con cortina removible. (b) montaje completo destacando el soporte metálico y cierre ajustable (c) parte interna del compartimiento y (d) porta fibra-muestra.	30
Figura 4.2 Espectros de reflectancia de huevo de <i>Gallus gallus domesticus</i> , adquiridos cuando la muestra se irradia a 90 ⁰ y a 45 ⁰	31
Figura 4.3 Espectros de reflexión de huevos Blancos de <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> . (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.	34
Figura 4.4 Espectros de reflexión de huevos Blanco inmaculado de <i>Gallus gallus domesticus</i> . (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.....	34
Figura 4.5 Espectros de reflexión de huevos Crema claro de <i>Gallus gallus domesticus</i> . (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.	35
Figura 4.6 Espectros de reflexión de huevos Marrón de <i>Gallus gallus domesticus</i> . (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.	35

Figura 4.7 Espectros de reflexión de huevos Verdes de <i>Gallus gallus domesticus</i> . (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.	36
Figura 4.8 Micrografías SEM de la cáscara de <i>Anas platyrhynchos domesticus</i> (Huevo Blanco). a) 500x, b) 1000x, c) 500x	38
Figura 4.9 Micrografías SEM de cáscara de huevo de <i>Gallus gallus domesticus</i> (Huevo Blanco). a) 500x, b) 1000x, c) 500x	38
Figura 4.10 Micrografías SEM de cáscara de huevo de <i>Gallus gallus domesticus</i> (Huevo Crema). a) 500x, b) 1000x, c) 500x.....	39
Figura 4.11 Micrografías SEM de cáscara de huevo de <i>Gallus gallus domesticus</i> (Huevo Marron). a) 500x, b) 1000x, c) 500x.....	39
Figura 4.12 Micrografías SEM de cáscara de huevo de <i>Gallus gallus domesticus</i> (Huevo verde). a) 500x, b) 1000x, c) 500.....	39
Figura 4.13 Diagrama de dispersión de los diferentes descriptores de coloración las nidadas del género <i>Ploceus cucullatus cucullatus</i> , correspondientes a una distribución temporal de 1 año.....	40
Figura 4.14 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración AV-Croma para cada año de colecta de los huevos del género <i>Zonotrichia capensis</i>	41
Figura 4.15 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración UV Croma para cada año de colecta de los huevos del género <i>Zonotrichia capensis</i>	41
Figura 4.16 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración R Croma para cada año de colecta de los huevos del género <i>Zonotrichia capensis</i>	42
Figura 4.17 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración Brillo para cada año de colecta de los huevos del género <i>Zonotrichia capensis</i>	42
Figura 5.1 interacción de la luz en dos superficies diferentes: (a) en un espejo convexo y (en un espejo plano.	44

Lista de apéndices

	Página
Apendice A.	53
Apendice B.....	55
Apéndice C.....	56
Apendice D	58

Lista de abreviaturas, siglas y símbolos

DHc	Deuterio Halógena combinada
Ecu	Ecuatorial
IAvH	Instituto de Investigación Alexander Von Humboldt
<i>I</i>	Rayo de luz reflejado.
<i>r</i>	Rayo de luz incidente.
LEAM	Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular
LIBS	Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (Frecuentemente traducida como Espectroscopía de plasma inducido por láser)
MHN	Museo de Historia Natural
NIR	Región espectral del infrarrojo cercano
PM	Polo mayor
Pm	Polo menor
<i>R</i>	Reflectancia
SEM	Scanning Electron Microscope (Frecuentemente traducida como Microscopia electrónica de Barrido)
UV-VIS	Luz ultravioleta - visible

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO Y MANIPULACION SOBRE LA COLORACIÓN DE LOS HUEVOS DE AVES DE COLECCIÓN, MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA UV-VIS*

AUTOR: LILIANA GUTIERREZ NIÑO**

PALABRAS CLAVES: ESPECTROFOTOMETRÍA, REFLECTANCIA, ULTRAVIOLETA-VISIBLE, COLECCIÓN OOLÓGICA.

CONTENIDO

El interés científico en las colecciones de huevos de aves ha aumentado significativamente, debido al uso de espectrofotómetros portátiles, que han permitido determinar los patrones de coloración de los huevos de las aves, a partir de espectros de las longitudes de onda ultravioleta visible (UV-VIS). Sin embargo, son escasos los estudios que consideran las implicaciones que trae el utilizar para estos estudios huevos de colección, sin considerar si el procedimiento de preparación para su preservación o el tiempo de almacenamiento, tiene algún efecto sobre los patrones de coloración del cascarón. El objetivo de esta pasantía fue evaluar el efecto de la manipulación (limpieza y preparación) y del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de los huevos de aves de colección, mediante la espectroscopía de reflectancia UV-VIS.

Se evaluó el efecto de la limpieza y preparación de los huevos sobre la coloración, a partir de la reflectancia espectral de 25 huevos de 5 especies de aves domésticas cautivas y para evaluar el efecto del tiempo se emplearon 37 nidadas, del genero *Ploceus* y *Zonotrichia* de la colección oológica del IAvH. Mediante el uso de los descriptores del color se logró demostrar el efecto de la preparación de los huevos sobre la medición del color, principalmente observándose una mayor variación en las muestras vacías. Esto probablemente se pudo deber a la interacción de la luz con las diferencias en la geometría y estructuras microscópicas reveladas en las imágenes SEM para cada una de las cáscaras. Igualmente, para los resultados obtenidos a partir de los huevos de colección se encontró variación significativa en los diferentes descriptores de coloración. Estos resultados proporcionan una nueva visión de los efectos de la preparación de este tipo de muestras, información esencial para los estudios de la coloración que son más sensibles a estos cambios.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Rafael Cabanzo Hernandez, Físico

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT ON STORAGE TIME AND HANDLING, OVER EGGSHELL COLORATION FROM AVIAN COLLECTION THROUGH UV-VIS REFLECTANCE SPECTROSCOPY *

AUTHOR: LILIANA GUTIERREZ NIÑO**

KEYWORDS: SPECTROPHOTOMETRY, REFLECTANCE, ULTRAVIOLET-VISIBLE, OOLOGICAL COLLECTION.

DESCRIPTION

The use of portable spectrophotometers have allowed to determine coloration patterns on the avian eggshells, from spectra of visible ultraviolet wavelengths (UV- VIS), which has increased significantly the scientific interest on egg collections. However, there are few studies considering the impact of using egg collections for the studies, regardless whether the management or procedure for preservation, as well as the storage time has any effect on the patterns of the eggshell coloration. The aim of this study was to evaluate the effect of management (cleaning and preparation) and storage time on the eggshell color from avian collections, through UV-VIS reflectance spectroscopy.

The effect of handling and egg preparation concerning the eggshell coloration was evaluated by spectral reflectance of 25 eggs from 5 species of captive domestic birds, and to evaluate the effect of storage time, we used 37 clutches of genus *Ploceus* and *Zonotrichia* from the egg collection of the IAvH. By using color descriptors, we demonstrated the effect of egg preparation over coloring measurement, showing higher variation in empty samples, which can be probably explained by light interactions with diverse geometric and microscopic structures revealed in the SEM images for each eggshell. Likewise, the results obtained from the egg collection, showed a significant variation for every color descriptor evaluated. The results demonstrate a new understanding on the effects of preparation in this type of samples, essential information for coloration studies which are more sensitive to these changes.

* Bachelor Thesis

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Rafael Cabanzo Hernández, Físico

Introducción

Tradicionalmente los huevos de referencia están bien representados en algunos museos de historia natural (MHN) siendo estas colecciones un recurso invaluable para la investigación (Pyke & Ehrlich, 2010; Scharlemann & Green, 2003; Suarez & Tsutsui, 2004), contribuyendo no solo al fortalecimiento de las bases conceptuales de la conservación desde la taxonomía o biogeografía, sino también desde la historia natural (Remsen, 1995). En los últimos años, el interés científico en las colecciones de huevos de aves en los museos ha aumentado significativamente debido a los avances metodológicos de los análisis comparativos (Stokke, Moksnes, & Roskaft, 2002; Soler, Moreno, Jesu', Avilés, & Møller, 2005; Kilner, 2006; Birchard & Deeming, 2009; Maurer et al., 2015).

El evidente desarrollo de las técnicas analíticas utilizadas para estudios comparativos, están constituidas en su gran mayoría por técnicas instrumentales espectroscópicas, las cuales están enfocadas a diferentes tipos de análisis específicos, permitiendo identificar y cuantificar compuestos presentando un sin número de aplicaciones en diversas áreas del conocimiento como la física y la química (Aya-Ramírez, Mejía, Cabanzo, Fonseca, & Padilla, 2002; Calderone, Guillou, Reniero, & Naulet, 2007) y recientemente en la biología (Cassey, Hauber, Maurer, & Ewen, 2012). Estas técnicas se destacan por ser no invasivas para especímenes de campo y adecuadas para estudios que emplean muestras únicas e irremplazables, como es el caso de los especímenes de museo (Thomas et al., 2015).

En los últimos años, el desarrollo y uso de espectrofotómetros portátiles, han permitido que se dé un mayor avance en la aplicación de la reflectancia UV-VIS en los estudios comparativos sobre la coloración de la cáscara de huevo (Cassey et al., 2009; Cassey, Maurer, Duval, Ewen, & Hauber, 2010; Hanley, Stoddard, Cassey, & Brennan, 2013; Maurer et al., 2015; Soler et al., 2005), enfocándose principalmente en comprender la variación intra e inter específica de fenotipos de color del cascaron (Cassey et al., 2008; Krist & Grim, 2007; Moreno & Osorno, 2003; Soler, Navarro, Contreras, Avilés, & Cuervo, 2008) y en determinar los componentes de la estructura de la cáscara del huevo y su coloración (Cassey et al., 2009; Green, 1998; Igic et al., 2010; Moksnes & ØSkaft, 1995; Stoddard & Stevens, 2010)

Diversos estudios demuestran la importancia de la coloración de la cáscara del huevo para múltiples funciones tales como camuflaje, selección sexual, mimetismo y rechazo del huevo huésped-parásito, así como, para los análisis evolutivos y filogenéticos (Abernathy & Peer, 2014; Merilaita & Lind, 2005; Moreno & Osorno, 2003; Yang et al., 2013). Por tanto, las colecciones oológicas de referencia de los diferentes museos, adquieren relevancia para la investigación de estos temas.

Sin embargo, los patrones de coloración pueden cambiar desde el momento de su puesta y durante su almacenamiento en las colecciones, así como, por el procedimiento de extracción de su contenido interno (preparación) para su preservación en el museo. Es escasa la información sobre los efectos del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de las cáscaras de huevo, como también los efectos posteriores a su preparación para su preservación, evaluándose los aspectos de degradación del color de especímenes de museo generalmente en plumas (McNett K. Marchetti, 2005) y pocos estudios se refieren a los cambios de coloración por efecto de almacenamiento en huevos de referencia (Cassey et al., 2010) .

Recientemente se encontró que la transmisión de luz en cascarones de huevos de algunas especies de aves es muy baja $<0.1\%$. Estos resultados han permitido visualizar que a mayores longitudes de onda ($\lambda > 500\text{nm}$) la luz transmitida aumenta, existiendo una relación positiva entre la reflectancia del cascarón y la transmisión de la luz a través del mismo (Maurer *et al.*, 2015). Pero adicional a esto, se hace necesario determinar si existe una variación en las medidas de reflectancia asociadas a los descriptores de coloración analizados, influenciada por la extracción del componente proteico interno del huevo y así mismo, establecer si esta es o no significativa para los estudios en que realizan comparaciones empleando la reflectancia UV-VIS con huevos frescos y de colecciones oológicas.

El presente trabajo de investigación contribuye al conocimiento de los efectos del tiempo de almacenamiento y determina si el contenido interno de los huevos y la limpieza son factores que alteran la coloración de la cáscara, sirviendo estos resultados como información de apoyo para los estudios que busquen evaluar la coloración de los huevos a partir de ejemplares de museo.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento y manipulación de museo sobre la coloración de los huevos de aves de referencia, mediante espectroscopía de reflectancia UV-VIS.

1.2 Objetivos específicos

- Realizar pruebas preliminares para establecer la configuración óptima del espectrómetro y condiciones de adquisición de los espectros de reflectancia.
- Diseñar y construir un sistema de soporte y posicionamiento de la muestra (huevos) que permita trabajar con especímenes de diferentes tamaños y formas.
- Caracterizar la coloración de las cáscaras de los huevos, para determinar la consistencia en el patrón de coloración y a partir de esta, evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento, manipulación y preparación.
- Adquirir destrezas asociadas al cálculo y análisis de la información derivada de los diferentes descriptores de coloración, y al uso del software para su respectivo procesamiento.

2. Competencias de la pasantía de investigación

Una vez concluida dicha pasantía, la estudiante desarrolló las siguientes competencias:

1ª. Revisión de la base de datos, selección y recopilación de la información de los ejemplares utilizados de la colección oológica.

2ª. Adiestramiento y ejecución de la preparación para la conservación de los huevos en las colecciones.

3ª. Desarrollo de pruebas preliminares tanto del montaje como de los parámetros operacionales del equipo.

4ª. Medición de los espectros de reflectancia de todos los huevos incluidos en el estudio.

5ª. Determinación de los parámetros descriptores de la coloración de todos los huevos, por medio del software Origin Pro (versión 2016 SR2).

6ª. Análisis de Resultados y Discusión.

