

## Cromatografía circular Pfeiffer en suelo tratado con altas diluciones dinamizadas

Sérgio Domingues<sup>1§</sup>

Pedro Boff<sup>2</sup>

Mari Inês Carissimi Boff<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad del Estado de Santa Catarina-UDESC, SC. Av. Luiz de Camões 2090, Conta Dinheiro, Lages-SC. 88520-000. <sup>2</sup>Empresa de Investigación y Extensión Rural Agropecuaria de Santa Catarina, Epagri. Rua João José Godinho s/n, Morro do Posto, Lages-SC. 88502-970. (boff.pedro@yahoo.com.br). <sup>3</sup>Universidad del Estado de Santa Catarina-UDESC, SC. Av. Luiz de Camões, 2090-Conta Dinheiro, Lages-SC. 88520-000. (mari.boff@udesc.br).

§Autor para correspondencia: sergiodomingues27@gmail.com.

### Resumen

El potencial productivo de un suelo se puede estimar mediante indicadores de propiedades, procesos o características físicas, químicas y biológicas que pueden reflejar su nivel de apoyo en el cultivo y desarrollo de plantas. Las adaptaciones de Ehrenfried Pfeiffer (1899-1961) al trabajo desarrollado en biodinámica por Kolisko y Kolisko (1939), dieron lugar a la cromatografía circular de Pfeiffer (CCP), para analizar la calidad de suelos. La digitalización de los cromatogramas otorga mayor confiabilidad a la técnica al permitir la correlación de las propiedades del suelo por su nivel de organización y puede correlacionarse con calidad/salud. Las altas diluciones dinamizadas y la homeopatía están reguladas en la producción orgánica en Brasil y han mostrado excelentes resultados en la agricultura mundial. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios que ocurren en suelos tratados con altas diluciones dinamizadas mediante estadísticas de CCP para verificar las alteraciones en los cromatogramas. El experimento se realizó en Fraiburgo, SC, Brasil. Se obtuvieron muestras de suelo en área de conservación a una profundidad de 15 cm. Las diluciones altamente dinamizadas se obtuvieron en el laboratorio de Homeopatía y Sanidad Vegetal de Lages/Epagri. Se usó el diseño de bloques completos al azar, cada tratamiento originó 10 bloques, un recipiente de cada tratamiento, en cada recipiente se realizaron tres submuestras, 30 cromatogramas por tratamiento. Los tratamientos fueron: i) agua destilada; ii) alcohol etílico al 30%; iii) *Calcareo carbonica* 30CH; iv) *Silicea terra* 30CH. El diseño fue en bloques al azar. Se demostró que la entropía es la variable eficaz en el análisis digitalizado de cromatografía CCP mediante los algoritmos (14 en total) presente en el complemento ImageJ Texture Analyzer. *Calcareo carbonica* 30CH y *Silicea terra* 30CH tuvieron los valores más altos de MZ (middle zone ou zona media), mientras que *Silicea terra* 30CH fue significativamente superior a los tratamientos.

**Palabras clave:** *Calcareo carbonica*, *Silicea terra*, agroecología.

Recibido: julio de 2022

Aceptado: octubre de 2022

## Introducción

El potencial productivo de un suelo se puede estimar mediante indicadores de propiedades, procesos o características físicas, químicas y biológicas que pueden reflejar su nivel de apoyo en el cultivo y desarrollo de las plantas (Heger *et al.*, 2012). Sin embargo, Ehrenfried Pfeiffer 1899-1961, al proponer la cromatografía circular de suelos, argumentó que la fertilidad de un suelo es su propio vitalismo y los métodos adecuados para estimar el nivel de organización son los más fieles para reflejar el estado de salud/calidad y su idoneidad para los cultivos de plantas en los que se pretende realizar (Pfeiffer, 1984).

La cromatografía circular se utilizó inicialmente en el análisis químico, Krishnamurthy y Swaminathan (1955). Según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), la cromatografía es un método de separación en componentes que se distribuirán entre dos fases, una de las cuales es estacionaria mientras que la otra se mueve en una dirección definida (IUPAC, 1997). Las adaptaciones de Ehrenfried Pfeiffer 1899-1961 dieron lugar a la prueba conocida como cromatografía circular de Pfeiffer (CCP), que se utiliza para analizar la calidad de suelos, abonos y productos agrícolas (Pfeiffer, 1984).

Kolisko y Kolisko (1939) del Goetheanum Biological Institute (Stuttgart), propusieron la dinamólisis capilar como herramienta para evaluar los patrones formados en las imágenes. En la dinamólisis capilar las imágenes se forman por capilaridad. Es perfectamente posible relacionar CCP con la dinamólisis capilar de Kolisko y Kolisko, ya que ambos estuvieron fuertemente influenciados por el pensamiento de Rudolf Steiner y su agricultura biodinámica propuesta (Kolisko y Kolisko, 1939; Pfeiffer, 1984).

