

ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea]

Número 5  
Diciembre 2010

# INN TEC

Revista anual  
del Laboratorio  
Tecnológico  
del Uruguay

# INDICE

**INNOTEC (ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea]) es una revista científica arbitrada del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).**

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del LATU y autores externos con el objetivo de apoyar el desarrollo de tecnologías que aporten valor a los procesos de innovación.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a contactarse con el Centro de Información Técnica a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir las Instrucciones a los autores (ver pág. 2) y los documentos de referencia de nuestro proceso editorial.

## Dirección

Ing. Mariela de Giuda, MBA  
Gerente Gestión Empresarial

## Coordinación

Lic. Celeste Villagrán  
Jefe del Centro de Información Técnica, LATU

## Edición

Lic. Marina Barrientos  
Lic. Lorena Fiori (producción)

## Diseño

[vieja.com.uy](http://vieja.com.uy)

Centro de Información Técnica, LATU  
Avda. Italia 6201  
Tel.: (598) 2601 3724, int. 1364  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
[www.latu.org.uy](http://www.latu.org.uy)  
[www.facebook.com/citein.latu](https://www.facebook.com/citein.latu)  
[citein.blogspot.com](http://citein.blogspot.com)

La distribución de esta revista es gratuita; para solicitar un ejemplar diríjase a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).  
Prohibida la reproducción total y parcial de artículos y/o materiales gráficos originales sin mencionar su procedencia. Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos son de responsabilidad de sus autores.  
Todos los derechos reservados.

ISSN: 1688-3691  
Título-clave: INNOTEC  
Título-clave abreviado: Innotec

ISSN: 1510-6593  
Título-clave: Innotec [en línea]  
Título-clave abreviado: Innotec [en línea]

Instrucciones a los autores.....	2
Índice de autores.....	69
Índice temático .....	70

## AGUAS

- 3 Evaluación ecotoxicológica de sedimentos en una zona del Río Uruguay, con puntos finales indicadores de toxicidad aguda, sub-letal, crónica, reproductiva y teratogénica  
*Míguez, D., Seoane, I., Carrara, M. V., Carnikián, A., Keel, K., Aizpún, A., Bouvier, M. E., Cartmell, E.*
- 11 Línea de base para evaluar el impacto de una planta de celulosa en el Río Uruguay  
*Saizar, C., Míguez, D., Dabezies, M., Teixeira-de Mello, F., Clemente, J., Ferrari, G., Boccardi, L., Tana, J.*
- 23 Estudio comparativo de la determinación del tamaño de partícula por dos métodos: tamizado en seco y difracción láser  
*Cabrera, S., Irigaray, R., Míguez, D.*

## BIOQUÍMICA ANALÍTICA

- 29 Desarrollo de superficies modificadas oro-anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bobina  
*Keel, K., Tosar, J. P., Laíz, J.*

## BIOTECNOLOGÍA

- 34 Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes  
*Keel, K.; Míguez, D.; Soares, A., Parodi, A.*
- 39 Sensibilidad a antibióticos, actividad antibacteriana frente a patógenos y fermentaciones ácido lácticas de una cepa nativa de *Lactobacillus paracasei* de origen humano  
*Vázquez, S., Lopretti, M., Rey, F., Zunino P.*
- 43 *Bioinfo\_eXtrema*: un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica, enfocado en bioprospección y selección de consorcios de microorganismos con aplicaciones en biorremediación  
*Capdevielle, F., Ottati, C., Lopretti, M.*

## PLÁSTICOS

- 48 Ensayos físico-químicos para el estudio de la degradación de bolsas de supermercado  
*Remersaro, J.; Medina, D.; Hernández, M.; Latrónica, L.*

## TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

- 54 Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería  
*Cuellas, A., Wagner, J. R.*
- 58 Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido  
*Abirached, C., Medrano, C. A., Panizzolo, L. A., Moyna, P., Añón, M. C.*
- 63 Capacidad emulsionante de sueros de soja  
*Sobral, P. A.; Wagner, J. R.*
- 66 Estabilidad a la congelación-descongelación de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja nativos y desnaturalizados con diferente solubilidad  
*Palazolo, G. G.; Wagner, J. R.*

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos o artículos editados y autorizados por el correspondiente comité editor, dentro de los campos de interés de la institución. Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y autores externos en el marco de distintos proyectos.

El proceso de revisión de esta revista comienza con el (a) envío por parte del autor de su texto completo, por vía electrónica, a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). El Centro de Información Técnica (CITEIN) del LATU notifica al autor la recepción del texto y remite el artículo al miembro idóneo del (b) comité técnico de arbitraje del proceso editorial de INNOTEC, quien evaluará el desarrollo específico del mismo, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos. El (c) responsable editorial se comunica con el autor en respuesta a los comentarios que hace el evaluador del artículo. El (d) CITEIN edita el artículo aplicando en el texto las normas del manual de estilo, y envía la última versión revisada al autor para su aprobación final.

Se debe considerar para poder incluir artículos completos, que los mismos no deberán tener derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío del artículo. Los autores deberán firmar un formulario de cesión de derechos autorales y enviarlo a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). En el caso de artículos con derechos de autor, solo se publicarán aquellos que cuenten con autorización expresa de la empresa a cargo de su edición.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado.

LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

## Normas de presentación de los textos

Por favor, siga atentamente las siguientes normas de publicación. Ante cualquier consulta, dirijase al correo electrónico de referencia, [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).