3. Materiales y métodos

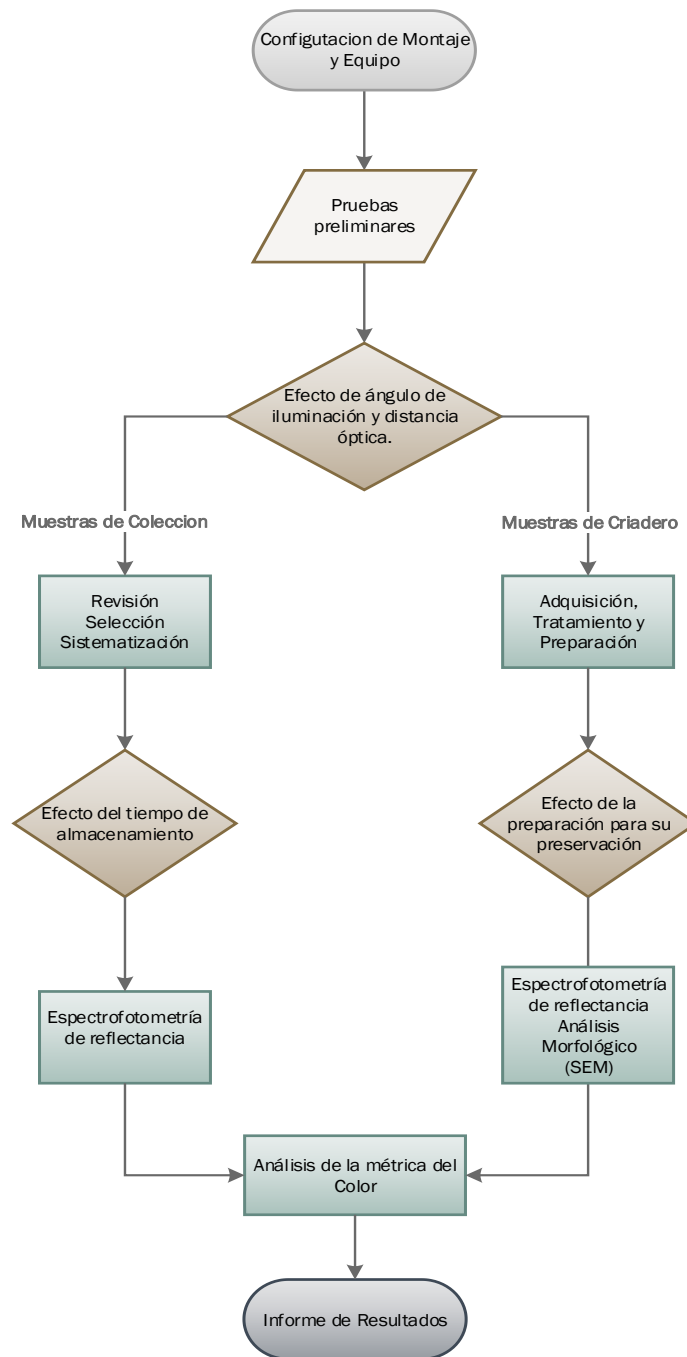


Figura 3.1 Diagrama de flujo del desarrollo de la metodología del estudio.

La metodología de esta investigación se dividió en tres fases, como se señala en el anterior diagrama de flujo (**Figura 3.1**).

Fase I: Configuración del montaje y equipo para la toma de datos.

Fase II: Evaluación del efecto de preparación de huevos para su preservación en las colecciones empleando huevos de criadero.

Fase III: Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de referencia, empleando ejemplares de la colección oológica del IAvH.

3.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos

3.1.1 Diseño del sistema de posicionamiento de la muestra. Con el diseño del sistema de posicionamiento de la muestra se buscó construir un compartimiento para la toma de datos, cuyo fin fuera minimizar la influencia de la luz ambiente, brindar un soporte adecuado para el porta-sonda y la muestra, garantizando de esta forma la repetibilidad en la toma de datos.

Inicialmente se desarrolló un montaje simple el cual consistió en una caja rectangular, pintada de negro mate, cuyo sistema de apertura y cierre consistió en un paño negro, provista en su interior de un porta muestra y un orificio para fijar el porta-sonda (**Figura 4.1a**).

Luego de poner a prueba este montaje y observar que se registraban variaciones en las medidas de la señal, producto de cambios en la intensidad de luz del ambiente, se desarrolló un segundo montaje en el que se incluyeron mejoras en algunas partes del diseño. Para este, se construyó un soporte metálico, con una esfera en su interior recubierta internamente de negro mate y negro humo y en su parte externa de blanco. Dentro de esta esfera se ajustó la punta del porta-sonda, buscando con este nuevo montaje, confinar el sistema fuente de radiación-muestra-detector, a fin de tomar mediciones repetibles y minimizar la incidencia de la radiación del ambiente sobre la muestra. (**Figura 4.1b-d**).

3.1.2 Efecto del ángulo de iluminación y distancia óptima de ubicación de la fibra óptica. Antes de realizar cualquier medición con el espectrofotómetro, fue necesario estabilizar la temperatura en la lámpara, teniendo en cuenta que cualquier sistema instrumental electrónico cuya fuente de luz se basa en una lámpara Deuterio-Halógeno (D-H), requiere un tiempo de espera. A partir de este, se logra controlar la presencia de error de medición por parte del instrumento causado por la relación existente entre la temperatura de la lámpara y la luz emitida (intensidad y longitud de onda). Para tal fin, se determinó que un tiempo de espera de 30 minutos era suficiente para garantizar la estabilidad de la luz emitida por la fuente.

Lo anterior, se corroboró realizando mediciones sobre un patrón (pastilla de sulfato de bario) cada 10 minutos a partir del tiempo de encendido del equipo (desde que se enciende hasta los 40 minutos). El criterio de selección del tiempo de espera de la lámpara encendida fue la evaluación en la consistencia de la medición del espectro del sulfato de bario durante el tiempo de estabilización, encontrándose que los espectros tomados al minuto 30 y 40 se superponían, a partir de lo cual se definió que 30 minutos era adecuado para permitir la correcta estabilización de la lámpara.

Por otro lado, para verificar el funcionamiento, puesta a punto y seleccionar la mejor configuración experimental del equipo, se procedió a realizar pruebas preliminares para la determinación del ángulo de iluminación y distancia muestra-fibra óptima. Para esto se realizaron mediciones empleando tres diferentes porta sonda (**Figura 3.2**) y variando la distancia de la fibra a la muestra.

Se realizaron mediciones empleando como patrón un huevo blanco immaculado de *Gallus gallus domesticus*, sobre el cual se tomaron espectros en tres puntos diferentes: polo mayor, polo menor y ecuatorial desde 1 mm - 3 mm a 45° y 90°. La distancia óptica a 1mm, fue la mínima permitida por la curvatura del huevo en el polo menor (el más puntudo) tomándose las mediciones a partir de esta distancia evitando que la fibra y el huevo tuviera cualquier tipo de contacto. Para cada polo se tomaron 6 mediciones en el mismo punto, manteniendo la distancia y ángulo fijos, las cuales fueron promediadas y comparadas. Esto se realizó a 1mm, 2mm y 3 mm para los dos ángulos. En la **Figura 4.2** se muestran los espectros de reflectancia del patrón, adquirido al irradiar la muestra

a 90° y 45° a 1mm de distancia de la fibra a la muestra, correspondiendo esta distancia (1mm) y el ángulo de 90° a las medidas seleccionadas para la toma de todos los espectros.

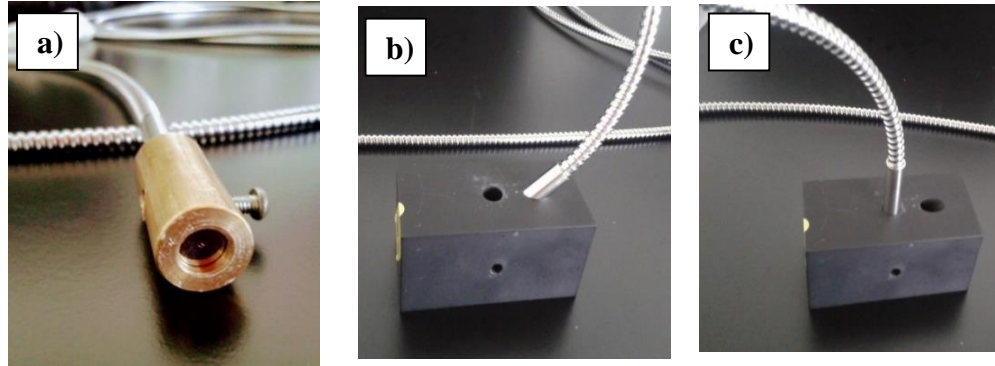


Figura 3.2 Porta-fibra irradiar con diferente ángulo de incidencia: (A) y (B) 90°, (C) 45°

3.2 Fase II: Evaluación del efecto de preparación de huevos para su preservación en las colecciones de referencia

3.2.1 Selección de muestras, limpieza y preparación

3.2.1.1 Huevos de criadero. El primer grupo de muestras correspondió a 25 huevos no incubados, no tratados ni pasteurizados de cinco especies de criadero (Figura 3.3). Estas se seleccionaron con base en la variación de la coloración de la cáscara, buscando abarcar diferentes tonalidades. Posteriormente a su obtención, se almacenaron en frío en un contenedor oscuro para su posterior análisis (Igic et al., 2015).

Estas muestras se clasificaron de la siguiente manera: huevos crema claro (n=5), marrón (n=5), blancos immaculados (n=5) y verdes (n=5) de gallina (*Gallus gallus domesticus*) de un criadero comercial en Rionegro (Santander); huevos blancos (n=5) de pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) de una granja doméstica en Mutiscua (Norte de Santander).

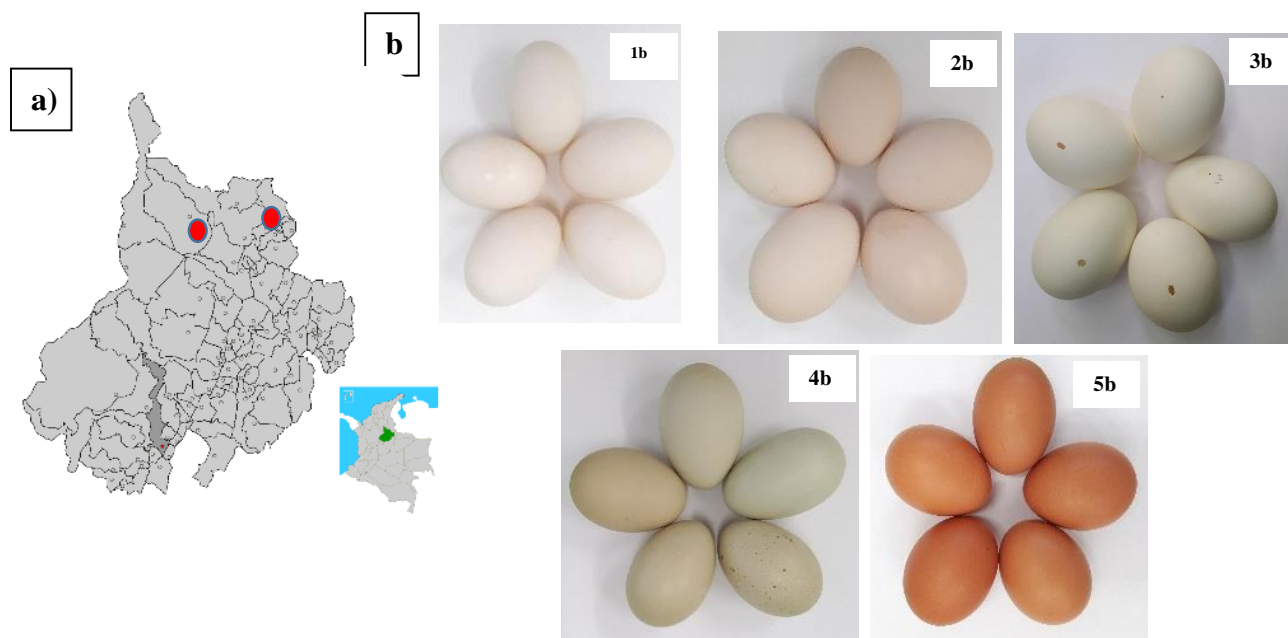


Figura 3.3 (a) Localidades de colecta de los huevos silvestres en el departamento de Santander, Colombia. (b) Nidadas de las especies silvestres utilizadas: *Anas platyrhynchos domesticus* (1b) y *Gallus gallus domesticus* (2b-5b).

3.2.1.2 Limpieza y preparación. Para la limpieza de las muestras antes de la toma de espectros se empleó alcohol isopropílico 70% (C_3H_8O) evitando utilizar cualquier compuesto que pudiera afectar los componentes orgánicos del huevo (como la membrana cuticular o los mismos pigmentos), como fue el caso de la acetona ($CH_3(CO)CH_3$). Por otro lado, para la parte de vaciado de los huevos, cada muestra se preparó con base en las directrices dadas por el IAvH. Se perforó en la parte ecuatorial (3-5mm) y utilizando una aguja con jeringa, se abrió un pequeño orificio en su polo mayor para mediante inyección de aire, extraer todo su contenido, siendo muy cuidadosos en evitar cualquier ruptura del cascarón (Figura 3.4). Posteriormente se lavaron y secaron impidiendo la incidencia de luz directa sobre esta. En la Figura 3.5 se muestran los huevos vacíos después del proceso de preparación.



Figura 3.4 Procedimiento para la preparación del huevo limpio (orificio, extracción del contenido del huevo y limpieza).

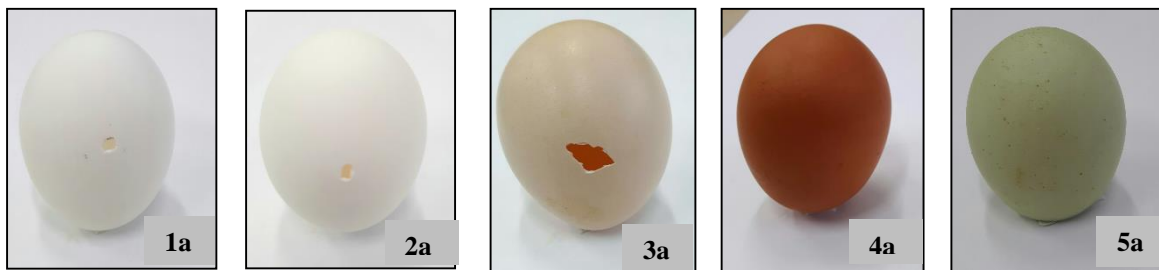


Figura 3.5 Imágenes representativas del huevo preparado, para cada una de las nidadas. *Anas platyrhynchos domesticus* (1a) y *Gallus gallus domesticus* (2a-5a).

3.2.2 Espectrofotometría de Reflectancia. La reflectancia espectral de las muestras de huevos de criadero, se midió utilizando un espectrofotómetro portátil AvaSpec-ULS2048L (Avantes Inc., Louisville, CO, USA), una lámpara combinada AvaLight-DHc 2048 (Avantes Inc., Louisville, CO, USA) para el rango UV-VIS y una sonda de fibra óptica bifurcada que permitió iluminar el huevo y recoger la luz reflejada simultáneamente. La punta de la sonda se ajustó al soporte seleccionado. Las especificaciones usadas en el espectrofotómetro se detallan a continuación (Tabla 3.1).

Tabla 3.1.*Parámetros instrumentales para la adquisición de espectros de reflectancia*

Instrumentación del montaje	
Componentes espectroscópicos	
Espectrofotómetro	Tipo AvaSpec-ULS2048L (Avantes Inc., Louisville, CO, USA)
Sensibilidad	470,000 cuentas (counts) / μW por ms de tiempo de integración
Detector	CCD orden lineal, 2048 píxeles
Señal / Ruido	300: 1
Interfaz	USB 2.0 de alta velocidad, 480 Mbps RS-232, 115.200 bps
Adquisición de datos	
Software	AvaSoft 7.7.2 Full-USB2 (Avantes inc.,Louisville, CO, USA)
Tipo de datos	Cuentas (<i>counts</i>)
Modo de adquisición	Acumulados
Datos	50
Tiempo de integración	100 [ms]
Rango de longitud de onda de trabajo	300-700 [nm]

Todos los datos se calcularon en relación con un estándar de reflectancia difusa blanca Sulfato de Bario (BaSO_4) y una referencia oscura (excluyendo la luz entrante del detector), siendo tomadas todas las mediciones por un solo investigador (Cassey et al., 2010).