Pfeiffer (1984) propuso que hay tres zonas principales del CCP y el ancho de las zonas exterior e intermedia reflejaría las cantidades de materia orgánica en las muestras. De esta manera, CCP puede proporcionar a los agricultores un indicador instantáneo de biomasa que refleja la actividad biológica y la salud del suelo. Los trabajos demuestran que la propuesta de CCP ha sido desarrollada y utilizada en prácticas de agricultura biodinámica y orgánica en varias partes del mundo y ha guiado a los agricultores en el manejo ecológico de los suelos (Fritz *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2019; Fritz *et al.*, 2020).

Un problema que encuentran los agricultores que utilizan CCP para evaluar la salud del suelo es la dificultad de interpretar los estándares cromatográficos con el nivel de fertilidad (Kokornaczyk *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2018). Aunque el procedimiento para obtener cromatogramas ha sido bien descrito desde Pfeiffer (1984), aún no se ha presentado un procedimiento robusto y estandarizado para la interpretación generalizada (Khemani *et al.*, 2008).

Restrepo y Pinheiro (2011) han desarrollado un intento de proporcionar patrones que reflejen los suelos de América del Sur. Sin embargo, la propuesta se limita a una interpretación cualitativa con dificultad para relacionar qué nivel podría estar el suelo por debajo o más allá de la fertilidad óptima. Donde se evalúa mejor el suelo, al presentar patrones y armonía entre las zonas, este método presenta dificultades para relacionar el nivel de fertilidad nutricional en el que se encuentra el suelo. Incluso los investigadores de suelos admiten que todavía existen limitaciones a la técnica CCP y se necesitan varios estudios para que la técnica se establezca universalmente (Pfeiffer, 1984, Khemani *et al.*, 2008; Kokornaczyk *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2017; Saavedra *et al.*, 2018).

Según Saavedra *et al.* (2018) los colores del cromatograma son sensibles a cambios en la carga de nutrientes, especialmente nitrógeno y en la salud general del suelo y sus estudios muestran que esto se refleja en las diversas prácticas de uso. Se informó que los cambios en los cromatogramas reflejan cambios en las relaciones entre microbiología, materia orgánica y minerales, aunque los resultados presentados fueron descriptivos más que cuantitativos. Pilon *et al.* (2018) propuso una guía práctica, donde la presencia de características como patrones, colores y zonas en el cromograma indican calidad mientras que la ausencia califica la inferioridad del contenido analizado.

Estos autores informaron una fuerte correlación entre los patrones cromatográficos y el contenido de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo asimilable y niveles de bromo. Concluyeron que un fuerte desarrollo de características radiales, como canales y puntas, era indicativo de suelos más saludables, mientras que las características concéntricas eran indicativas de suelos más pobres (Kokornaczyk *et al.*, 2017). Los estudios llevados a cabo por (Khemani *et al.*, 2008) parecen apuntar a la confiabilidad de la técnica al digitalizar los cromatogramas, con análisis de imágenes y correlación de las propiedades del suelo por su nivel de organización.

Perumal *et al.* (2016) correlacionaron los índices de nutrientes del suelo con una base de datos de imágenes cromatográficas de 164 muestras de suelo. No se ha documentado sobre la compatibilidad de la CCP con las diluciones dinámicas. Las diluciones de alta dinámica están reguladas para su uso en la producción orgánica en Brasil y han mostrado excelentes resultados en la agricultura (Andrade y Casali, 2011; Brasil, 2014). Se ha demostrado que *Arnica montana* 30CH y *Calendula officinalis* 30CH promueven el crecimiento y un mayor peso fresco en plantas de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) después de una poda drástica (Domingues *et al.*, 2019). Se ha demostrado que reemplazar los pesticidas con tratamientos homeopáticos mejora el rendimiento de la planta de arroz y aumenta el rendimiento del grano ( $\geq 2\ 000\ \text{kg ha}^{-1}$ ) (Verdi *et al.*, 2020). Faedo *et al.* (2019) encontraron una mayor germinación entre las semillas de lechuga tratadas con *Arsenicum album* 7CH.

Las diluciones altas dinámicas producen respuestas no lineales en los organismos vivos, donde cualitativamente, las entradas son desproporcionadas a las salidas, en agricultura esto se refiere a un mayor crecimiento vegetativo, producción y recuperación de daños (Bell *et al.*, 2002; Bellavite *et al.*, 2014). Así, utilizando algoritmos y software adecuados, es posible analizar estadísticamente la formación de patrones en suelos tratados con diluciones dinámicas altas.

La premisa básica es que, si las diluciones altamente dinamizadas producen algún cambio en las relaciones físicas, químicas y biológicas, así como en su forma de organización, este cambio de alguna manera se verá reflejado en los patrones de los cromatogramas. El objetivo de este trabajo fue evaluar suelos tratados con diluciones altamente dinamizadas mediante cromatografía circular Pfeiffer con el fin de verificar posibles alteraciones en los cromatogramas que se puedan expresar de manera estadística. Así como, evaluar los cambios que ocurren en los suelos tratados con altas diluciones dinamizadas mediante estadísticas de CCP para verificar las alteraciones en los cromatogramas.