Adjunte la siguiente información: título del artículo en mayúsculas y minúsculas. Nombre completo de todos los autores, citados en orden decreciente de importancia para el desarrollo del artículo, sin mediar jerarquías funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen, y empresa de la que forman parte; esta característica se consigna con números de referencia, colocados entre paréntesis junto al nombre de cada autor. Se debe señalar además el responsable que operará como contacto en las comunicaciones electrónicas.

La estructura de los textos incluye: un **resumen**, en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana; **palabras clave** (que no repitan los términos ya utilizados en el título); el texto de una (1) a diez (10) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes).

El texto deberá ser presentado en fuente **Arial 11**, a espacio **doble** y **numeración de líneas**, con títulos en mayúsculas y minúsculas, y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

## Formato y estilo

- **Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.
- **Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.
- **Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.
- **Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.
- **Material y Métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.
- **Resultados.** Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.
- **Discusión (Conclusión).** Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.
- **Agradecimientos.** Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.
- **Referencias.** Ver *Manual de estilo de presentación de citas y referencias documentales del LATU* (solicitar en el Centro de Información Técnica del LATU).

## Ejemplos usuales de referencias:

### Monografías

APELLIDO(S), Nombre. *Título del libro*. N° de edición. Lugar de edición: editorial, año de edición. (Serie; N°). ISBN.

BOBBIO, Norberto. *Autobiografía*. Madrid: Taurus, 1988. 299 p. ISBN: 84-306-0267-4.

*El Lazarillo de Tormes*. Marañón, Gregorio (prol.). 10a ed. Madrid: Espasa Calpe, 1958. (Colección Austral; 156).

## Revistas como un todo

*Título de la publicación*. RESPONSABILIDAD. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN.

*Boletín económico*. BANCO DE ESPAÑA. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979-. ISSN: 0210-3737.

## Artículos de revistas

APELLIDO(S), Nombre. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*. Edición. Localización en el documento fuente: año, número, páginas.

LLOSA, Josep. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*. 1998, 47(6):625-638.

ALVAREZ, Begoña; BALLINA, F. Javier de la; VÁZQUEZ, Rodolfo. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*. 2000, (143):33-37.

## Normas

ENTIDAD RESPONSABLE DE LA NORMA. País de la entidad responsable entre paréntesis. N° o código de la norma: *Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada, año de publicación.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (España). UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR, 2002.

INSTITUTO URUGUAYO DE NORMAS TÉCNICAS (Uruguay). UNIT-ISO 9001: *Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT, 2000.

## Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

RESPONSABLE PRINCIPAL. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, fecha de publicación, fecha de actualización o revisión, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado.

RAPP, A.; AUGUSTA, U.; PEEK, R. D. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH, 2001. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfafh.de/inst443/pdf/3doubly.pdf>

## Patentes

MENCIÓN DE RESPONSABILIDAD PRINCIPAL. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número. Año-mes-día de publicación del documento.

GREEN, Daniel R. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427. 2008-07-08

## Secciones

Los títulos de **sección** (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente negrita o bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en negrita o bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

## Fórmulas, figuras, tablas e imágenes

Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla ni colocarlas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas. Además de estar insertadas en el artículo, cada figura y tabla debe ser remitida en su propio archivo, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

## Denominaciones en latín

Deben ir en cursiva.

# Evaluación ecotoxicológica de sedimentos en una zona del Río Uruguay, con puntos finales indicadores de toxicidad aguda, sub-letal, crónica, reproductiva y teratogénica

Míguez, D. <sup>(1)</sup>, Seoane, I. <sup>(1)</sup>, Carrara, M. V. <sup>(1)</sup>, Carnikián, A. <sup>(1)</sup>, Keel, K. <sup>(1)</sup>, Aizpún, A. <sup>(1)</sup>, Bouvier, M. E. <sup>(2)</sup>, Cartmell, E. <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento Aguas y Productos Químicos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Departamento Aguas. Unidad Fray Bentos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Parque Industrial, Barrio Anglo, Fray Bentos, Río Negro, Uruguay - <sup>(3)</sup> School of Applied Sciences. Centre for Water Science, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire, United Kingdom.

Contacto: dmiguez@latu.org.uy

Recibido: 12/07/2010 - Aprobado: 27/10/2010

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la toxicidad de los sedimentos de una zona del Río Uruguay, aplicando una batería de bioensayos. Las muestras provinieron de: una zona de influencia de descargas domésticas y efluentes de una planta de celulosa (Fray Bentos), una ciudad turística aguas abajo (Las Cañas) y otra aguas arriba (Nuevo Berlín), sin influencia directa de dichos vertidos. Los bioensayos aplicados en elutriados fueron: de toxicidad con *Photobacterium leiognathi*, de reproducción con *Ceriodaphnia dubia*, de teratogenicidad y letalidad con *Pimephales promelas* y el ensayo sub-letal en sedimento completo con *Hyaella curvispina*. Para evaluar la biodisponibilidad y las rutas de toxicidad, se midió el fraccionamiento del 2,4,5-triclorofenol, con resultados: 63% disuelto, 27% adsorbido sobre partículas y el resto sedimentado. Se observó toxicidad por orgánicos y metales con *P. leiognathi* para todos los sitios. La frecuencia de malformaciones vertebrales de *P. promelas* fue de 3.3% en Fray Bentos, pero *C. dubia* sólo mostró efectos en Nuevo Berlín y Las Cañas. Los efectos con *H. curvispina* se evidenciaron en todas las muestras. Las rutas de toxicidad incluirían la ingestión de contaminantes disueltos y particulados asociados a arcillas y limo. El vínculo causa-efecto para la toxicidad se continuará investigando. Palabras clave: Bioensayos, elutriado, teratogenicidad, clorofenoles.