Los espectros se obtuvieron a partir de tres zonas del huevo (Polo mayor (PM), Ecuatorial (Ecu) y Polo menor (pm)). Para cada zona se tomaron 6 espectros en puntos aleatorios (50 acumulados), obteniendo de esta forma 16 mediciones de reflectancia para cada huevo (Takasu, Moskát, Muñoz, Imanishi, & Nakamura, 2009).

3.2.3 Análisis de la métrica del color. Cada espectro de reflectancia obtenido se procesó mediante el software Origin Pro (versión 2016 SR2). A partir de este, se calculó el valor de la reflectancia media para cada uno de los puntos en cada huevo. Para poder extraer información de la métrica del color de cada nidada, se cuantificaron los espectros promedio calculando a partir de ellos cuatro diferentes descriptores tradicionales del color obtenidos a partir de cada zona del huevo.

Los diferentes descriptores de coloración se calcularon de acuerdo a Hanley, 2012, a partir de las siguientes relaciones:

$$Brillo = \frac{\text{Área } 300-700}{\text{Longitud de onda total (400)}} \qquad UV \text{ Croma} = \frac{\text{Área } 300-400}{\text{Área } 300-700}$$

$$AV \text{ Croma} = \frac{\text{Área } 450-550}{\text{Área } 300-700} \qquad R \text{ Croma} = \frac{\text{Área } 600-700}{\text{Área } 300-700}$$

Los descriptores de cada zona se promediaron para cada huevo, con el fin de tener una representación de la coloración de todo el huevo, a partir de las cuales se pudo determinar el efecto de la suciedad, limpieza y preparación sobre la coloración. Estos valores se confirmaron mediante ajustes de mínimos cuadrados para determinar si la tendencia evidentemente no presenta una pendiente negativa confirmando así el efecto del tiempo en la disminución de la coloración de las muestras medidas.

3.2.4 Análisis morfológico y composicional de las muestras

3.2.4.1 Microscopía electrónica de barrido (MEB). Con el fin de buscar respuesta a algunas variaciones observadas en los espectros del tratamiento sucio-limpio y preparado de las cáscaras de huevo de criadero se empleó la microscopía electrónica de barrido, utilizando un microscopio electrónico de barrido Quanta Field Emission Gun - 650 (FEG) integrado con el software Génesis Imaging - Mappin versión 6.37. Para esto se seleccionaron 5 trozos de cascarón representativos de cada uno de los especímenes, los cuales se colocaron en el porta muestras de aluminio sobre una cinta adhesiva doble faz, luego se cubrieron con grafito para el análisis químico y con oro para el estudio morfológico con la finalidad de hacerlas conductoras y finalmente se introdujeron en el MEB. En la Tabla 3.2 se dan las especificaciones empleadas en el equipo.

Para tener una idea de la composición de las muestras, de manera complementaria se realizó un análisis elemental y molecular para cada uno de los 5 especímenes mediante las técnicas de espectroscopía de plasma inducido (LIBS) y Espectroscopía Raman. Algunos de los resultados de estas técnicas y los parámetros operacionales de los equipos se relacionan en el **Apéndice C y D**.

Tabla 3.2

Parámetros utilizados para la adquisición de imágenes por MEB

Instrumentación del montaje	
Características para adquisición de imágenes	
Microscopio electrónico de barrido	Quanta Field Emission Gun 650 (FEG)
Software	Génesis Imaging-Mappin versión 6.37
Vacío	Alto
Voltaje de aceleración	7 kV
Detector	Para imágenes
Electrones secundarios (SE)	Everhart thornley detector ETD
Electrones retrodispersados (BSE)	Back scattered electrón detector (BSED) tipo SSD.

3.3 Fase III: Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección

3.3.1 Selección de muestras

3.3.1.1 Huevos de colección. Los datos en muestras de colección fueron tomados con el permiso de la colección oológica del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAVH) (<http://www.humboldt.org.co/es/investigacion/programas/colecciones-biologicas>). Para su selección se tuvieron en cuenta aquellas especies que estuvieran más representadas en el tiempo de almacenamiento (1899-2003) y su procedencia fuera de la misma localidad o de una localidad vecina.

Solo se emplearon huevos sin defectos de preparación (es decir, sin manchas producto de manipulación o presencia de fracturas) y las muestras que se observaron con señales de desvanecimiento del color en los polos, fueron incluidas sin hacer ninguna excepción (Hargitai et al., 2016).

Con base en lo anterior, y luego de una adecuada revisión de los especímenes disponibles en la colección, los datos fueron tomados a partir de 71 huevos (37 nidadas) pertenecientes a las especies: *Ploceus cucullatus collaris* (n=7), *Ploceus cucullatus cucullatus* (n=8), *Ploceus cucullatus bohndorffi* (n=12), *Ploceus cucullatus* (n=3) y *Zonotrichia capensis* (n=7). Su lugar de colecta y perfil de coloración se presentan en la Figura 3.6. Así mismo, en el Apéndice A4.1 se proporcionan los números de acceso al IAvH para cada una de los ejemplares empleados, así como información de apoyo (nombre de la colección, especie, fecha y lugar de colecta).

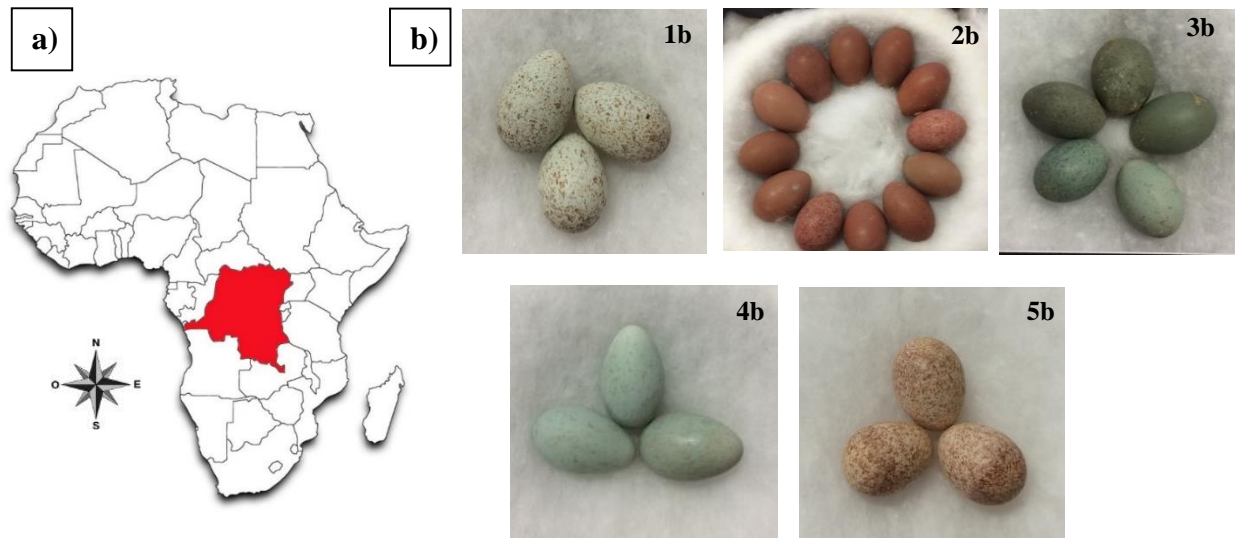


Figura 3.6 (a) Localidades de colecta de los huevos de *Ploceus*, en su mayoría de kolwezi Ht. Katanga, el Congo. (b) Nidadas representativas de cada especie estudiada (*P. cucullatus cucullatus* (1b), *P. cucullatus bohndorffi* (2b), *P. cucullatus collaris* (3b), *P. cucullatus* (4b) y *Zonotrichia capensis* (5b).

3.3.2 Espectrofotometría de Reflectancia. El procedimiento realizado para el análisis espectrofotométrico de las muestras de huevos de museo fue básicamente el mismo, con una única variante relacionada con la cantidad de espectros tomados por punto. En este caso, para cada zona se midieron 2 espectros en cada punto, obteniendo de esta forma 6 mediciones de reflectancia para cada uno de los huevos.

3.3.3 Análisis de la métrica del color. Se siguió el mismo procedimiento del apartado 3.2.3, para las 6 mediciones.

4. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de las diferentes etapas realizadas a partir de la metodología referida.

4.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos

4.1.1 **Sistema de posicionamiento de la muestra.** En la Figura 4.1 se presentan los dos montajes descritos previamente, estableciéndose el segundo (b) como el diseño definitivo para la toma de datos. El instrumento está compuesto de las siguientes partes:

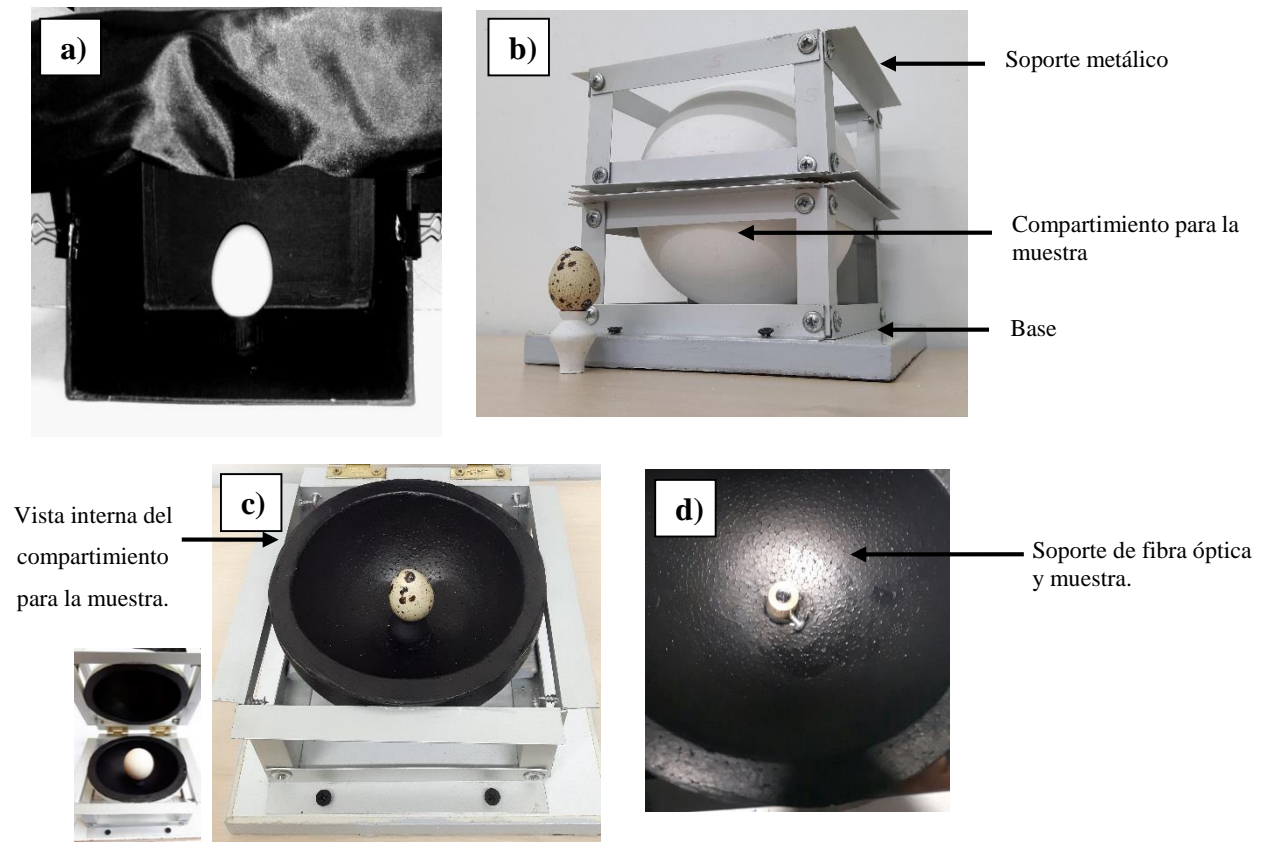


Figura 4.1 (a) Caja-rectangular oscura con cortina removible. (b) montaje completo destacando el soporte metálico y cierre ajustable (c) parte interna del compartimiento y (d) porta fibra-muestra.

4.1.2 **Efecto del ángulo de iluminación y distancia óptima de ubicación de la fibra óptica.** En la Figura 4.2 se presentan los espectros adquiridos con ángulo de iluminación a 45° y 90° . Comparando los dos espectros vemos que hay variaciones mínimas en la intensidad de la reflectancia atribuidos probablemente a una mejor relación señal/ruido para la medición a 90° . A partir de esta se apreció una menor reflectancia para el espectro tomado a 45° debido a que la luz no solo interactúa con la superficie del huevo, sino también lo hace con la superficie del porta fibra.

De acuerdo a esto y teniendo en cuenta la geometría del porta fibra, cumpliendo a su vez la función de soporte de las muestras, se optó por seleccionar para todas las mediciones el soporte de bronce, ver **Figura 3.2 (a)**, que corresponde a iluminación a 90° y recolección de la radiación reflejada a 180° . Estos resultados coinciden con los empleados por otros investigadores en plumaje aviar (Barreira et al., 2016). Por otro lado, se pudo determinar que la distancia óptica adecuada fue la permitida por la curvatura del huevo, evitando cualquier contacto directo entre la superficie de la fibra y la muestra, la cual correspondió a 1mm. Los resultados obtenidos a distancias superiores a esta medida, mostraron una baja relación señal ruido.

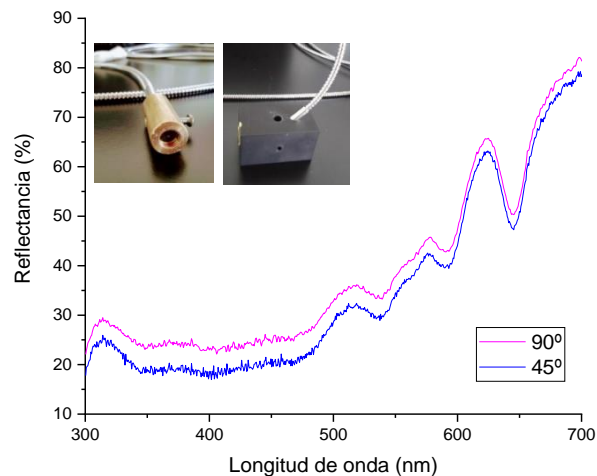


Figura 4.2 Espectros de reflectancia de huevo de *Gallus gallus domesticus*, adquiridos cuando la muestra se irradia a 90° y a 45° a 1mm de distancia fibra-muestra.