## Materiales y métodos

### Local

El experimento se realizó en Fraiburgo/SC, Brasil (27° 01' 36" latitud sur y 50° 55' 19" longitud oeste), en las instalaciones del Laboratorio de Biología y Suelos de la Escuela de Educación Básica 25 de Maio. Se obtuvieron muestras de suelo en una Área de preservación permanente (APP), se tuvo cuidado de recolectar suelo no antropizado para que hubiera diversidad de microorganismos. Se recolectaron alrededor de 65 kg de suelo vegetal del horizonte cultivable, correspondiente a una profundidad máxima de aproximadamente 15 cm, luego se extendió sobre lienzo y con el objetivo de remover piedras y raíces, el suelo restante se homogeneizó y luego se pasó por tamices de 10 mm seguidos por tamices de 5 mm, de manera que las muestras de suelo tuvieron homogeneidad granulométrica.

Luego se separaron en cuatro cubas de 15 kg cada una. Las diluciones altamente dinamizadas se obtuvieron en el laboratorio de Homeopatía y Sanidad Vegetal de Lages/Epagri. Los tratamientos fueron: agua destilada, alcohol etílico al 30%, *Calcarea carbonica* 30CH y *Silicea terra* 30CH. La elección de *Silicea terra* como tratamiento se basó en trabajos de agricultura biodinámica, cuyo uso ha sido señalado desde principios del siglo XX por Steiner (1861-1925).

En biodinámica y homeopatía para plantas, este preparado está asociado a la estructura interna de las plantas, desarrollo, calidad nutricional y resistencia a enfermedades (Bertalot *et al.*, 2010). *Calcarea carbonica* se asocia con reportes de aplicación en vegetales relacionados con la germinación de semillas desarrollados por Kolisko y Kolisko (1939) en Alemania. El agua destilada fue la misma que se utilizó para preparar alcohol etílico al 30% y se usó en la preparación de *Silicea terra* 30CH y *Calcarea carbonica* 30CH. La preparación de diluciones altamente dinamizadas siguió los métodos descritos en la Farmacopeia Homeopática Brasileira (Brasil, 2011).

Las diluciones altas se aplicaron tres veces, la primera el 08/04/2020, la segunda el 29/04/2020 y la tercera el 15/05/2020. El 25/05/2020, Diez días después de la última aplicación, se realizaron pruebas con Cromatografía Circular Pfeiffer. La primera aplicación se realizó con un aspersor manual de 2 L de la marca Tramontina®, se rociaron 500 ml de los tratamientos sobre el suelo presente en los tanques, de los cuales 500 ml, 5 ml fueron de los tratamientos y el resto fue agua destilada mezclado como se describe en la Farmacopeia Homeopática Brasileira (Brasil, 2011).

Los 5 ml se midieron con ayuda de una pipeta de 10 ml. Durante la pulverización, se cambió el contenido del suelo para lograr una mayor homogeneidad de los tratamientos del suelo. Durante la pulverización, el contenido del suelo se homogeneizó. Después del tratamiento con las diluciones altas dinamizadas, se pesó 1 kg de suelo en un total de 15 macetas por tratamiento, cada maceta recibió un número del 1 al 4 que representa los tratamientos, seguido de otro número del 1 al 15.

La unión de cuatro macetas, una de cada tratamiento, formó un bloque y se paró en un banco diferente. El orden que asumió cada jarrón de izquierda a derecha fue sorteado. Los botes 1 a 10 se utilizaron para las pruebas con CCP, los botes 11 a 15 recibirán los mismos tratamientos y servirán como reserva en caso de que hubiera problemas con alguno de los tratamientos para reemplazarlos si hubiera problemas con alguno de los tratamientos.

Se usó el diseño de bloques completos al azar, cada tratamiento originó 10 bloques, un recipiente de cada tratamiento, en cada recipiente se realizaron tres submuestras, 30 cromatogramas por tratamiento, totalizando 120 cromatogramas. Todos los cromatogramas se digitalizaron y analizaron para que no existiera ningún sesgo en la elección de la apariencia del cromatograma. El experimento se trató dos veces más con las diluciones altas, donde se conservó el mismo diseño experimental y no se volvió a remover el suelo, esto para simular un ambiente agrícola, donde en una primera intervención se removió el suelo y luego solo se trató.

En la segunda y tercera aplicación de las diluciones altas del experimento, no hubo cambios en los tratamientos en cuanto a cambios de bloque, orden de vasos, etc. Sin embargo, se tomaron nuevas muestras para la determinación de la respiración. Para nuevas aplicaciones de altas diluciones se tuvo en cuenta la humedad evaporada durante el período, la cual se obtuvo por el peso actual menos el peso posterior al primer tratamiento.

El valor de 20 ml se definió por el peso medio evaporado de 10 macetas y se acordó tratar la segunda y tercera vez con la misma dosis. De los 20 ml de cada tratamiento, 18 ml fueron de agua destilada y 2 ml de los tratamientos. Se gotearon 20 ml de los tratamientos sobre la superficie de los vasos y después de 30 min se realizó una nueva recolección de material respiratorio. Se estimó la espera para que el contenido aplicado penetre en el suelo.