## Abstract

The aim of this work was to characterize the sediment toxicity of a zone of the River Uruguay through a battery of bioassays. The samples were extracted from an area of influence of domestic wastewater discharges and pulp mill effluents (Fray Bentos), a touristic town downstream (Las Cañas), and another one, upstream, isolated from those discharges (Nuevo Berlín). The bioassays: *Photobacterium leiognathi* toxicity screen, *Ceriodaphnia dubia* reproduction and embryo-larval teratogenicity and lethality with *Pimephales promelas* were applied to the sediment elutriates, while the *Hyaella curvispina* sub-lethal growth test was performed using whole sediment. To assess bioavailability and toxicity pathways, the sediment-water partitioning of 2,4,5-trichlorophenol among phases was determined as: 63% dissolved, 27% suspended and the rest settled. Toxicity to organics and metals using *P. leiognathi* was observed in all sampled sites. The frequency of *P. promelas* vertebral malformations was 3.3% only to Fray Bentos elutriate, but the *C. dubia* reproduction bioassay showed effects only in those from Nuevo Berlín and Las Cañas. The growth test with *H. curvispina* evidenced effects for all samples. The toxicity pathways could be ingestion of dissolved and particulate contaminants, possibly associated to higher clay and silt contents and contaminant input. The cause-effect relationships will be subject to further research.

Keywords: Bioassays, elutriate, teratogenicity, chlorophenols.

## Introducción

El Río Uruguay es uno de los más grandes ríos de América del Sur, sustento de una rica biodiversidad acuática. Su importancia para el ser humano radica además en los usos domésticos, industriales, agrícolas, pesqueros y turísticos de este recurso hídrico de importancia binacional. Por consiguiente, es de crucial importancia entender si alguna descarga puntual al río, como podrían ser las provenientes de los efluentes de una planta de celulosa blanqueada, las aguas residuales cloacales de las ciudades asentadas a sus márgenes o las provenientes

de fuentes no-puntuales debido al uso de agroquímicos usados en plantaciones de soja, podrían afectar la calidad del agua.

La biodisponibilidad de los compuestos químicos es un aspecto que debería ser tenido más en cuenta en las evaluaciones ecotoxicológicas y de riesgos (Martín-Díaz et al., 2006). Por este motivo, el estudio de las características fisicoquímicas de las fracciones agua y sedimento en el Río Uruguay es necesaria para evaluar la biodisponibilidad y el fraccionamiento, para así poder estimar mejor el potencial de ecotoxicidad de los contaminantes vertidos en los efluentes industriales y domésticos y, por tanto, la calidad del agua del río. Como las propiedades fisicoquímicas pueden variar entre sedimentos de

diferentes sitios, afectando la partición y por ende la biodisponibilidad y ecotoxicidad de los posibles contaminantes (Kendal et al., 2001, p. 1016), es pertinente caracterizar específicamente las propiedades de los sedimentos y la exposición a los contaminantes en varios sitios del Río Uruguay, incluyendo aquellas áreas potencialmente afectadas por actividades industriales y las descargas de aguas residuales cloacales, en comparación con áreas de referencia que no están recibiendo estas descargas puntuales.

Primeramente se debería considerar la ruta de ingreso de los contaminantes al organismo. Esta puede ser directamente por pasaje de las sustancias tóxicas disueltas a través de las membranas, ruta principal de exposición para la mayoría de los organismos bentónicos, pero también puede ser mediante la ingestión de partículas de sedimento contaminadas (NAS, 2003). Los contaminantes hidrofóbicos adsorbidos a partículas o al carbono disuelto pueden desorberse, ocasionando así la re-exposición de los organismos. Finalmente, la bioacumulación de contaminantes en los tejidos de la biota, puede conducir a biomagnificación a través de la cadena trófica (Katagi, 2006; USEPA, 2000).

Para predecir la bioacumulación de una sustancia se debe considerar la distribución entre las fracciones disueltas y suspendidas (Voutsas et al., 2001). El coeficiente de partición octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ) es usado como indicador de potencial de acumulación, y la bioacumulación es inversamente proporcional a este coeficiente. Las sustancias lipofílicas se adsorben a las partículas de sedimento (Katagi, 2006). En general, un compuesto tiende a distribuirse en la materia orgánica si  $\log K_{ow} > 1$ . En el caso de los clorofenoles el  $\log K_{ow} > 2$ , por lo que se distribuirían en la fase sedimento. Los clorofenoles pueden contaminar el agua, los suelos y los sedimentos. Algunos se los puede hallar en los efluentes de pulpa de celulosa blanqueada (ATSDR, 1998; Ohlenbusch et al., 2000). Los halogenuros orgánicos extraíbles (EOX) están formados por esta clase de compuestos y otras sustancias que puedan ser extraídas de las fases sólidas con acetato de etilo, en tanto los halogenuros orgánicos adsorbibles (AOX) representan a los compuestos orgánicos halogenados que se pueden extraer del agua mediante carbón activado. El compuesto 2,4,5-triclorofenol (2,4,5-TCP) fue elegido en nuestra investigación como sustancia modelo para estimar el fraccionamiento de los compuestos orgánicos entre el agua y el sedimento a través de la relación AOX/EOX. Esta relación ha sido utilizada por varios autores para evaluar los impactos de efluentes de pulpa de celulosa y las características espacio-temporales de la contaminación de agua y sedimentos en la cercanía de las descargas industriales (Saski et al., 1997; Sibley et al., 1998).