4.2 Fase II: Evaluación del efecto de preparación de huevos para su preservación en las colecciones de referencia

4.2.1 Reflectancia UV-VIS de huevos de criadero

4.2.1.1 Huevos sin limpiar, limpios y vacíos. En la Figura 4.3, se presenta una comparación entre los espectros obtenidos a partir de huevos sin limpiar, limpios (huevo lleno) y vacíos para *Anas platyrhynchos* en cada una de las tres zonas identificadas. El espectro que se muestra es el promedio de los seis espectros adquiridos por zona. Esta misma comparación se presenta en las Figuras 4.4 – 4.7, para las 4 muestras de *Gallus gallus domesticus*.

A partir de los resultados obtenidos, de forma general se observaron variaciones para cada uno de los tres tratamientos. En la **Figura 4.3** referente a la muestra sucia de huevo blanco de *anas platyrhynchos* se observaron espectros con una tendencia similar para cada una de las tres zonas medidas (Ecu, PM, pm), visualizándose espectros superpuestos. Tal comportamiento, desapareció en la medición efectuada, posterior al tratamiento de limpieza. En el espectro obtenido a partir del huevo vacío, se apreció un incremento significativo en los valores de reflectancia, principalmente en la zona ecuatorial. Esta última tendencia registrada en el huevo preparado, se presentó para casi todas las muestras analizadas, a excepción del huevo marrón de *Gallus gallus domesticus* donde gráficamente no se logró apreciar una variación (**ver figura 4.6**).

Las formas de los espectros de reflectancia obtenidos, evidenciaron la coloración característica de cada huevo, observándose máximos de reflectancia en la región característica de cada color. Para el huevo blanco de *Anas platyrhynchos* se presenta un máximo de reflectancia correspondiente a la longitud de onda de 546 nm. Así mismo, para las cuatro muestras de *Gallus gallus domesticus* los máximos de reflectancia correspondieron a: huevo blanco: 656 nm, huevo crema: 694 nm, huevo marrón: 697 nm y huevo verde: 699 nm.

Así mismo, en la **Tabla 4.1** se relacionan los resultados obtenidos para los diferentes descriptores de color calculados, para los cuales se cuantificó la información de los espectros para los 25 huevos correspondientes a las 5 nidadas. En esta se confirma, lo determinado anteriormente de manera visual.

Las cuatro métricas del color basadas en la reflectancia (brillo, UV croma, A-V croma y R croma) difirieron, en promedio, a través de los tres tratamientos para las 5 muestras medidas. Las diferencias encontradas entre las muestras sin preparar (sucias y limpias llenas) y preparadas (vacías), de manera general dieron como resultado una menor proporción en el valor del UV croma, mayor proporción en el croma rojo y una variación mínima para el azul-verde. Para el caso del brillo, se encontró un mayor incremento en la variación, para los huevos blanco immaculado y verde de gallina, presentando incrementos del porcentaje de reflectancia de hasta el 20%.

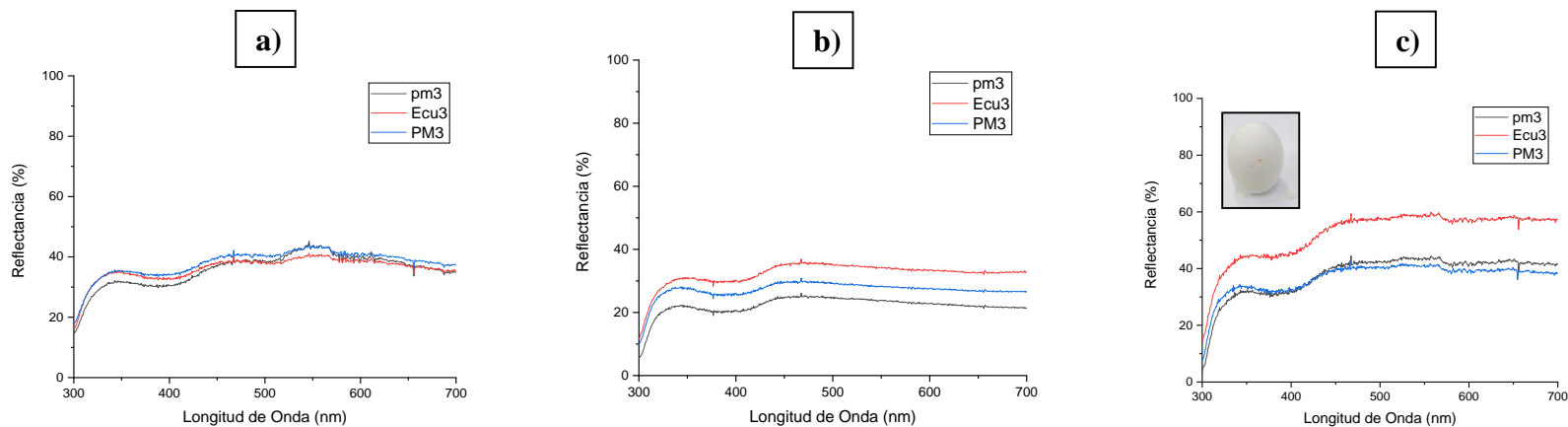


Figura 4.3 Espectros de reflexión de huevos Blancos de *Anas platyrhynchos domesticus*. (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.

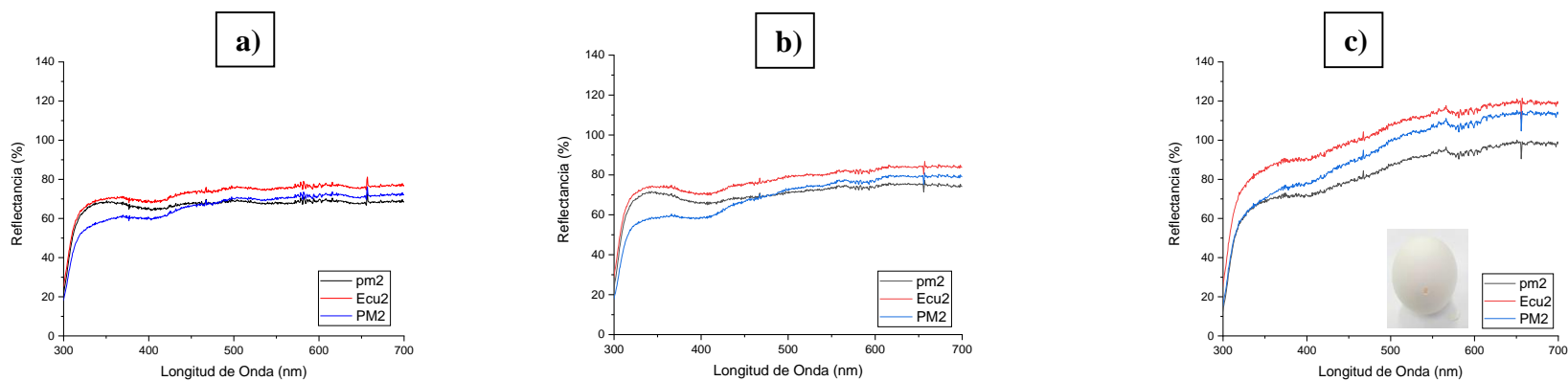


Figura 4.4 Espectros de reflexión de huevos Blanco immaculado de *Gallus gallus domesticus*. (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.

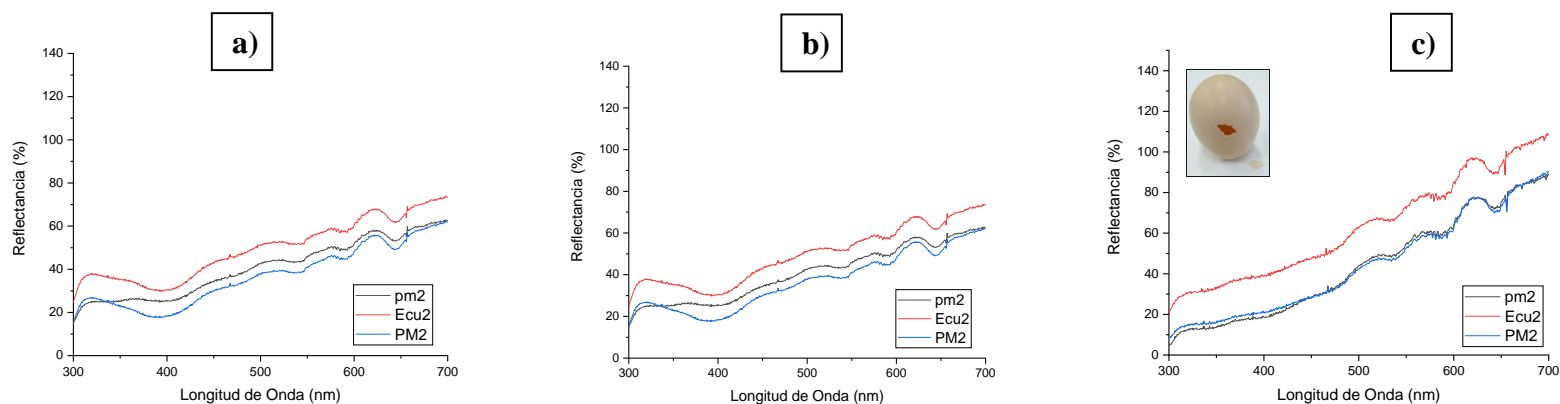


Figura 4.5 Espectros de reflexión de huevos Crema claro de *Gallus gallus domesticus*. (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.

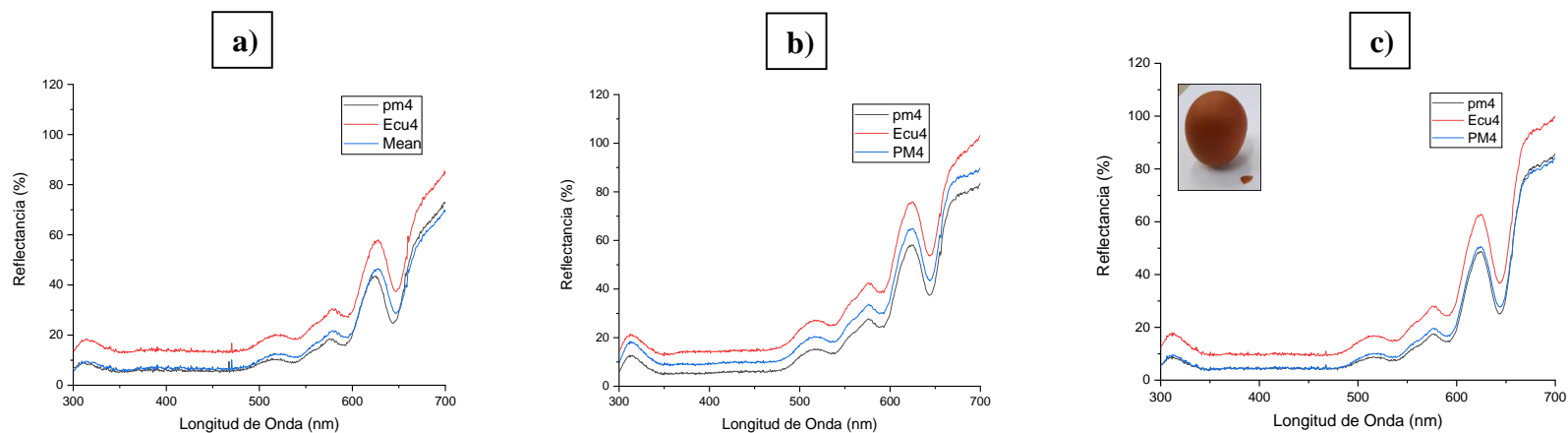


Figura 4.6 Espectros de reflexión de huevos Marrón de *Gallus gallus domesticus*. (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.

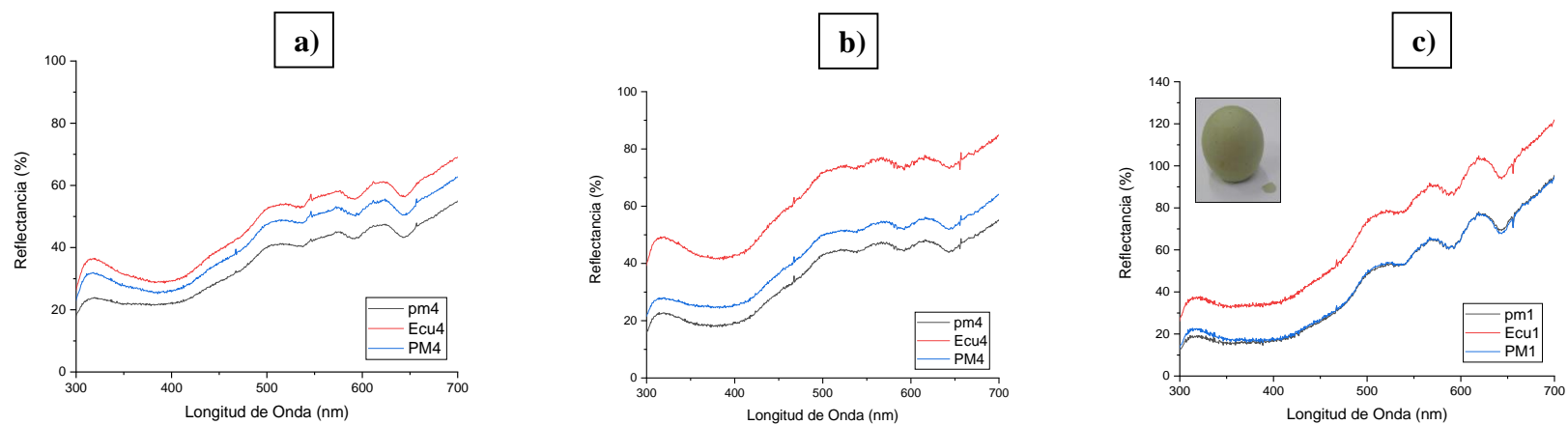


Figura 4.7 Espectros de reflexión de huevos Verdes de *Gallus gallus domesticus*. (a) Sucio, (b) Limpio y (c) Vacío.