### **Preparación de material cromatográfico**

Los cromatogramas se crearon utilizando papeles de filtro Whatman número 1, que tiene 150 mm de diámetro. El papel se perforó en el centro y en este orificio se colocó un pequeño cilindro del mismo tipo de papel de filtro con 2 x 2 cm. Se tuvo cuidado de que el cilindro tuviera un buen contacto con el papel circular. El papel de filtro se marcó a 4 cm del centro y a 6 cm del centro. Como la solución no siempre se esparce uniformemente debido a la disposición de las fibras del papel, las marcas se repitieron en un ángulo de 90.

Se llenó una placa Petri pequeña con diámetro exterior 58 mm hasta aproximadamente 2-3 mm de profundidad con una solución de nitrato de plata al 0.5% (0.5 g de  $\text{AgNO}_3$  en 100 ml de agua destilada) y se colocó en una placa Petri de 90 mm de diámetro. El papel de filtro con el cilindro insertado se colocó en la placa de Petri grande, asegurándose de que el cilindro estuviera en la solución de nitrato de plata. Se dejó que la solución alcanzara la marca de 4 cm en el papel de filtro. A continuación, se retiró el papel de la placa de Petri y se desechó el cilindro.

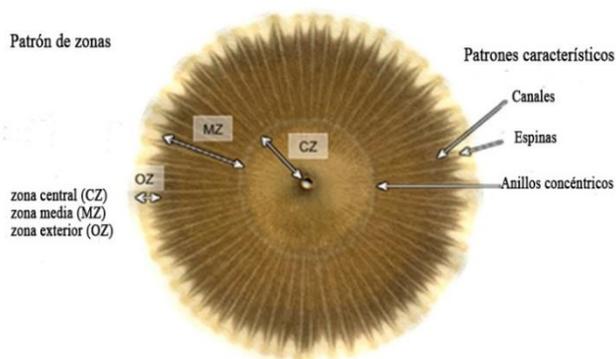
El papel de filtro se colocó sobre una hoja de papel limpia en un lugar oscuro para que se seque. Después del tratamiento con nitrato de plata, se perforaron los papeles para insertar los cilindros y se colocaron en secuencia, para que las pruebas se pudieran realizar con mayor rapidez, se midió el tiempo de la capilarización con ayuda de un cronómetro.

### **Preparación del suelo y paso de prueba final**

Se preparó hidróxido de sodio al 1%. Según Pfeiffer (1984), se colocaron 5 gramos de suelo en un matraz Erlenmeyer de 100 ml y se agregaron 50 ml de solución de hidróxido de sodio al 1%, se agitó de abajo hacia arriba con el recipiente cerrado, durante aproximadamente 30 s, para que la muestra se humedeciera por completo y expulsado el aire. Se dejaron reposar a 20 °C durante un total de 4 h. El material se agitó, después de diez minutos en reposo y después de 60 min en reposo.

El sobrenadante se eliminó con la ayuda de una pipeta pasteur para su uso en cromatografía. La prueba se realizó hasta que el líquido alcanzó la marca de 6 cm. Posteriormente, se secaron los cromatogramas para capturar las imágenes. Todos los estándares de CCP obtenidos en el presente experimento se basaron en las medidas disponibles en el software Scientific Laboratory<sup>®</sup>, software que, aunque no se creó específicamente para CCP, es capaz de analizar imágenes desde un centroide, que permite medir imágenes que se expanden desde el centro.

Los cromatogramas también se midieron utilizando la evaluación propuesta por Kokornaczyk *et al.* (2017), que utiliza un calibrador para medir las distancias desde los extremos hasta el centro, que consistió en tres zonas en forma de anillo ubicadas alrededor de la perforación central (Figura 1). i) la zona central (CZ), ubicada más cerca del agujero y caracterizada por un color muy claro, por lo que; ii) la zona intermedia más oscura (MZ) y en la periferia del patrón; y iii) la zona muy clara y en muchos casos, apenas visible (OZ).



**Figura 1. Patrones de medición de cromatogramas.** Adaptado de Kokornaczyk *et al.* (2017).

### Evaluación de métodos de medición

Las imágenes cromatográficas CCP fueron capturadas por un escáner HP<sup>®</sup> y digitalizadas a una resolución de 3 500 × 3 500 píxeles. El análisis computarizado consiste en medir la textura del patrón utilizando el software ImageJ (Collins, 2007) con el plug-in Texture Analyzer instalado (Cabrera, 2003-2005).

De cada imagen, se seleccionó al azar una región rectangular de interés (1 000 × 200 píxeles) de la zona central [para no contener partes de la zona central o exterior (OZ)], se recortó y se convirtió al tipo de 8 bits, píxeles individuales en escala de grises. En tales selecciones de imágenes preparadas, se realizó un análisis de textura. Solo se consideró el parámetro de entropía para un análisis posterior, ya que es sensible a las diferencias en la intensidad de brillo entre píxeles y por lo tanto, también a la presencia o ausencia de canales.

La entropía de las imágenes viene dada por la fórmula:  $\text{entropía} = - \sum_i \sum_j p(i, j) \log(p(i, j))$ , donde:  $p = (i, j)$  son las entradas en una matriz de dependencia espacial normalizada en escala de grises (Haralick *et al.*, 1973); Entropía (E) mide el grado de dispersión de los niveles de gris y también se puede definir como un número cuantificador de la aleatoriedad de la imagen; es decir, cuanto mayor sea este número, más irregular, atípica o no estandarizada será la imagen analizada.