Las concentraciones de contaminantes en los distintos compartimientos ambientales pueden predecirse utilizando bases de datos de propiedades fisicoquímicas y características de toxicidad, y/o realizando experimentos de exposición en el medio acuático. El uso de una batería de bioensayos a varios niveles tróficos se recomienda por incluir diferentes mecanismos de toxicidad y sensibilidades para evaluar los riesgos ambientales específicos para los sitios (Chapman, 2002). Por ejemplo, las bacterias son más sensibles a los metales que los peces y los seres humanos (UNESCO, WHO, UNEP, 1996). Algunos contaminantes químicos en los organismos no pueden ser determinados cuantitativamente en los tejidos por su rápida metabolización; es por eso que el estudio de efectos de toxicidad subletal en los organismos provee importante información en estos casos. Los efectos tóxicos de mezclas de contaminantes a los que la biota está expuesta en el ambiente podrían no ser predecibles empleando únicamente datos de concentraciones tisulares (Lower y Kendall, 1990, citados por Kendal et al., 2001). Las fases embrio-larvales en organismos acuáticos son las más sensibles en su ciclo de vida

(Weis y Weis, 1987). Las alteraciones de las funciones homeostático-endócrinas en el desarrollo temprano pueden estar influenciadas por muchos procesos fisiológicos durante la vida de un organismo (Warner y Jenkins, 2007), de modo que los bioensayos con peces representan una muy promisoriosa alternativa para el ensayo de toxicidad acuática (Halder et al., 2010).

Este trabajo evalúa la ecotoxicidad de los sedimentos de una zona del Río Uruguay y examina la influencia de las características físicas y químicas de los mismos en el fraccionamiento y biodisponibilidad de los compuestos orgánicos clorados. El diseño experimental utilizado fue creado para servir como herramienta de evaluación de la exposición de organismos acuáticos a contaminantes ambientales, para posteriormente evaluar los riesgos en forma más exacta que por medio de bases de datos, ya que en forma experimental se reflejan las condiciones de los sitios.

## Materiales y Métodos

El diseño experimental se compuso por métodos ecotoxicológicos, químicos y físicos (Figura 1). Se analizaron los nutrientes (N, P, materia orgánica), los compuestos orgánicos halogenados extraíbles (EOX) y tamaño de partícula en sedimentos. Se realizó un elutriado y se analizó compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) en dicha fracción. El bioensayo con *Hyalella curvispina* fue aplicado al sedimento completo mientras que a la fracción acuosa se le aplicó una batería de bioensayos compuesta por *Photobacterium leiognathi*, *Ceriodaphnia dubia* y *Pimephales promelas*.

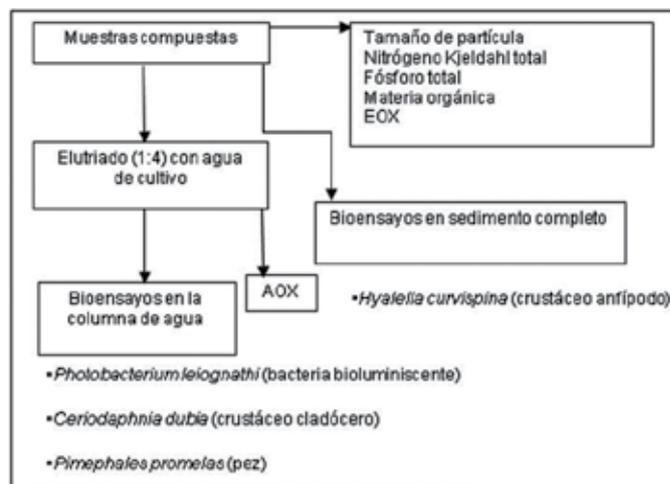


Figura 1. Diseño experimental para la evaluación del fraccionamiento de sustancias organocloradas y la toxicidad por exposición de organismos acuáticos a sedimentos y elutriados extraídos de sitios del Río Uruguay cercanos a las localidades de Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas, departamento de Río Negro, Uruguay.

## Muestreo y preparación del elutriado

Las muestras de sedimentos del fondo fueron extraídas con draga Petit Ponnar en transectas del río en tres zonas: Nuevo Berlín (sitio control), Fray Bentos (sitio cercano a la ciudad e inmediatamente aguas abajo de la planta de celulosa) y Las Cañas (ciudad turística, aguas debajo de Fray Bentos). Las porciones de las muestras de cada transecta central fueron mezcladas para preparar muestras compuestas representativas de cada área de muestreo. Para realizar el elutriado se colocó una porción apropiada de cada muestra de sedimento (1.5 kg aproximadamente) en un recipiente de acero inoxidable de 10 litros y

se mezcló en forma mecánica con 6 litros de agua de dilución durante 30 minutos utilizando un agitador de paleta (Janke y Kunkel modelo RW20, IKA-WERK, Staufen, Germany) (US EPA, 1998).

El agua de dilución se obtuvo por filtración de agua potable a través de un sistema de filtros compuesto por un filtro mecánico de 5  $\mu\text{m}$ , carbón activado de 20  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$  y luz UV (TGI, TGI-525, Brea-California, Estados Unidos), con las siguientes características: dureza total ( $\text{mg CaCO}_3/\text{l}$ ) > 25, oxígeno disuelto ( $\text{mg/l}$ ) > 60%, pH 7 – 8.

## Estudio del fraccionamiento de AOX/EOX

La muestra de sedimento correspondiente a Las Cañas fue adicionada con una solución de 2,4,5-triclorofenol (preparada pesando 0.3827 g de 2,4,5-triclorofenol en 200 ml de metanol). Una submuestra de 1.5 kg del sedimento compuesto fue mezclada con 6 litros de agua de dilución y 50.0 ml de la solución de 2,4,5-triclorofenol. Se analizó el tamaño de las partículas en suspensión por difracción láser. El AOX disuelto fue analizado después de filtrar el elutriado a través de filtro de microfibras de vidrio de porosidad 0.45  $\mu\text{m}$ . El EOX se analizó en la materia depositada en los filtros y se tomaron 54 y 125 ml para su análisis.