Tabla 4.1*Promedios y CoV de los descriptores de coloración para las 5 muestra, sucias, limpias y preparada*

Tratamiento		UV Croma	A-V Croma	Brillo	R Croma	UV Croma	A-V Croma	Brillo	R Croma	UV Croma	A-V Croma	Brillo	R Croma
Blanco inmaculado limpio	Promedio	0,220	0,259	60,439	0,265	0,208	0,261	64,300	0,274	0,224	0,257	74,062	0,264
	CoV	0,092	0,021	0,106	0,048	0,090	0,018	0,049	0,046	0,013	0,002	0,032	0,010
Blanco inmaculado sucio	Promedio	0,214	0,256	65,443	0,275	0,208	0,257	69,036	0,282	0,216	0,256	75,211	0,275
	CoV	0,093	0,024	0,075	0,042	0,102	0,022	0,051	0,047	0,024	0,008	0,026	0,008
Blanco inmaculado vacío	Promedio	0,178	0,262	82,559	0,302	0,167	0,264	86,305	0,311	0,190	0,260	104,803	0,293
	CoV	0,112	0,016	0,079	0,045	0,125	0,015	0,112	0,052	0,059	0,008	0,068	0,027
Crema claro limpio	Promedio	0,158	0,253	44,370	0,342	0,152	0,245	42,577	0,363	0,179	0,249	55,848	0,327
	CoV	0,139	0,036	0,182	0,089	0,047	0,050	0,080	0,045	0,097	0,025	0,141	0,071
Crema claro sucio	Promedio	0,167	0,248	47,368	0,341	0,159	0,241	43,771	0,363	0,177	0,245	54,534	0,338
	CoV	0,112	0,032	0,210	0,078	0,045	0,052	0,176	0,065	0,063	0,034	0,117	0,030
Crema claro vacío	Promedio	0,109	0,242	53,127	0,406	0,102	0,231	48,270	0,429	0,141	0,244	67,853	0,370
	CoV	0,232	0,058	0,211	0,110	0,072	0,072	0,144	0,065	0,076	0,039	0,118	0,058
Crema comercial limpio	Promedio	0,075	0,116	20,050	0,636	0,099	0,129	22,415	0,590	0,111	0,152	33,166	0,527
	CoV	0,136	0,132	0,136	0,537	0,122	0,127	0,197	0,073	0,038	0,000	0,119	0,038
Crema comercial sucio	Promedio	0,065	0,095	19,743	0,697	0,082	0,109	23,395	0,658	0,115	0,142	34,179	0,564
	CoV	0,164	0,148	0,127	0,050	0,203	0,186	0,212	0,083	0,107	0,114	0,190	0,072
Crema comercial vacío	Promedio	0,087	0,124	20,305	0,620	0,103	0,136	22,819	0,585	0,133	0,163	33,756	0,507
	CoV	0,118	0,120	0,145	0,058	0,119	0,114	0,184	0,069	0,030	0,051	0,121	0,033
Pato limpio	Promedio	0,217	0,273	25,691	0,252	0,222	0,267	31,742	0,255	0,221	0,265	43,460	0,259
	CoV	0,068	0,012	0,203	0,046	0,047	0,016	0,093	0,023	0,030	0,021	0,281	0,023
Pato sucio	Promedio	0,197	0,274	39,667	0,266	0,208	0,269	39,392	0,263	0,208	0,269	36,954	0,263
	CoV	0,025	0,008	0,077	0,014	0,035	0,010	0,058	0,023	0,041	0,010	0,082	0,021
Pato vacío	Promedio	0,180	0,282	34,399	0,275	0,200	0,275	36,911	0,265	0,205	0,271	53,387	0,265
	CoV	0,142	0,028	0,088	0,057	0,111	0,024	0,107	0,055	0,093	0,018	0,113	0,050
Verde limpio	Promedio	0,136	0,267	33,491	0,355	0,147	0,264	37,634	0,347	0,166	0,263	51,602	0,327
	CoV	0,065	0,043	0,114	0,049	0,050	0,036	0,137	0,039	0,041	0,029	0,155	0,042
Verde sucio	Promedio	0,152	0,265	36,120	0,341	0,155	0,264	37,676	0,340	0,170	0,264	47,174	0,324
	CoV	0,072	0,046	0,074	0,057	0,093	0,038	0,184	0,062	0,026	0,035	0,063	0,034
Verde vacío	Promedio	0,084	0,265	44,179	0,416	0,109	0,262	54,360	0,391	0,143	0,263	81,799	0,351
	CoV	0,172	0,065	0,138	0,053	0,051	0,050	0,098	0,054	0,069	0,040	0,109	0,063

4.2.2 **Micrografías de fragmentos de cáscaras de huevo.** En los cinco fragmentos de cáscara de huevo de criadero analizados, pertenecientes a *Anas platyrhynchos domesticus* (1) y *Gallus gallus domesticus* (4), se observaron las siguientes características: De manera general en todas las imágenes SEM se observó una morfología de la cáscara amorfa sin ninguna distribución homogénea definida. En la parte externa se aprecia una gran cantidad de poros o grietas cuya proporción y forma varía para cada una de las muestras (Figuras 4.8-4.12, parte A y C). Así mismo, las imágenes SEM de la parte interna de la cáscara permitieron observar la persistencia de algunos poros o grietas, que, a pesar de no encontrarse en la misma proporción que en la parte externa, se mantienen, atravesando toda la estructura de la cáscara (Figuras 4.8-4.12, parte B).

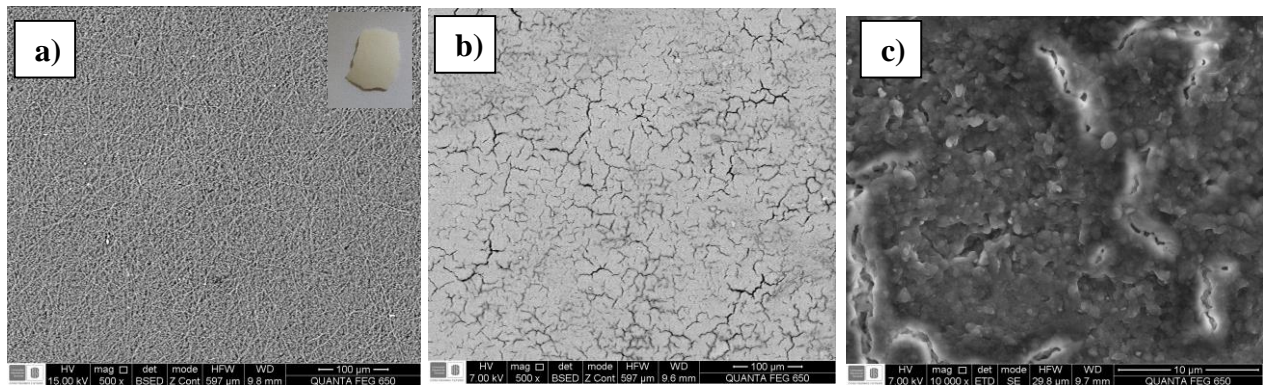


Figura 4.8 Micrografías SEM de la cáscara de *Anas platyrhynchos domesticus* (Huevo Blanco). a) 500x, b) 1000x, c) 5000x

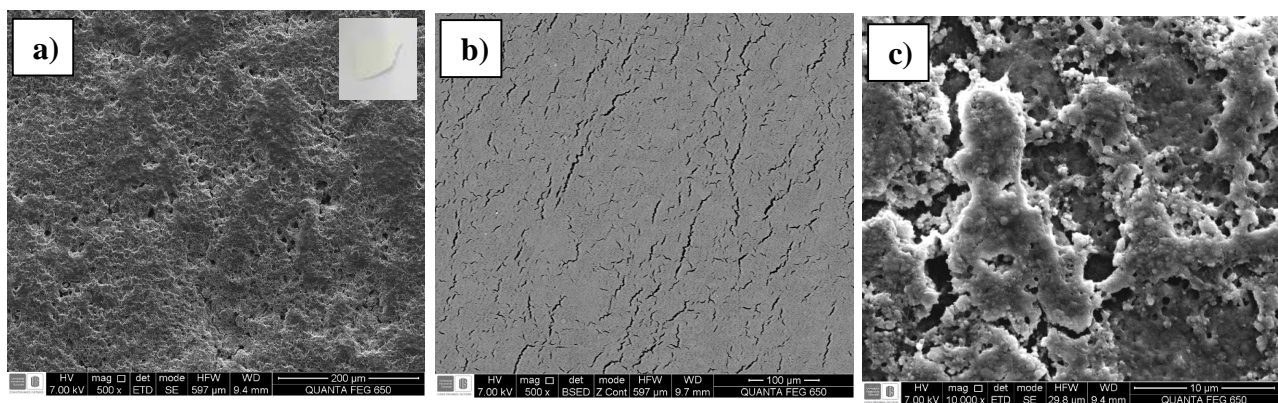


Figura 4.9 Micrografías SEM de cáscara de huevo de *Gallus gallus domesticus* (Huevo Blanco). a) 500x, b) 1000x, c) 5000x

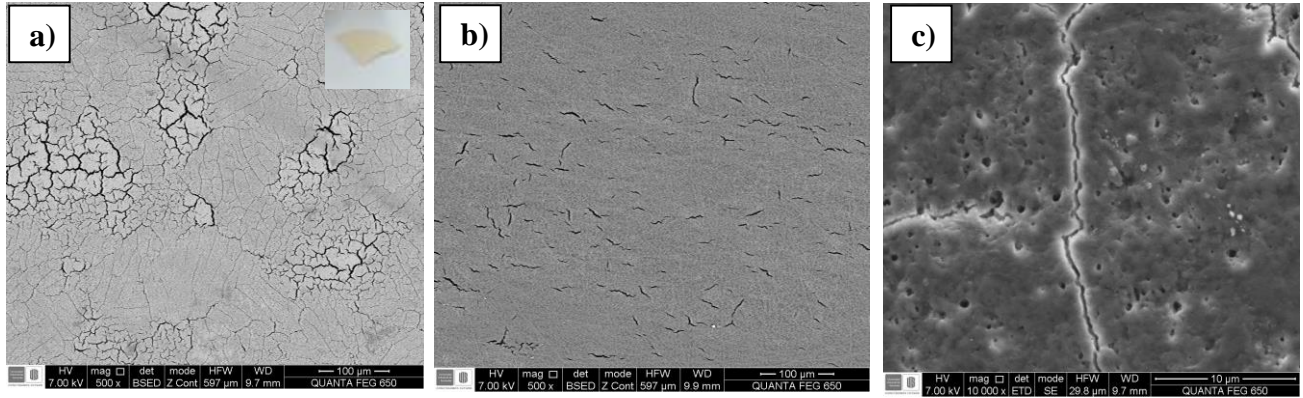


Figura 4.10 Micrografías SEM de cáscara de huevo de *Gallus gallus domesticus* (Huevo Crema). a) 500x, b) 1000x, c) 500x

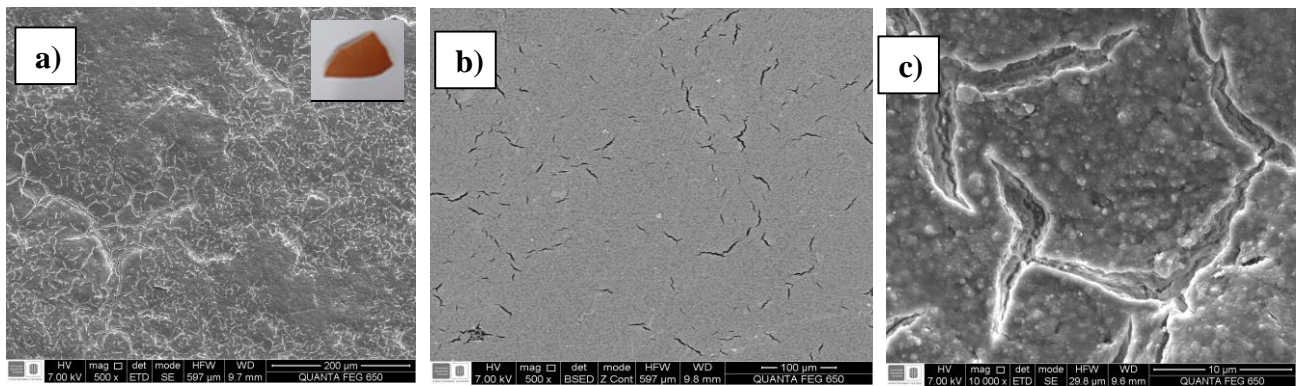


Figura 4.11 Micrografías SEM de cáscara de huevo de *Gallus gallus domesticus* (Huevo Marron). a) 500x, b) 1000x, c) 500x

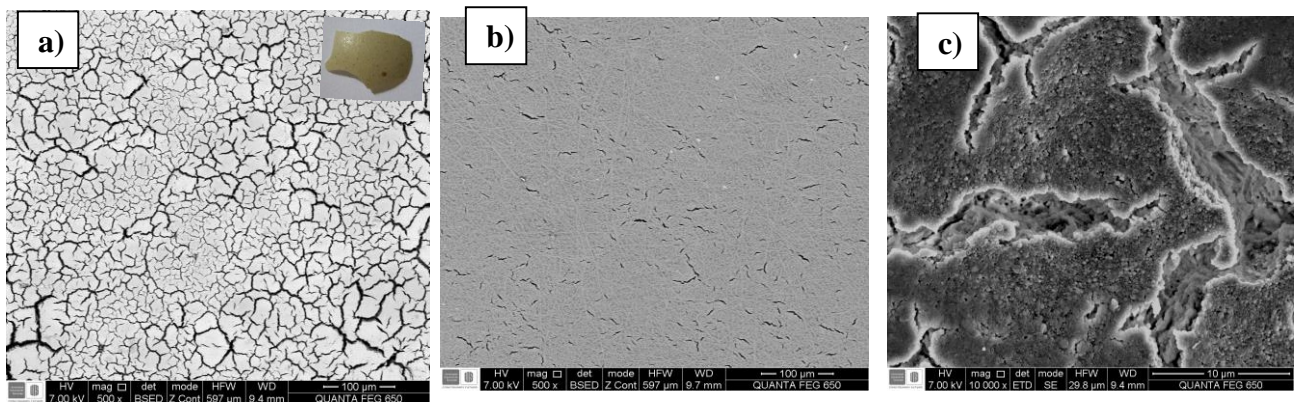


Figura 4.12 Micrografías SEM de cáscara de huevo de *Gallus gallus domesticus* (Huevo verde). a) 500x, b) 1000x, c) 500

4.3 Fase III: Evaluación del efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la medición del color para los huevos de colección. De manera general, se observaron variaciones en función del tiempo para los diferentes descriptores calculados, en las especies utilizadas. En este apartado solo se presentan los resultados de *Ploceus cucullatus cucullatus* y *Zonotrichia capensis*, por ser las muestras especies con una distribución temporal más corta y más larga respectivamente. Adicionalmente, se realizó una regresión lineal con el fin de encontrar una posible correlación entre el tiempo y cada uno de los descriptores (**Figuras 4.14a-d**).