Cuando la entropía es alta, los valores de la matriz son iguales y es baja cuando los valores de la diagonal de la matriz son altos, o cuando los valores de entrada de la matriz de coocurrencia son bajos (Zanco, 2016). El parámetro de entropía es capaz de capturar cambios radiales en imágenes. El ImageJ también se utilizó para la medición de las zonas, mediante calibración con una escala graduada de calibre. Para el análisis morfológico de los cromatogramas se utilizó el software Scientific Laboratory<sup>®</sup>. Las variables analizadas fueron: área, número de fragmentos, coeficiente de forma, entropía por isolina, fractalidad espacial, longitud de isolina. Los datos se tabularon y analizaron utilizando el software R Core Team (2020).

## Resultados y discusión

Mediante el estudio, se observó que el software Scientific Laboratory<sup>®</sup>, inicialmente creado para GDV, debido al hecho de que utiliza medidas que rastrean el centroide, sirve a nuestros propósitos cuando se adapta a las medidas de cromatogramas digitalizados (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Medidas generadas a partir de un centro de masa para estimar las características morfológicas de los cromatogramas mediante software Scientific Laboratory<sup>®</sup>.**

Tratamientos	Área (px <sup>2</sup> )	Número de fragmentos (unidad)	Coefficiente de forma (px <sup>2</sup> )	Entropía por isolina	Fractalidad espacial	Longitud de isolina (px)
Agua destilada	285 782 b	8.36 bc	411.71 b	138.14 b	164.3 ns	7 997.03 c
Alcohol etílico 30%	292 788 b	12.1 ab	637.71 a	175.49 a	173.9 ns	14 947.9 a
<i>Calcarea carbonica</i> 30CH	328 525 a	5.43 c	392.73 b	144 ab	166.4 ns	8 317.68 c
<i>Silicea terra</i> 30CH	235 508 c	13.3 a	558.22 ab	149.74 ab	161.5 ns	12 249.4 b
CV	10.19	26.3	28.7	33.8	27.32	28.19

Las medias seguidas de la misma letra verticalmente no difieren según la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

Existen diferencias en varios aspectos de los cromatogramas. En la variable área de cromatogramas, que mide el área total en píxeles, la mayor área observada en el tratamiento cromatograma compuesto por *Calcarea carbonica* 30CH, que presentó 328 525 px<sup>2</sup>, mientras que la menor área fue en el tratamiento *Silicea terra* 30CH, que presentó el valor de 235 508 px<sup>2</sup>. Los valores de área están relacionados con una mayor o menor capacidad capilar del material y se relacionan con la forma de la capa más externa, considerando que cuando el líquido alcanza la marca de los 6 cm, se retira inmediatamente, el tiempo de espera fue de 30 min.

Los suelos con componentes moleculares más pequeños tendrán mayor arrastre en los cromatogramas, pudiendo llegar a los extremos de los cromatogramas, formando patrones similares a nubes onduladas (Restrepo y Pinheiro, 2011). La variable número de fragmentos mide el número de fragmentos agregados que señalan un grupo en el cromatograma, la homogeneidad de la distribución de líquidos en los cromatogramas. *Silicea terra* 30CH, que tuvo el área más pequeña, tuvo el mayor número de fragmentos, con el valor de 13.3 unidades, *Calcarea carbonica* 30CH tuvo el valor más bajo de 5.43 unidades, estas diferencias pueden explicarse por el modo de acción de las diluciones altas dinamizadas, que tienen un modo de acción diferente, especialmente cuando se comparan las obras de (Kolisko y Kolisko, 1939).

La variable de coeficiente de forma, que se refiere a la forma que presentan los cromatogramas, el grado de irregularidad del patrón, es obtenido por la isolina. Es posible afirmar que la forma de los cromatogramas de las diluciones altas *Calcareo carbonica* 30CH y *Siliceo terra* 30CH fue similar al tratamiento con agua destilada, esta igualdad en nuestro caso demuestra que hubo estandarización en la conducción de los cromatogramas.

La entropía variable por isolina, que representa la medida de la entropía de la isolina, mide el grado de aleatoriedad de la longitud radial de la imagen desde su centro de masa. El estudio mostró que las altas diluciones obtuvieron un alto grado de similitud con los controles compuestos de agua destilada y alcohol etílico al 30%. Esto significa que el método se llevó a cabo sin grandes diferencias radiales. Lo mismo puede decirse del parámetro de fractalidad espacial, directamente relacionado con la forma del cromatograma, en este parámetro en particular no hubo diferencias significativas entre tratamientos con altas diluciones y controles.