## Ensayos físicos

Los tamaños de partícula fueron medidos por el método de difracción láser (UOP, 2007) usando un equipo triláser Microtrac modelo S3500 (Microtrac Inc., Florida, Estados Unidos).

## Análisis químicos

Los EOX de los sedimentos fueron analizados extrayendo por sonicado aproximadamente 1 g de la muestra húmeda con acetato de etilo, pureza > 99.5% (Mallinckrodt Chemicals, Xalostoc, México) (USEPA, 1996). Una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  del extracto fue directamente colocada en el horno de pirólisis, usando una corriente

de  $\text{O}_2/\text{Ar}$  (150:200 ml/min) y el halogenuro de hidrógeno (HX) fue determinado por titulación microcoulométrica con un equipo de combustión/coulombimetría (Mitsubishi TOX 100, COSA Instrument, Norwood, Estados Unidos). Los AOX de las muestras acuosas fueron determinados por el método de combustión/coulombimetría (ISO 9562:2004) después de la adsorción de la solución, a través de un sistema de pasaje de flujo compuesto por columnas de carbón activado. El estándar de calibración de AOX y EOX fue 2,4,5-triclorofenol 98% puro (Aldrich, Francia). El fósforo total fue analizado por el método de digestión sulfonítrica manual, seguida por el método de inyección en flujo (FIA) (Míguez et al., 2009), empleando el equipo QuikChem 8500 (Lachat Instruments, Loveland, Estados Unidos). El límite de detección (LD) fue 6 mg/kg.

El nitrógeno Kjeldahl total fue determinado digiriendo 1g de la muestra de sedimento secada al aire por el método clásico basado en la norma ISO 5663:1984, adaptado a tubos de Kjeldahl semi-micro usando un digestor en bloque de digestión (Gerhardt; GmbH & Co. KG; Königswinter, Alemania) trabajando a 410 °C. La solución fue entonces titulada con HCl 0.01 N con indicador mixto compuesto por verde de bromocresol y rojo de metilo, virando desde el verdoso al violeta grisáceo. LD = 0.7 mg/kg.

El contenido de material orgánico de los sedimentos fue medido en mufla, a 400 °C (Burt, 2004).

## Bioensayos

Los tests ecotoxicológicos *in vivo* e *in vitro* aplicados a los elutriados del sedimento fueron realizados en las condiciones resumidas en la Tabla 1.

La clasificación de las anomalías en embriones y larvas de *P. promelas* fue de acuerdo a Lugowska (2007) y Jezierska et al. (2009) para embriones de Cypriniformes. Se obtuvo fotografías de las larvas normales de *P. promelas* usando lupa binocular Olympus SZ61 y de las larvas anómalas con microscopio óptico Leitz y software Motic images pro Plus 2.0 ML.

Nombre de la especie	<i>Phosphobacterium leiognati</i>	<i>Hyaella curvispina</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Pimephales promelas</i>
Estadio	Cultivo bacteriano	Juvenil (7-14 días)	Neonatos (<24h)	Embriones
Nº organismos	Cultivo bacteriano	10 por acuario	1 neonato por vaso 10 por dilución	10 por acuario
Volumen de muestra	5 ml	100 ml	15 ml	70 ml
Tipo de muestra	Elutriado	Sedimento completo Control con agua de dilución y malla de 625 $\mu\text{m}$	Elutriado	Elutriado
Régimen	Estático	Estático	Renovación diario, semiestático	Renovación diario, semiestático
Nº réplicas	2	4	10	4
Diluciones (%)	80, 40, 20, 10, 5, 2.5	Logarítmica	Geométrica (a partir de 50%)	Geométrica
Punto final	Medida de la luminiscencia	Sobrevivencia y crecimiento	Sobrevivencia y crecimiento	Teratogenicidad; letalidad
Tiempo de exposición	30 min	10 días	Hasta 3 puestas (7-8 días)	7 días
Temperatura (°C)	30±2	23±2	23±2	20±2
Fotoperíodo (luz: oscuridad, horas)	No	16:8	16:8	16:8
Aireación	No	Sí	No	No
Referencias	Manual PCB-Checklight	US EPA 600/R-99/064 Test Method 100.1, 2000, modificado	US EPA 821-R-02-013 Test Method 1002.0, 2002, modificado	US EPA 821-R-02-013 Test Method 1001.0

Tabla 1. Determinación del % de humedad.

## Resultados

### Ensayos físicos y químicos

Como se ve en la Figura 2, las muestras de Nuevo Berlín y de Fray Bentos tuvieron mayor contenido de arcilla y de limo que la de Las Cañas (55.2, 51.5, 27.8 g/100 g, respectivamente).