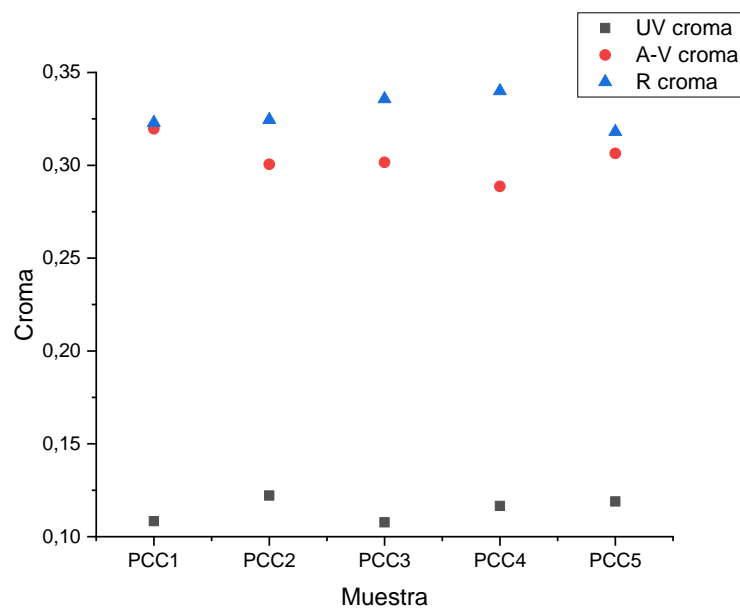


Figura 4.13 Diagrama de dispersión de los diferentes descriptores de coloración de las nidadas del género *Ploceus cucullatus cucullatus*, correspondientes a una distribución temporal de 1 año.

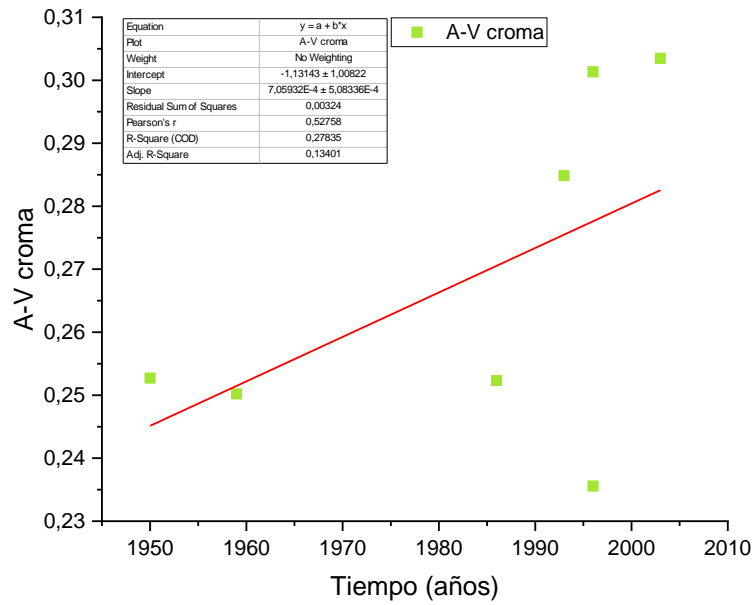


Figura 4.14 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración AV-Croma para cada año de colecta de los huevos del género *Zonotrichia capensis*.

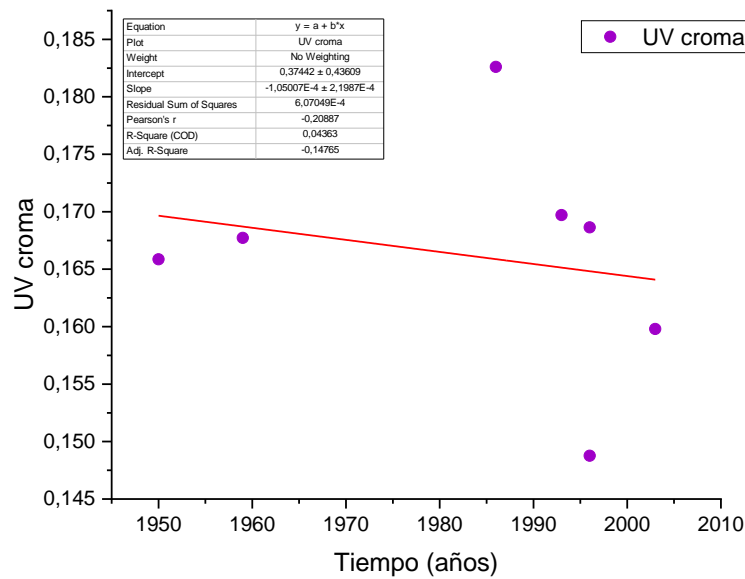


Figura 4.15 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración UV Croma para cada año de colecta de los huevos del género *Zonotrichia capensis*.

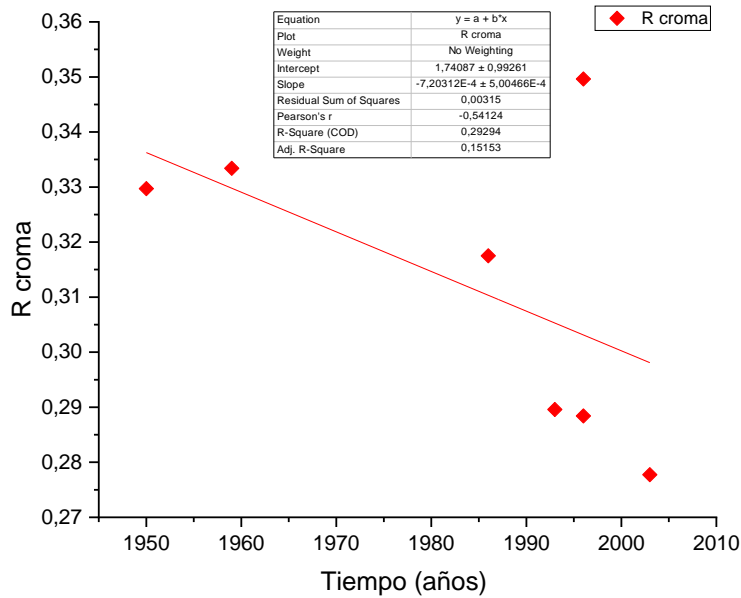


Figura 4.16 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración R Croma para cada año de colecta de los huevos del género *Zonotrichia capensis*.

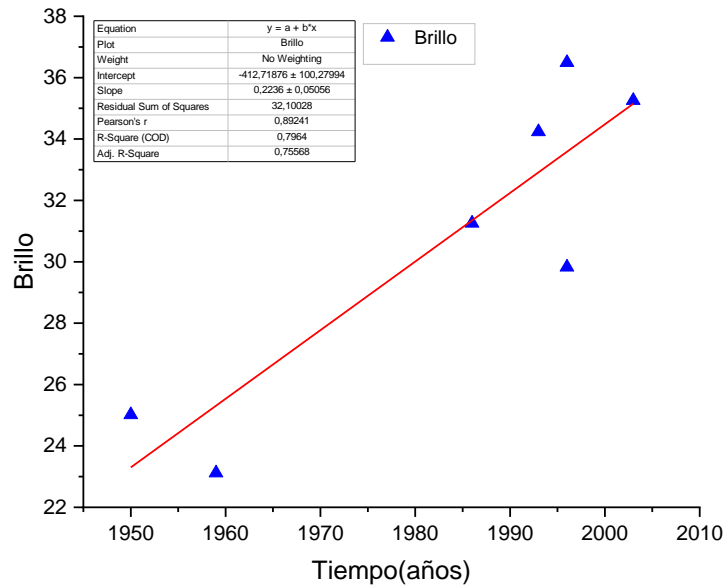


Figura 4.17 Diagrama de dispersión del descriptor de coloración Brillo para cada año de colecta de los huevos del género *Zonotrichia capensis*.

5. Discusión

5.1 Fase I: Configuración del montaje y equipo para toma de datos

La configuración final del sistema de posicionamiento de la muestra garantizó condiciones de repetibilidad en las mediciones de un patrón a diferentes ambientes de luz, debido a que se observó consistencia en las mediciones realizadas. Esto se relacionó con el diseño del sistema, el cual por un lado garantizó el aislamiento de la muestra de la luz ambiental (al tener la superficie externa con un recubrimiento que refleja la luz y la superficie interna con un recubrimiento basado en negro humo que la absorbe). Así mismo, permitió mantener fijas las condiciones de medición (distancia, ángulo y ubicación de la fibra respecto a la muestra).

Fue fundamental fijar las condiciones adecuadas para cada uno de estos parámetros, ya que se encontró una dependencia directa entre ellas y la calidad de los espectros obtenidos (relación señal ruido, la intensidad espectral). Debido a que los parámetros ópticos de ángulo (90°) y distancia porta sonda-fibra fueron los que brindaron mejores mediciones, lo cual se debió a que esta configuración minimizó la interacción de la luz con superficies propias del interior del porta fibra.

5.2 Variaciones asociadas a los espectros en los tres diferentes puntos del huevo (pm, Ecu, PM)

Las variaciones observadas inicialmente en los espectros mostrados en los resultados correspondientes a la evaluación del efecto de limpieza y preparación del huevo sobre su coloración (**ver Figuras 4.3-4.7**), se confirmaron mediante el cálculo de los descriptores en cada uno de los tres puntos (**Tabla 4.1**). El análisis de las variaciones solo se presentó para la nidada correspondiente al huevo blanco inmaculado de *Gallus gallus domesticus*, siendo este también válido para las demás nidadas, debido a que se observó en general la misma tendencia asociada a esta variación. Lo anterior, se aprecia en la tabla donde se registran los promedios de cada descriptor en cada punto medido para cada uno de los 5 huevos. La comparación se realizó tomando como referencia el brillo, ya que este descriptor abarca completamente la información espectral en todo el rango de medición (300-700 nm).

Inicialmente al observar los valores de brillo obtenidos en los pm y compararlos con los de PM, tanto para los huevos sucios como para los limpios y vacíos se observó un incremento. El brillo obtenido para los huevos limpios llenos fue de 60,43 para pm y 64,30 para PM, existiendo una diferencia de 3,87. Para la zona Ecu el brillo fue de 74.06 existiendo un incremento entre este con el pm y PM de 13.63 y 9.76 respectivamente. El mismo comportamiento se observa si se comparan los valores de brillo obtenidos para los huevos vacíos, encontrándose un incremento en el valor de Ecu que fue de 104.80 respecto al de pm y PM de 22.25 y 18.5 respectivamente.

Estas variaciones pueden ser explicadas al tenerse en cuenta la geometría convexa del cascaron del huevo en cada punto medido, principalmente en la curvatura, pues esta tiene una estrecha relación con la reflectancia medida en puntos con diferentes curvaturas (curvaturas elevadas en los polos y bajas para los puntos ecuatoriales). Desde el punto de vista óptico, para curvaturas altas la luz se dispersa en mayor medida en diferentes ángulos, recogiendo una menor cantidad de luz reflejada a través de la fibra óptica en los puntos pm, PM y una mayor cantidad de luz en los puntos ecuatoriales ya que este se aproxima más a una superficie plana (Hecht, 2002). En la **Figura 5.1** se ilustra el comportamiento de la luz en un espejo convexo y un espejo plano, lo cual es acorde con las variaciones observadas y discutidas anteriormente. Se ha encontrado que el paso de luz a través del cascaron tiene una implicación directa sobre el desarrollo del embrión, ayudándolo a ajustar su orientación correctamente y una protección antes de la eclosión.

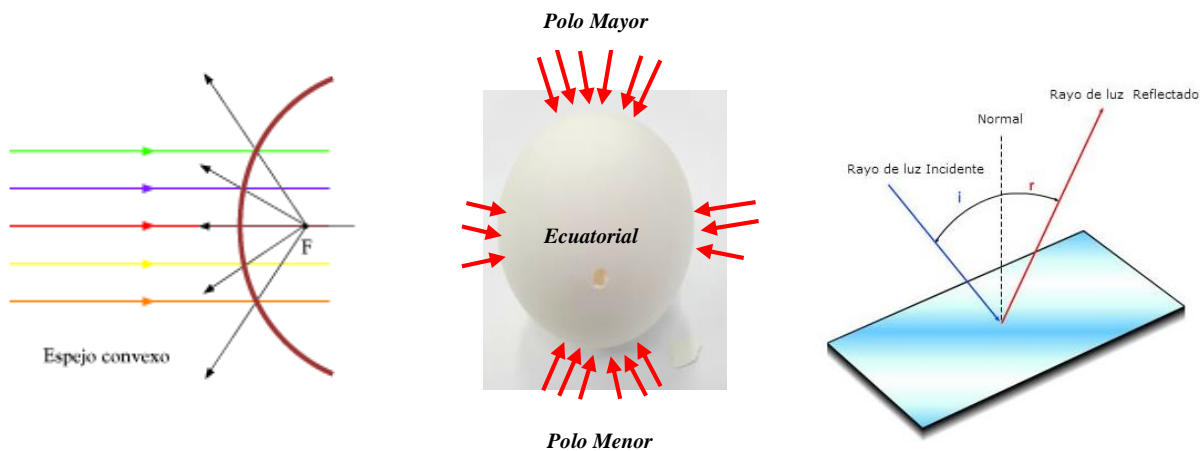


Figura 5.1 interacción de la luz en dos superficies diferentes: (a) en un espejo convexo y (c) en un espejo plano. Zonas del huevo donde se realizaron las mediciones de los espectros de reflectancia (b). Adaptado de Hecht, E. (2002). Optics. Addison-Wesley. Retrieved from <https://www.casadellibro.com/libro-optics-4th-ed/9780805385663/883254>

De acuerdo a lo anterior y observando los valores tanto de desviación estándar y coeficiente de variación registrados en la **Tabla 5.3** se decidió trabajar en los análisis posteriores con los espectros obtenidos en los puntos ecuatoriales, ya que estas mediciones fueron las que mejores CoV arrojaron, garantizándose así mejor repetibilidad en las mediciones.

5.3 Efecto de la limpieza y vaciado de los huevos

Como se mencionó con anterioridad (**apartado 5.3.3.1**), mediante una inspección visual de los espectros obtenidos antes y después del proceso de limpieza y vaciado, en general se observó una variación significativa, principalmente asociada al proceso de vaciado. Esto mismo se corroboró mediante la comparación de los descriptores resumidos en la **Tabla 4.1**, comparando específicamente el valor del brillo obtenido para los huevos sucios de la nidada correspondiente a gallina blanco immaculado (75,21), con el obtenido posterior a la limpieza de las mismas muestras (74,06), no se encontró una variación significativa (1,15), pero es importante resaltar que la causa de esta variación, es debida probablemente a factores como polvo, grasas, heces y cualquier otro que pueda causar una interferencia llegando a incrementar o disminuir la señal producto de la medición del huevo. Este incremento o disminución depende específicamente de las propiedades ópticas del material interferente.