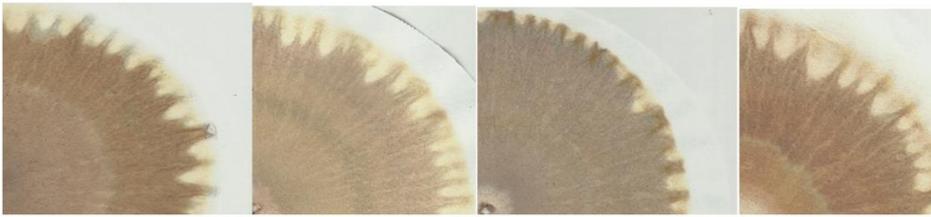
La longitud variable de la isolina que mide la longitud de la isolina mostró diferencias en los tratamientos compuestos de *Siliceo terra* 30CH y alcohol etílico 30%, este comportamiento expresa el carácter radial total y estas diferencias se pueden explicar por algún compuesto más ligero que se lleva a las capas de los cromatogramas más externos.

Dado lo anterior, el método pasa por las principales características que garantizan la repetibilidad y consistencia de los resultados obtenidos por el método. Nuestro estudio demuestra Los resultados demuestran no el estudio que es posible realizar experimentos con cromatografía circular de Pfeiffer siempre que se realice con discreción. Las diferencias descritas demuestran la sensibilidad a la hora de capturar diferencias en los tratamientos. La interpretación de los cromatogramas se puede interpretar desde al menos tres zonas diferentes (Pinheiro, 2015).

En los análisis que siguen, las letras CZ, MZ y OZ, donde CZ representa la zona central, MZ la zona media y OZ la zona exterior. Estas tres zonas son las mismas medidas por Kokornaczyk *et al.* (2017). Es interesante la variable de entropía, donde la entropía más baja se obtuvo mediante el tratamiento *Siliceo terra* 30CH (Cuadro 1). Los parámetros de área y perímetro fueron introducidos para estimar el área central, también llamada zona central (oxidación-reducción), esta zona transporta las sustancias minerales u orgánicas disueltas que al pasar sobre la parte impregnada con  $\text{AgNO}_3$  se produce la formación inmediata de hidróxido de plata. ( $\text{AgOH}$ ), que es inestable y forma un precipitado oscuro de óxido de plata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), proporcional a la cantidad de sustancia.

Si en el ambiente del suelo prevalece una condición anaeróbica que no permite la oxidación de los minerales, las sustancias tóxicas se acumulan en la atmósfera del suelo, manifestando un color oscuro a negro. Esta zona expresa principalmente el metabolismo microbiano, por lo tanto, de acuerdo con la calidad de vida del suelo y la concentración de sustancias nitrogenadas presentes en la muestra, este precipitado negro de  $\text{Ag}_2\text{O}$  se vuelve soluble.

El color cambia a un tono blanco plateado o crema, esto es deseable, formando así el complejo diaminoplatina  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ . Colores que van desde el negro (mínimo metabolismo microbiano aeróbico y máxima fermentación anaeróbica) hasta el plateado mayor plenitud en el metabolismo microbiano aeróbico y armonía estructural (Restrepo y Pinheiro, 2011; Domingues *et al.*, 2018). Para la variable de entropía, *Siliceo terra* 30CH fue el tratamiento que obtuvo los valores más altos, puede haber una relación inversa entre el área de los cromatogramas y los valores de entropía. La entropía es sensible a los patrones formados en los cromatogramas (Figura 2).



**Figura 2. Los cromatogramas difieren en color y patrones, de izquierda a derecha, patrones de tratamiento agua destilada, 30% de alcohol, *Calcareo carbonica* 30CH y *Siliceo terra* 30CH.**

Cabe recordar que el término entropía aquí se refiere únicamente a la imagen, ya que es sensible a las diferencias de intensidad de brillo entre píxeles y por tanto, nos proporciona información sobre la presencia o ausencia de canales. No se realizó ninguna conclusión sobre el factor de orden en que los tratamientos pueden influir en el sistema. Otro punto que se puede relacionar con la entropía presentada puede ser el parámetro número de fragmentos (Cuadro 1), que básicamente consiste en la cantidad de fragmentos generados en la imagen, nuevamente *Siliceo terra* 30CH, presenta mayor cantidad de fragmentos y consecuentemente mayor entropía (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Medidas de zona, análisis de textura de cromatogramas.**

Tratamientos	Parámetros medidos					
	CZ (cm)	MZ (cm)	OZ (cm)	Área central (cm <sup>2</sup> )	Perímetro central (cm)	Entropía
Agua destilada	3.12 b	1.99 b	0.441 c	2.265 b	1.794 bc	6.65 a
Alcohol etílico 30%	3.24 ab	2.02 b	0.729 b	2.118 b	1.421 c	6.12 d
<i>Calcareo carbonica</i> 30CH	3.37 a	2.09 ab	0.462 c	1.69 b	2.217 b	6.44 c
<i>Siliceo terra</i> 30CH	2.61 c	2.35 a	0.979 a	3.595 a	3.17 a	6.95 a
CV	11.05	21.61	17.48	28.9	31.6	16.41

Las medias seguidas de la misma letra verticalmente no difieren según la prueba de Tukey. CZ= zona central; MZ= zona media; OZ= zona externa.