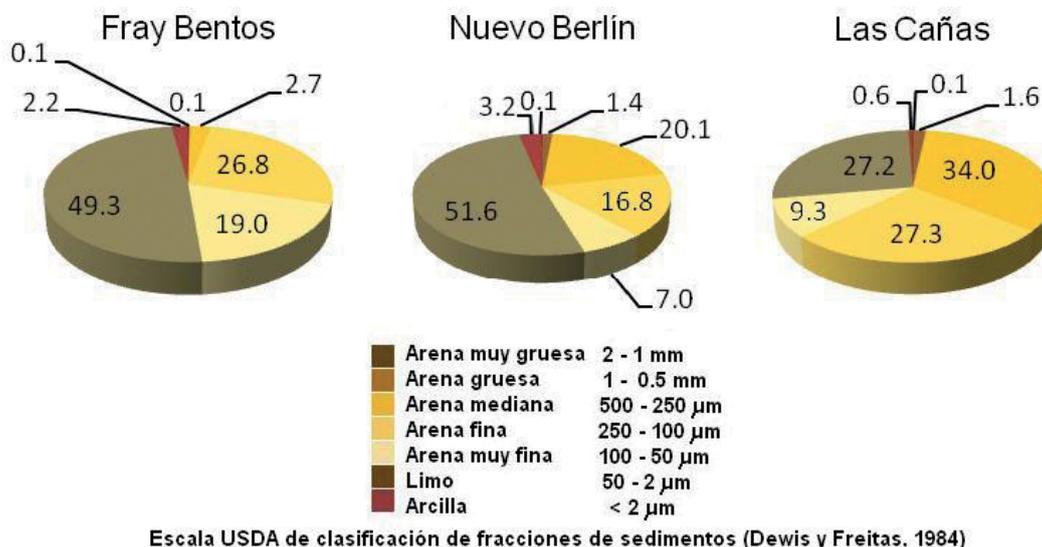


Figura 2. Distribución granulométrica de los sedimentos de la transecta central en tres sitios del Río Uruguay.

Las concentraciones de los nutrientes se expresan en la Tabla 2. La materia orgánica tiene una concentración similar en todos los sitios, pero el fósforo y el nitrógeno son más altos en la muestra de Fray Bentos (2164 mg/kg comparado con 144 mg/kg del control y 290 frente a 151 mg/kg, respectivamente). EOX y AOX fueron no detectables en todos los sitios en las muestras sin enriquecer.

Código de muestra	Fósforo total (mg/kg) (como P)	Nitrógeno Kjeldahl total (mg/kg) (como N)	Materia orgánica (g/100 g)	EOX (como Cl) (mg/kg) (LD: 20ug/kg)	AOX (como Cl) (mg/l) (fase acuosa) (LD: 7ug/L)
Nuevo Berlín	144	151	1,1	ND	ND
Fray Bentos	2164	290	1,0	ND	ND
Las Cañas	457	116	0,6	ND	ND

ND: No detectable - LD: límite de detección

Tabla 2. Análisis químico de las muestras extraídas por draga en tres sitios del Río Uruguay

### Resultados del estudio de fraccionamiento

La concentración adicionada teórica de AOX fue 8.58 mg/l, como Cl. En el elutriado quedó 5.37 mg/l AOX (63%) y el EOX fraccionado entre las partículas (2.31 mg/l; 27%) y el resto en las partículas sedimentadas. Al separarse el elutriado y el sedimento se pudo observar que una parte importante de las partículas más finas (arcilla y limo) permanecieron suspendidas en el líquido y los tamaños de las partículas en suspensión medidos por difracción láser fueron del rango de 1 a 7 μm en un 99%.

## Resultados de los bioensayos

El screening con *P. leighonati* tuvo los siguientes resultados de CI50 a los 30 minutos para toxicidad por metales y compuestos orgánicos, respectivamente: Nuevo Berlín: 19 y 37%; Fray Bentos: 18 y 2% y Las Cañas: 35 y 30%. Se considera que la concentración de inhibición 50% (CI50) es el umbral de toxicidad (manual PCB Checklight).

En el bioensayo con *H. curvispina* en sedimento completo se encontraron diferencias significativas en el peso seco por individuo promedio de las tres muestras analizadas respecto al control (ANOVA,  $p=0,023$ , 95% confianza). Se evaluó la diferencia entre las medias de cada par de datos mediante la prueba de múltiples rangos y se hallaron diferencias significativas entre cada una de las tres áreas contra el control, usando el estadístico de prueba de diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher al 5% de significancia (Steel y Torrie, 1993).

Los resultados para el ensayo de reproducción con *C. dubia* de tres generaciones mostraron que habría efectos crónicos, ya que la concentración de inhibición 25% (CI25%) en Nuevo Berlín fue de 20.3% y en Las Cañas 27.0%, mientras que en Fray Bentos fue >50% (no tóxico en forma crónica para el punto final de reproducción). Software ICPin (USEPA) y ToxCalc.

	Toxicidad crónica		Toxicidad aguda
	CI25 (%)	CL (punto final de tres generaciones)	CL50 (48 h)
<b>Nuevo Berlín</b>	20,3 CI (95) = 12,5-25,0	>50	>50
<b>Fray Bentos</b>	>50	>50	>50
<b>Las Cañas</b>	27,0 CI (95) = 18,4-38,0	40,3 CI (95) = 29,7-54,8	>50

CL: concentración letal - CI: concentración de inhibición

Tabla 3. Resultados con el bioensayo con *C. dubia* de tres generaciones

## Ensayo con *P. promelas* con embriones y larvas

La mortalidad para Nuevo Berlín fue 21.5% y en Fray Bentos, 7.5%. En Las Cañas no hubo mortalidad. En Nuevo Berlín y en Las Cañas no se encontraron individuos que hayan desarrollado malformaciones (Figura 3.A), sin embargo, en la muestra de Fray Bentos se encontró un 3.3% de malformaciones de la espina dorsal ( $n=8$ ), correspondientes a curvatura espinal en la región abdominal (Figura 3.B). Para el elutriado de Fray Bentos se aplicó el test de Kruskal Wallis (Steel y Torrie, 1993) con  $\alpha = 0.05$  en las concentraciones: control 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 el test dio  $KW = 11.6$  y  $p = 0.04$ ,  $p < 0.05$ , lo cual constituye diferencias significativas. El número de malformaciones y mortalidad evidenciadas a la concentración más baja fueron mayores (35%) que a las concentraciones más altas (Gráfico 1).