Respecto a la variación generada por el proceso de vaciado, se encontró que esta fue mayor comparada con el proceso de limpieza, respecto a el valor del brillo para el huevo limpio y sin vaciar (74,06) y el brillo obtenido posterior al proceso de vaciado (104,80). Esto podría explicarse, al tenerse en cuenta que los cascarones de los huevos al no ser un material homogéneo probablemente permiten el paso de una fracción de la luz que incide sobre ellas a partir de las grietas que se pueden observar en las micrografías SEM (**Figuras 4.8-4.12**), la cual al pasar interactúa y es absorbida por el material orgánico que se encuentra en su interior (Mikhailov, 1997). Para el caso de los huevos vacíos, la luz que atraviesa el cascaron no encuentra un material que la absorba, por tanto, parte de esta se refleja en el interior del huevo, para posteriormente ser detectada.

Estos resultados apoyan el estudio realizado por Cassey y col. 2010 quienes realizaron una comparación con huevos de tres diferentes museos, encontrando variaciones en el brillo estas muestras, afirmando que probablemente dichas variaciones podrían atribuirse al almacenamiento y tratamiento de las muestras en el museo. Este estudio sugiere, que el brillo es muy susceptible a presentar diferencias relacionadas con las condiciones de manipulación y preparación, por lo que al momento de realizasen estudios comparativos que involucren huevos de museo y frescos, se debe tener especial cuidado de esta variación.

Los valores de los descriptores del color encontrados para los huevos preparados mostraron una disminución en el UV croma. Este comportamiento se reflejó en todos, a excepción del crema oscuro, en el cual incremento. Para el croma A-V los huevos verdes y blancos immaculados, no presentaron una variación significativa, a diferencia de la crema claro en donde se apreció una disminución y en los marrones y blanco (pato) un incremento. Finalmente, el R croma mostro un incremento para todos excepto el marrón, donde se observó una disminución para este descriptor.

De la misma manera que se discutió para el brillo, lo anterior, está directamente relacionado con la preparación del huevo. Además de esto, probablemente tanto la estructura y pigmentación propia del cascaron, contribuyen de forma diferente en los valores de reflectancia.

5.4 Efecto del tiempo de almacenamiento sobre la coloración de huevos de colección

La finalidad de las regresiones lineales realizadas, fue evidenciar la tendencia en los datos obtenidos para la evaluación del efecto del tiempo sobre a coloración de los huevos de colección y mediante el cálculo de la pendiente la cual representa el efecto del tiempo (para una pendiente igual a cero se asociaría con una falta de efecto en la coloración y en el caso contrario, pendientes con valores mayores a cero se relaciona con un efecto del tiempo). El valor de la pendiente del ajuste representa el grado de variación en la coloración de cada descriptor, siendo el valor de cero la existencia de ninguna variación, y valores mayores de cero a presencia de variación. Así mismo, el grado de dispersión nos evidencia el efecto de otros factores responsables de la variación.

Al observarse la tendencia de los datos en la **Figura 4.17** se pudo deducir la disminución del brillo de estas muestras en función del tiempo de almacenamiento. Así mismo, sucedió para el A-V croma como se puede apreciar a partir de la **Figuras 4.14** y se de manera contraria se dio un aumento en el R croma **Figura 4.16**. Esto, es consistente debido a que la disminución en el croma azul verde se debe a una disminución en la concentración pigmentaria atribuida a este croma, lo cual implica un incremento en el R croma. Referente al UV croma (**Figura 4.15**), no se encontró una variación respecto al tiempo.

Finalmente, es necesario mencionar que estas variaciones no dependen únicamente del tiempo de almacenamiento, puesto que a partir de la **Figura 4.13** se pudo mostrar que existen variaciones que son independientes de este, las cuales probablemente son el resultado de otros factores que afectan la coloración del huevo durante el tiempo de almacenamiento (presencia de hongos, manipulación de la muestra, etc.) y que deberían ser tenidas en cuenta para este tipo de estudios.

6. Conclusiones

Los ajustes metodológicos a partir del diseño de la estructura porta muestra, así como el establecer las condiciones de adquisición de los espectros, permitió garantizar unos parámetros de medida apropiados para huevos, ya que se demostró un adecuado aislamiento de la muestra al evitar cualquier filtración de luz ambiental, permitiendo así la repetibilidad en las mediciones.

Mediante el uso de los descriptores del color se logró mostrar el efecto del tratamiento de los huevos sobre la medición del color, encontrándose que la preparación para su preservación proporciona una variación en la intensidad de cada uno de ellos, de cual permite afirmar que es poco conveniente hacer estudios comparativos entre muestras de mueso y muestras frescas.

Se determinó que el tiempo de almacenamiento tiene un efecto sobre las medidas de los descriptores del color y a su vez se corroboró que existen otros factores que causan variaciones en estas mediciones.

7. Recomendaciones

Para obtener mejores resultados en este tipo de estudios se recomienda tener muy en cuenta la geometría esférica del huevo y sus implicaciones en el comportamiento de la luz reflejada, ya que en el presente trabajo pudo observarse la dependencia directa con las mediciones realizadas.

Se recomienda realizar un estudio más a profundidad de la dependencia de los descriptores de coloración con los factores (morfología, composición) que puedan estar implicados en las variaciones observadas con el hecho de evitar medir lo incorrecto o medir lo correcto en el camino equivocado

Referencias bibliográficas

- Abernathy, V. E., & Peer, B. D. (2014). Intraclutch variation in egg appearance of Brown-headed Cowbird hosts. *The Auk*, *131*(4), 467–475. <https://doi.org/10.1642/AUK-12-186-R1.1>
- Aya-Ramírez, O., Mejía, E., Cabanzo, R., Fonseca, J., & Padilla, D. (2002). Espectroscopía de emisión ICP en materiales de interés tecnológico: carbón. *Revista Colombiana de Física*, *34*(1), 201.
- Barreira, A. S., García, N. C., Loughheed, S. C., & Tubaro, P. L. (2016). Viewing geometry affects sexual dichromatism and conspicuousness of noniridescent plumage of Swallow Tanagers (*Tersina viridis*). *The Auk*, *133*(3), 530–543. <https://doi.org/10.1642/AUK-15-170.1>
- Birchard, G. F., & Deeming, D. C. (2009). Avian eggshell thickness: Scaling and maximum body mass in birds. *Journal of Zoology*, *279*(1), 95–101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2009.00596.x>
- Calderone, G., Guillou, C., Reniero, F., & Naulet, N. (2007). Helping to authenticate sparkling drinks with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ of CO_2 by gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Food Research International*, *Vol.*,*40*, 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.001>
- Cassey, P., Ewen, J. G., Blackburn, T. M., Hauber, M. E., Vorobyev, M., & Marshall, N. J. (2008). Eggshell colour does not predict measures of maternal investment in eggs of Turdus thrushes. *Naturwissenschaften*, *95*(8), 713–721. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0376-x>
- Cassey, P., Ewen, J. G., Marshall, N. J., Vorobyev, M., Blackburn, T. M., & Hauber, M. E. (2009). Are avian eggshell colours effective intraspecific communication signals in the Muscicapoidea? A perceptual modelling approach. *Ibis*, *151*(4), 689–698. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2009.00953.x>
- Cassey, P., Hauber, M. E., Maurer, G., & Ewen, J. G. (2012). Sources of variation in reflectance spectrophotometric data: A quantitative analysis using avian eggshell colours. *Methods in Ecology and Evolution*, *3*(2), 450–456. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00152.x>
- Cassey, P., Maurer, G., Duval, C., Ewen, J. G., & Hauber, M. E. (2010). Impact of time since collection on avian eggshell color: A comparison of museum and fresh egg specimens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *64*(10), 1711–1720. <https://doi.org/10.1007/s00265->

010-1027-8

- G Stokke, B., Moksnes, A., & Roskaft, E. (2002). *Obligate brood parasites as selective agents for evolution of egg appearance in passerine birds*. *BRIEF COMMUNICATIONS Evolution* (Vol. 56). Retrieved from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00861.x>
- Green, R. (1998). Long-term decline in the thickness of eggshells of thrushes, *Turdus* spp., in Britain. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1397), 679–684. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0347>
- Hanley, D. (2012, January 1). *The function and evolution of egg colour in birds*. *Electronic Theses and Dissertations*. Retrieved from <https://scholar.uwindsor.ca/etd/382>
- Hanley, D., Stoddard, M. C., Cassey, P., & Brennan, P. L. R. (2013). Eggshell conspicuousness in ground nesting birds: Do conspicuous eggshells signal nest location to conspecifics? *Avian Biology Research*, 6(2), 147–156. <https://doi.org/10.3184/175815513X13617279883973>
- Hargitai, R., Nagy, G., Herényi, M., Nyiri, Z., Laczi, M., Hegyi, G., ... Török, J. (2016). Darker eggshell spotting indicates lower yolk antioxidant level and poorer female quality in the Eurasian Great Tit (*Parus major*). *The Auk*, 133(2), 131–146. <https://doi.org/10.1642/AUK-15-128.1>
- Hecht, E. (2002). *Optics*. Addison-Wesley. Retrieved from <https://www.casadellibro.com/libro-optics-4th-ed/9780805385663/883254>
- Igic, B., Fechey-Lippens, D., Xiao, M., Chan, A., Hanley, D., Brennan, P. R. L., ... Shawkey, M. D. (2015). A nanostructural basis for gloss of avian eggshells. *Journal of the Royal Society Interface*, 12(103), 20141210. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.1210>
- Igic, B., Greenwood, D. R., Palmer, D. J., Cassey, P., Gill, B. J., Grim, T., ... Hauber, M. E. (2010). Detecting pigments from colourful eggshells of extinct birds. *Chemoecology*, 20(1), 43–48. <https://doi.org/10.1007/s00049-009-0038-2>
- J. McGraw, K. (2006). *Bird coloration*. *Bird coloration* (Vol. 1). Harvard University Press. Retrieved from [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WnJ8cSoXRMIC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Montgomerie+R+\(2006\)+Analyzing+colors.+In:+Hill+GE,+McGraw+KJ+\(eds\)+Bird+coloration:+mechanisms+and+measurements.+Harvard+University+Press,+Harvard&ots=VVkM3Wxh7i&sig=LVJL5PVpDOLnJI2](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WnJ8cSoXRMIC&oi=fnd&pg=PR7&dq=Montgomerie+R+(2006)+Analyzing+colors.+In:+Hill+GE,+McGraw+KJ+(eds)+Bird+coloration:+mechanisms+and+measurements.+Harvard+University+Press,+Harvard&ots=VVkM3Wxh7i&sig=LVJL5PVpDOLnJI2)

- Kilner, R. M. (2006). The evolution of egg colour and patterning in birds. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. <https://doi.org/10.1017/S1464793106007044>
- Krist, M., & Grim, T. (2007). Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers? A cross-fostering experiment. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61(6), 863–876. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0315-9>
- Maurer, G., Portugal, S. J., Hauber, M. E., Mikšík, I., Russell, D. G. D., & Cassey, P. (2015). First light for avian embryos: Eggshell thickness and pigmentation mediate variation in development and UV exposure in wild bird eggs. *Functional Ecology*, 29(2), 209–218. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12314>
- McNett K. Marchetti, G. D. (2005). Ultraviolet degradation in carotenoid patches: live versus museum specimens of wood warblers: (Parulidae). *The Auk*, 122(3), 793–802. <https://doi.org/10.2307/4090586>
- Merilaita, S., & Lind, J. (2005). Background-matching and disruptive coloration, and the evolution of cryptic coloration. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1563), 665–670. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3000>
- Mikhailov, K. E. (1997). *Avian eggshells: an atlas of scanning electron micrographs*. BOC Occasional Publications (Vol. 3). <https://doi.org/10.1002/advs.201500205>
- Moksnes, A., & ØSkaft, E. r. (1995). Egg-morphs and host preference in the common cuckoo (*Cuculus canorus*): an analysis of cuckoo and host eggs from European museum collections. *Journal of Zoology*, 236(4), 625–648. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1995.tb02736.x>
- Moreno, J., & Osorno, J. L. (2003). Avian egg colour and sexual selection: Does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters*. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00505.x>
- Pyke, G. H., & Ehrlich, P. R. (2010). Biological collections and ecological/environmental research: A review, some observations and a look to the future. *Biological Reviews*, 85(2), 247–266. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2009.00098.x>
- Remsen, J. V. (1995). The importance of continued collecting of bird specimens to ornithology and bird conservation. *Bird Conservation International*, 5(2–3), 146–180. <https://doi.org/10.1017/S095927090000099X>
- Scharlemann, J. P. W., & Green, R. E. (2003). Egg and skin collections as a resource for long-term ecological studies. *Bulletin-British Ornithologists Club*, 123, 165–176. Retrieved from

https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/44857190/124GreenEggAndSkin.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1539540358&Signature=hGAlMNIxgLBCKpXTN7UQSyYZ2c%3D&response-content-disposition=inline%3Bfilename%3DEgg_and_skin_collections_as_a

- Soler, J. J., Moreno, J., Avilés, J. M., & Møller, A. P. (2005). Blue and green egg-color intensity is associated with parental effort and mating system in passerines: support for the sexual selection hypothesis. *Evolution*, *59*(3), 636. <https://doi.org/10.1554/04-159>
- Soler, J. J., Navarro, C., Contreras, T. P., Avilés, J. M., & Cuervo, J. J. (2008). Sexually Selected Egg Coloration in Spotless Starlings. *The American Naturalist*, *171*(2), 183–194. <https://doi.org/10.1086/524958>
- Stoddard, M. C., & Stevens, M. (2010). Pattern mimicry of host eggs by the common cuckoo, as seen through a bird's eye. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *277*(1686), 1387–1393. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2018>
- Suarez, A. V., & Tsutsui, N. D. (2004). The Value of Museum Collections for Research and Society. *BioScience*, *54*(1), 66. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0066:TVOMCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0066:TVOMCF]2.0.CO;2)
- Takasu, F., Moskát, C., Muñoz, A. R., Imanishi, S., & Nakamura, H. (2009). Adaptations in the common cuckoo (*Cuculus canorus*) to host eggs in a multiple-hosts system of brood parasitism. *Biological Journal of the Linnean Society*, *98*(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01288.x>
- Thomas, D. B., Hauber, M. E., Hanley, D., Waterhouse, G. I. N., Fraser, S., & Gordon, K. C. (2015). Analysing avian eggshell pigments with Raman spectroscopy. *Journal of Experimental Biology*, *218*(17), 2670–2674. <https://doi.org/10.1242/jeb.124917>
- Yang, C., Wang, L., Hsu, Y. C., Antonov, A., Moksnes, A., Røskaft, E., ... Stokke, B. G. (2013). UV reflectance as a cue in egg discrimination in two *Prinia* species exploited differently by brood parasites in Taiwan. *Ibis*, *155*(3), 571–575. <https://doi.org/10.1111/ibi.12043>

Apéndices

Apéndice A. Espectrofotómetro

En este apartado se presenta una descripción de cada uno de los componentes del equipo utilizado y su respectiva imagen:

Espectrómetro AvaSpec-ULS2048L

Este equipo posee un detector (CCD) de 2048 pixeles dotado con una lente de colección, delante del detector, para mejorar la sensibilidad en el rango de 200-1100 nm. Un filtro eliminador de órdenes superiores de dispersión que evita la superposición de los órdenes en el espectro registrado. La conexión al computador se realiza a través de puerto USB2. El tiempo de integración puede ser tan corto como 1.11 milisegundo hasta un máximo de 10 minutos (Figura1).