Para la variable MZ o zona media, aunque *Calcareo carbonica* 30CH no mostró diferencia alguna entre los tratamientos compuestos de agua destilada y alcohol etílico al 30%, *Calcareo carbonica* 30CH y *Siliceo terra* 30CH presentaron los valores más altos de MZ, 2.09 cm y 2.35 cm respectivamente, *Siliceo terra* 30CH obtuvo valores significativamente superiores a los demás tratamientos. En comparación con los datos de respiración ya presentados en el capítulo anterior realizado sobre un trabajo aún no publicado que sugieren una mayor actividad microbiana en los tratamientos *Calcareo carbonica* 30CH y *Siliceo terra* 30CH, nuestros datos corroboran Graciano *et al.* (2020) quienes señalaron que en la MZ (zona media) existe una fuerte correlación positiva con el carbono de la masa microbiana del suelo, mostrando la relación de esta zona con la biología del suelo.

*Siliceo terra* 30CH obtuvo un mayor grado de diferenciación respecto a los otros tratamientos, mostrando diferencias en los parámetros: área, longitud de isolínea, CZ, área central, perímetro central y entropía. *Calcareo carbonica* 30CH mostró diferencias en área y entropía. Por tanto, área

y entropía parecen ser los parámetros más sensibles para captar las diferencias en los cromatogramas en relación con el tratamiento. El parámetro de entropía fue el más efectivo para capturar diferencias sutiles entre fases, por lo tanto, cualquier efecto de los tratamientos en el suelo pudo reflejarse en este parámetro, cuanto mayor era el número, más irregular, atípica o no estándar era la imagen analizada.

Con los avances en los algoritmos, la cromatografía circular de Pfeiffer, un tipo de análisis cualitativo puede volverse cuantitativa y ha permitido avances al proporcionar nuevos puntos de vista e interpretación de los fenómenos. Otros autores han llegado a esta conclusión. Oliveira *et al.* (2020) afirma que el avance en los métodos de medida de la cromatografía de Pfeiffer, ha contribuido a la ampliación del estudio en este sentido. El trabajo realizado en los últimos 10 años trajo importantes avances en el conocimiento y profundización científica de la cromatografía circular de Pfeiffer.

## Conclusiones

*Silicea terra* 30CH obtuvo un mayor grado de diferenciación frente a otros tratamientos, área, longitud de isolina, CZ, área central, perímetro central y Entropía. *Calcareo carbonica* 30CH mostró diferencias en área y entropía. Se muestra que el parámetro de entropía es el parámetro más eficaz en el análisis digitalizado de la cromatografía circular de Pfeiffer mediante los algoritmos (14 en total) presentes en el complemento Texture Analyzer de ImageJ, esto se debe a las características complejas del cromatograma cuando se evalúa en su totalidad.

*Calcareo carbonica* 30CH y *Silicea terra* 30CH tuvieron los valores más altos de MZ, mientras que *Silicea terra* 30CH tuvo valores significativamente más altos que los otros tratamientos. Estos datos sugieren que los tratamientos *Calcareo carbonica* 30CH y *Silicea terra* 30CH promovieron mayor actividad microbiana en los tratamientos. Algoritmos morfológicos permitieron cuantificar los efectos de preparados homeopáticos en la organización del suelo. Es posible comprobar diferencias en cromatogramas entre tratamientos que anteriormente solo se podían obtener de forma cualitativa, aunque estudios posteriores nos aportarán mayor consistencia y confianza en el método de análisis de imágenes cromatográficas digitalizadas.

## Agradecimientos

FAPESC a través del proyecto Rede Guarani Serra Geral/TO 2015TR1067, CNPq (trámite n. 304018/2015; 307376 / 2017-6) y el Programa de Posgrado UNIEDU para la beca de primer autor.

## Literatura citada

- Andrade, F. M. C. D. y Casali, V. W. D. 2011. Homeopatia, agroecologia e sustentabilidade. Rev. Brasileira de Agroecologia. 6(1):49-56.
- Bell, I. R.; Baldwin, C. M. and Schwartz, G. E. 2002. Translating a nonlinear systems theory model for homeopathy into empirical tests. Alternative therapies in health and medicine. 8(3):58-66.