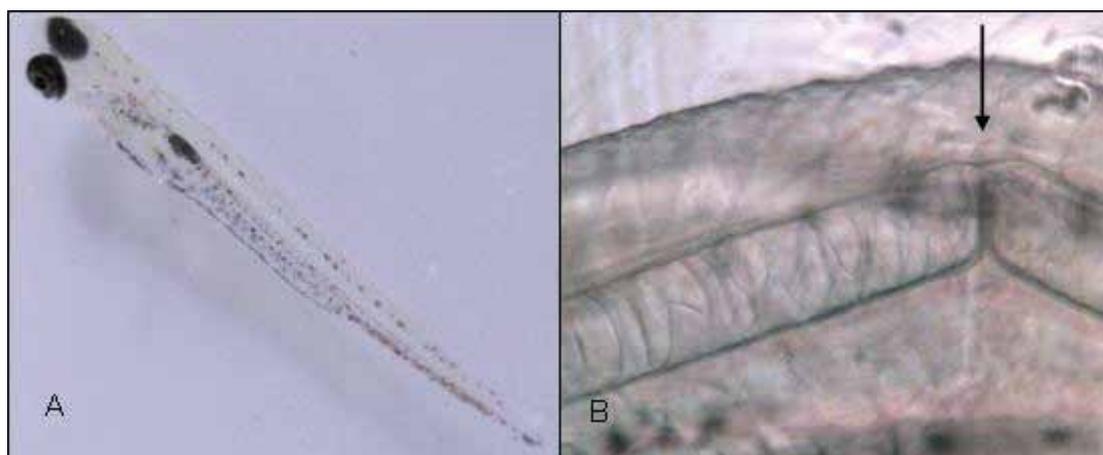


Figura 3. A. Larva de *P. promelas* de 6 días post fecundación (dpf) con desarrollo normal. B. Microfotografía (100x) de la espina dorsal de una Larva de *P. promelas* de elutriado de Fray Bentos de 6 dpf con anomalía de desarrollo en la curvatura de la espina. La flecha señala el punto donde ocurre discontinuidad espinal en la región abdominal.

Los ensayos preliminares para el sitio de Las Cañas no han demostrado ni mortalidad ni teratogenicidad.

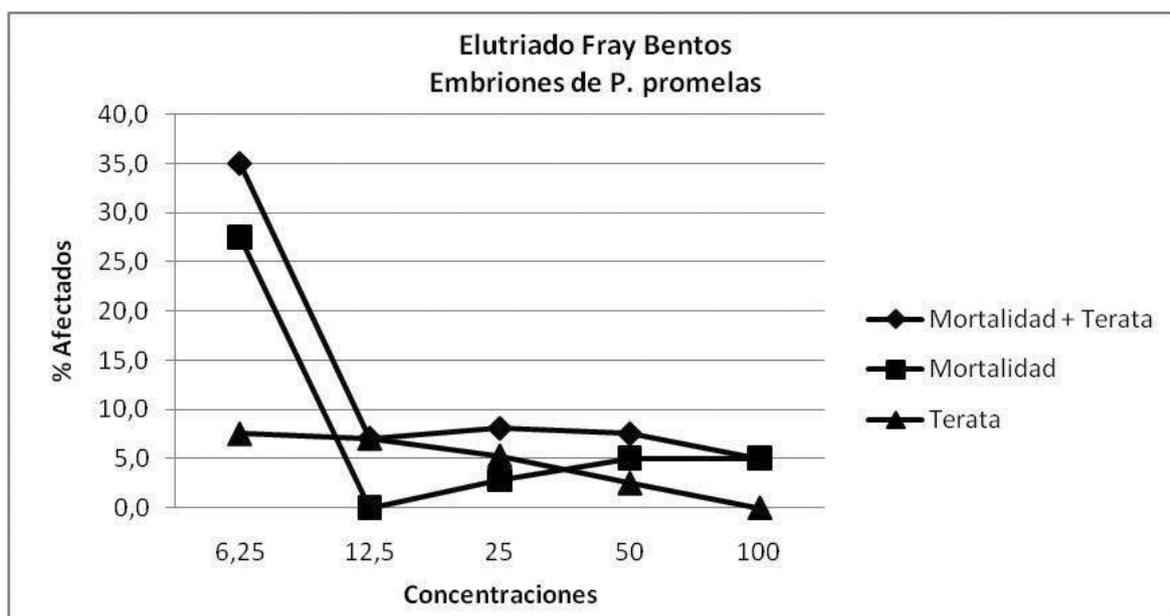


Gráfico 1. Curva dosis-respuesta para los efectos Mortalidad, Teratogenicidad y Mortalidad + Teratogenicidad de embriones de *P. promelas* en muestras de elutriado de sedimento del sitio Fray Bentos

## Discusión

Los análisis químicos en sedimentos demuestran la influencia de las actividades antrópicas ya que el nivel de nutrientes de Fray Bentos fue mayor que en Nuevo Berlín. La proporción de arcilla de los sitios Fray Bentos y Nuevo Berlín es mucho mayor que en Las Cañas, posiblemente concentrando los contaminantes ambientales en esta fracción. El fraccionamiento de EOX y de AOX del compuesto clorado 2,4,5-TCP fue medido demostrando que éste se reparte entre las fases.