Fuente de luz AvaLight-DHc

Este equipo consta de tres fuentes: Deuterio para el rango Ultravioleta – UV (200-400nm). Halógena - Deuterio, para el rango UV y Visible (400-750nm) y Halógena para el rango Visible – cercano infrarrojo (400-1100nm). Debido al rango espectral de interés para este estudio, se utilizó la lámpara combinada Deuterio – Halógena. Ver Figura 2.

Fibra óptica bifurcada

La fibra óptica bifurcada permite que uno de los extremos se conecte a la fuente de radiación (se iluminan las fibras externas) y la luz reflejada se recoge a través de la fibra central, la cual se conecta a la entrada del espectrógrafo. La Figura 4 muestra la fibra total, el extremo que se utiliza para irradiar la muestra y el patrón de iluminación y recolección que se genera en la muestra.

Soporte para fibra óptica de reflectancia

Se tienen dos soportes diferentes. El soporte de color negro ((a) y (c) en la figura 3) permite que la muestra sea irradiada con ángulo de incidencia de 90° (perpendicular) o incidencia de la iluminación a 45°. Adicionalmente, se construyó un soporte en bronce ((b) en la figura 3) que permite iluminar la muestra con ángulo de 90°. Los soportes poseen un tornillo lateral con el fin de ajustar la distancia muestra-fibra. Esta distancia debe mantenerse constante durante todo el proceso de adquisición de los espectros.

Bloque de Sulfato de Bario (BaSO₄)

La espectroscopía de reflectancia es una técnica que realiza la comparación entre dos espectros: un espectro de referencia, para lo cual se puede utilizar el sulfato de bario y el espectro obtenido al iluminar la muestra, es decir,

$$\%R = \frac{I_s}{I_0} \times 100 \text{ (Ecuación 3.4)}$$

Donde %R es la reflectancia expresada en porcentaje, I_s es la radiación reflejada por la muestra e I_0 es la radiación reflejada por la referencia. La figura 5 muestra el patrón de sulfato de bario utilizado como referencia.



Figura A1. Espectrómetro AvaSpec-ULS2048L



Figura A2. Fuente de luz AvaLight-DHc

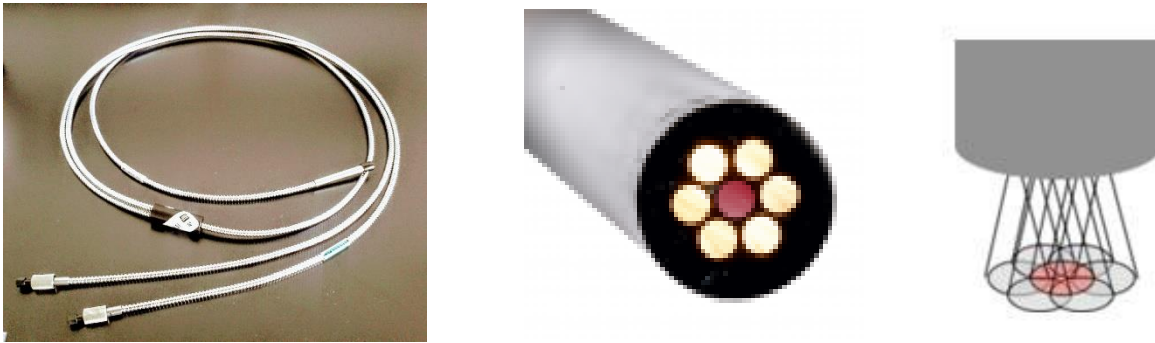


Figura A3. (A) Fibra óptica bifurcada para reflectancia. (B) Imagen del extremo de la fibra para irradiar la muestra y (C) patrón de iluminación generado por la fibra óptica

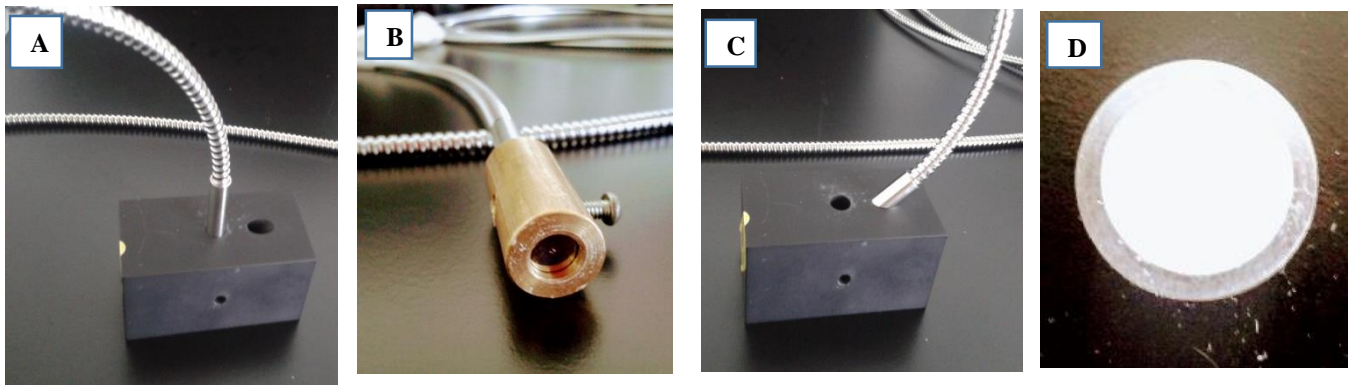


Figura A4. Porta-fibra irradiar con diferente ángulo de incidencia: (A) y (B) 90°, (C) 45°

Apéndice B.

Datos muestras de museo

Tabla A4.1.

Número de acceso e información de apoyo de muestras empleadas de la colección oológica del IAvH.

Nombre de la Colección	Numero de Colector	Especie	Fecha de colecta (A-M-D)	País	Ciudad/Territorio
IAvH-CJM	CJM-4143	Ploceus cucullatus collaris	1952-01-04	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4342	Ploceus cucullatus collaris	1953-01-06	Congo	Kolwezi Ht. Katanga

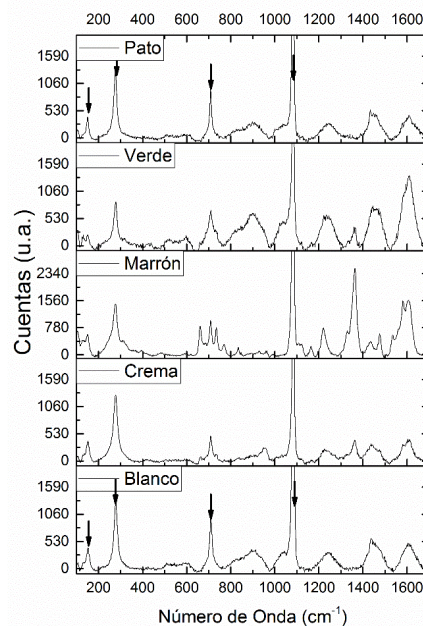
IAvH-CJM	CJM-4135	<i>Ploceus cucullatus collaris</i>	1952-01-02	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4531	<i>Ploceus cucullatus collaris</i>	1952-01-04	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4534	<i>Ploceus cucullatus collaris</i>	1955-09-01	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4537	<i>Ploceus cucullatus collaris</i>	1955-10	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4538	<i>Ploceus cucullatus collaris</i>	1954-08-04	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3412	<i>Ploceus cucullatus cucullatus</i>	1943-19	Gambia	Kombo
IAvH-CJM	CJM-3334	<i>Ploceus cucullatus cucullatus</i>	1943-19	Gambia	Kombo
IAvH-CJM	CJM-3385	<i>Ploceus cucullatus cucullatus</i>	1943-19	Gambia	Kombo
IAvH-CJM	CJM-3382	<i>Ploceus cucullatus cucullatus</i>	1943-19	Gambia	Kombo
IAvH-CJM	CJM-3346	<i>Ploceus cucullatus cucullatus</i>	1942-19	Gambia	Kombo
IAvH-CJM	CJM-3405	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3362	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1951-02-10	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4251	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4207	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4197	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3364	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3368	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM- 3409	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3342	<i>Ploceus cucullatus bohndorffi</i>	1950-10-05	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-4290	<i>Ploceus cucullatus</i>	1951-08-13	Congo	Kolwezi Ht. Katanga
IAvH-CJM	CJM-3338	<i>Ploceus cucullatus</i>	1926-03-04	Uganda	-
IAvH-CJM	CJM-3335	<i>Ploceus cucullatus</i>	1952-12-01	South Rhodesia	-
IAvH-CJM	CJM-3339	<i>Ploceus cucullatus</i>	1924-07-21	Camerun	-
IAvH-CJM	CJM-3357	<i>Ploceus cucullatus</i>	1924-07-21	Camerun	-
IAvH-CJM	CJM-3345	<i>Ploceus cucullatus</i>	1899-11-21	Natal	-
IAvH-CJM	CJM-3789	<i>Zonotrichia capensis</i>	1996-02-02	Colombia	Bogotá
IAvH-CJM	CJM-4618	<i>Zonotrichia capensis</i>	2003-10-06	Colombia	Villa de Leyva
IAvH-CJM	CJM-4586	<i>Zonotrichia capensis</i>	2002-10-15	Colombia	Villa de Leyva
IAvH-CJM	CJM-3794	<i>Zonotrichia costaricensis</i>	1999-05-30	Colombia	Cundinamarca
IAvH-CJM	CJM-4597	<i>Zonotrichia capensis</i>	2003-06	Colombia	Villa de Leyva, claustro San Agustin
IAvH-CJM	CJM-4103	<i>Zonotrichia capensis</i>	1996-06-12	Colombia	Bogotá
IAvH-CJM	CJM-4116	<i>Zonotrichia capensis</i>	1996-04-07	Colombia	Bogotá

Apéndice C

4.2.1 Espectroscopía Raman

Se analizaron fragmentos de cáscara de huevo de los 5 especímenes de criadero: pollo doméstico (*Gallus gallus*, cuatro fragmentos), pato doméstico (*Anas platyrhynchos*, un fragmento). Todas las mediciones se realizaron en un microscopio Confocal Raman Horiba Scientific LabRam HR Evolution en un rango de números de onda entre 100-1700 cm^{-1} . La señal del espectro Raman fue medida en un área aproximada de X (0.05 mm^2) utilizando un láser de 473 nm a una potencia de X (0.5 mW), a una resolución de 4 cm^{-1} . Cada análisis fue la adición conjunta de 10 barridos a exposiciones de 5 s cada uno. Los análisis se realizaron utilizando un objetivo de 100 \times (Olympus Corporation, Shinjuku-ku, Tokio, Japón), proporcionando un tamaño de punto analítico de aproximadamente 2 μm de diámetro. La recopilación de datos fue controlada por el software OPUS 6.5 (Bruker) Optik, Ettlingen, Alemania).

Figura A.4.3.4. Espectros raman



Apéndice D

Tabla 4.2 Espectroscopía de Plasma Inducido por Laser (LIBS)

Componentes espectroscópicos LIBS	
Anchura de la rendija	5 μ
Espectrómetro	Tipo Czerny–Turner (Andor Technology, Shamrock SR-500i)
Rejilla de difracción	1200 (grooves/mm)
Detector	Cámara tipo intensified charge-coupled device (ICCD);
Rango de longitud de onda de trabajo	160-1600 (nm)
Retardo	1,5 μ s
Pulsos	2
Temperatura del detector	-10 °C

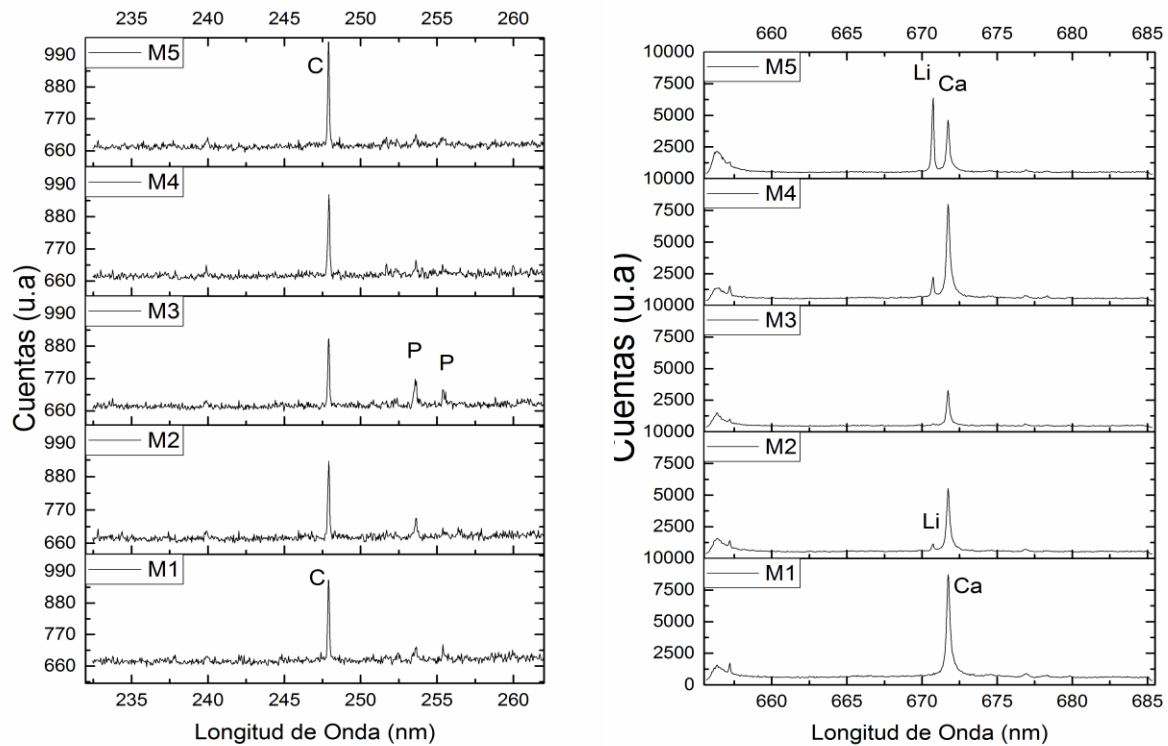


Figura A.4.3.4. Ventanas espectrales correspondientes al Carbono (C) y Litio (Li) de las muestras en estudio