- Bellavite, P.; Marzotto, M.; Olioso, D.; Moratti, E. and Conforti, A. 2014. High-dilution effects revisited. 2. Pharmacodynamic cilindrosnisms. Homeopathy. 103(01):22-43. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.homp.2013.08.002>.
- Bertalot, M. J. A. 2010. Métodos alternativos para controle de doenças fúngicas na cultura de jambu (*Spilanthes oleraceae* L.) através de *Equisetum* spp. e preparado biodinâmico 501. Rev. Bras. Agroecol. 5(2):264-274.
- Bezerra, L. P.; Franco, F. S.; Souza, E. V. F. and Borsatto, R. 2019. Participatory construction in agroforestry systems in family farming: ways for the agroecological transition in Brazil. Agroecology and Sustainable Food Systems. 43(2):180-200. Doi: <https://doi.org/10.1080/21683565.2018.1509167>.
- Brasil. 2011. Farmacopéia homeopática brasileira. Comissão permanente de Revisão. 3<sup>ra</sup>. Ed. Brasil. 320-365 pp.
- Collins, T. J. 2007. Image j for microscopy. BioTechniques, 43(1):S25-S30. Doi: <https://doi.org/10.2144/000112517>, 2007.
- Core, R. T. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. 173 p.
- Domingues, S.; Contini, R.; Maia, M.; Farina, É.; Gabardo, G. y Ribeiro, A. 2018. Conhecimento agroecológico através da experimentação da Cromatografia de Pfeiffer, uma análise qualitativa dos solos. Rev. Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp. 15(1):932-940.
- Domingues, S.; Werner, S. S.; Bof, M. I. C. and Boff, P. 2019. Regrowth of yerba mate plants (*Ilex paraguariensis* A. St. hill.) submitted to dynamized high-dilution preparations. J. Exp. Agric. Inter. 36(6):1-11.
- Faedo, L. F.; Faxina, T. C.; Silva, K. M.; Atanasio, W. M.; Damasceno, M. S. and Boff, P. 2019. Germination of *Lactuca sativa* under different dynamization levels of *Arsenicum album*. In simpósio internacional de ciência, saúde e território, 5, Lages, SC: Uniplac. 1-6 pp.
- Fritz, J.; Athmann, M.; Kautz, T. and Köpke, U. 2011. Grouping and classification of wheat from organic and conventional production systems by combining three image forming methods. Biol. Agric. Hortic. 27(3-4):320-336. Doi: <https://doi.org/10.1080/01448765.2011.648918>.
- Fritz, J.; Athmann, M.; Meissner, G.; Kauer, R.; Geier, U.; Bornhütter, R. and Schultz, H. 2020. Quality assessment of grape juice from integrated, organic and biodynamic viticulture using image forming methods. One. 54(2):373-391. Doi: <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.2.2548>.
- Graciano, I.; Matsumoto, L. S.; Demétrio, G. B. and Mello, P. E. C. T. 2020. Evaluating pfeiffer chromatography for its validation as an indicator of soil quality. J. Agric. Stud. 8(3):420-446. Doi: <https://doi.org/10.5296/jas.v8i3.16336>.
- Haralick, R. M.; Shanmugam, K. and Dinstein, I. H. 1973. Textural features for image classification. IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics. 6(1):610-621. Doi: <https://doi.org/10.1109/TSMC.1973.4309314>.
- Heger, T. J.; Imfeld, G. y Mitchell, E. A. 2012. Special issue on bioindication in soil ecosystems. Ed. Note. Eur. J. Soil Biol. 49(1):1-4.
- Khemani, D.; Joseph, M. M. and Variganti, S. 2008. Case based interpretation of soil chromatograms. In: European conference on case-based reasoning. Springer, berlin, heidelberg. 587-599 pp. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85502-6\\_40](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85502-6_40).
- Kokornaczyk, M. O.; Primavera, F.; Luneia, R.; Baumgartner, S. and Betti, L. 2017. Analysis of soils by means of Pfeiffer's circular chromatography test and comparison to chemical analysis results. Biol. Agric. Hortic. 33(3):143-157. Doi: <https://doi.org/10.1080/01448765.2016.1214889>.

- Kolisko, E. y Kolisko, L. 1939. Agriculture of tomorrow. Gloucester: kolisko archive. 19-90 pp.
- Krishnamurthy, K.; y Swaminathan, M.; 1955. Quantitative determination of amino acids by circular paper chromatography. *Anal. Chem.* 27(9):1396-1399. Doi: <https://doi.org/10.1021/ac60105a009>.
- Oliveira, W. S.; Costa, J. L.; Cardoso, E. P.; Teixeira, R. D. N. P. and Silva, O. M. E. 2020. Métodos de interpretação para teste de qualidade em solos a partir da cromatografia circular plana (FCC). *Braz. J. Animal Environ. Res.* 3(3):1107-1125. Doi: <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n3-031>.
- Perumal, K.; Ananthi, S. and Arunkumar, J. 2016. Innovative and simplest alternative analytical technology (AAT) for testing soil nutrients. *J. Soil Sci. Res.* 1(1):10-28.
- Pfeiffer, E. 1984. Chromatography applied to quality testing. Steiner books. 3-44 pp.
- Pilon, L.; Cardoso, J. and Medeiros, F. 2018. Guía práctico de cromatografía de Pfeiffer. EMBRAPA clima temperado-documentos (Infoteca-E). 3-62 pp.
- Pinheiro, S. X. 2015. Saúde do Solo: Biopoder camponês versus agronegócio. Rio Grande do Sul: salles. 10-130 pp.
- Restrepo, J. R. and Pinheiro, S. 2011. Cromatografía: imagines de vida y destrucción del suelo. Cali: Feriva. 25-310 pp.
- Saavedra, T.; Arroyo, F. G. and Peña, C. V. 2018. Chromatography of Pfeiffer in the analysis of soils of productive systems. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(3):665-673. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1223>.
- Verdi, R.; Nunes, A.; Faedo, L. F. and Boff, P. 2020. Manejo homeopático no cultivo de arroz irrigado. *Braz. J. Dev.* 6(9):65540-65549.
- Zanco, J. J. 2016. Biofotônica na caracterização de sementes submetidas a altas diluições dinamizadas. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages. 30-238 pp.