De acuerdo a algunos autores, el ensayo de screening *in vitro* con *P. leighonati* es muy sensible (Ulitzur et al., 2002; Broers y Lappalainen, 2004). Nuestros resultados experimentales permitieron detectar toxicidad por metales y compuestos orgánicos en todas las zonas, pero especialmente en el sitio de Fray Bentos.

Los resultados de los bioensayos con *C. dubia* mostraron efectos tóxicos sobre la reproducción en Nuevo Berlín y en Las Cañas.

El crecimiento de *H. curvispina* luego de la exposición a estos sedimentos fue significativamente menor que el crecimiento obtenido en el control. Se postula que dicha disminución podría deberse a la ingestión de partículas de sedimento con contaminantes asociados. Para este bioensayo se encontró que el crecimiento de los organismos fue significativamente menor luego de la exposición a las tres muestras analizadas (Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas), respecto al control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento promedio entre las tres muestras analizadas, lo cual sugiere que un potencial efecto tóxico en estos organismos se podría estar dando por igual para los tres puntos de muestreo.

En el sitio de Fray Bentos fue observado un efecto estadísticamente de borde para el punto final de desarrollo en embriones de peces, consistente en deformaciones de la espina dorsal columna vertebral de frecuencia aún cercana a los valores considerados normales en *P. promelas* (Warner y Jenkins, 2007) y *Cyprinus carpio* (Lugowska, 2007). La curva dosis-respuesta observada para la aparición de las

malformaciones vertebrales sigue un comportamiento no-monotónico. Este hallazgo correlaciona con los encontrados previamente por otros investigadores para estos efectos (Warner y Jenkins, 2006). Aun cuando las malformaciones embrionales en la espina dorsal pudieron haberse producido por causas genéticas u otros factores ambientales, Villeneuve et al. (2005) encontró que valores mayores a 4% de malformaciones podrían ser indicativos de disrupción endócrina. La disrupción endócrina puede no limitarse a puntos de reproducción, ya que los receptores estrogénicos están presentes también en las células óseas. El estrógeno endógeno inicia la expresión de los elementos de respuesta estrogénica en osteoblastos y osteoclastos, regulando la proliferación de células óseas. Entonces, los disruptores estrógenos exógenos pueden interrumpir el control de la osificación (Warner y Jenkins, 2007). La presencia de larvas de peces (n=8) con malformaciones de la curvatura dorsal correlaciona con los hallazgos de Weis y Weis (1987) quienes proponen que el desarrollo del sistema esquelético es uno de los más sensibles a sustancias teratógenas. Las potenciales consecuencias de los defectos espinales producirían una merma en las habilidades de presa, defensa y cortejo (Warner y Jenkins, 2007). Las malformaciones de este tipo en el orden Cipriniformes han sido demostradas con metales tales como cadmio y cadmio/cobre (Lugowska, 2007), y en *P. promelas* Laban et al. (2010) y Warner y Jenkins (2007) obtuvieron similares resultados después de exponer embriones y larvas a nanopartículas de plata y 17 $\alpha$  etinilestradiol y Bisphenol A, respectivamente. Algunos investigadores han extendido el tiempo de exposición a más de 20 días usando *P. promelas* (Warner y Jenkins, 2007) y *Cyprinus carpio* (Lugowska, 2007); demostraron que algunas anomalías se podrían deber a exposición a esta clase de contaminantes. Sin embargo, Lugowska (2007) también encontró algunas malformaciones de este tipo que mejoran después de cultivar las larvas en condiciones óptimas. Los posibles contaminantes causantes de deformidades esqueléticas en peces son variados, incluyendo, entre otros, a metales pesados tales como plomo (Jeziarska et al., 2009), pesticidas organofosforados, dioxinas y bifenilos policlorados (Villeneuve et al., 2005).

## Conclusiones

Los resultados preliminares sugieren que existen indicios de toxicidad y teratogenicidad de origen todavía no claramente establecido, pero que presentan diferente respuesta de toxicidad para los puntos finales incluidos en el experimento según el sitio. Los efectos evidenciados con organismos que se nutren del sedimento así como los de las especies que viven en el agua de columna apuntan a que las rutas de toxicidad en los sedimentos del Río Uruguay analizados no serían solamente a través de las sustancias contaminantes disueltas, sino también a través de las partículas en suspensión.

Este estudio proseguirá evaluando las diferencias de biodisponibilidad y toxicidad entre sitios y las diversas sensibilidades de los organismos ante posibles tóxicos ambientales. El compuesto 2,4,5-TCP se utilizará como modelo e incluirá métodos que miden biomarcadores de disrupción endocrina para proseguir generando evidencias sobre los probables contaminantes ambientales señalados en la identificación de peligros en virtud de las fuentes, receptores y rutas de contaminación más probables. En vista de estos datos preliminares, se continuarán las investigaciones para poder establecer con mayor certeza los vínculos causa-efecto.

## Reconocimientos

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

Los autores agradecen a todo el personal del departamento Aguas y Productos Químicos por su apoyo a las actividades analíticas y al personal del departamento de Medio Ambiente por el muestreo de los sedimentos.

Los autores agradecen al Dr. James Lazorchak y su equipo de USEPA por proporcionar las cepas iniciales de los cultivos de *C. dubia* y *P. promelas*.

Este trabajo se desarrolló como parte de un proyecto de doctorado de investigación PhD de Cranfield University, School of Applied Sciences, Centre for Water Science, Cranfield, UK, apoyado por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

## Referencias

- ATSDR. *Toxicological profile for chlorophenols* [En línea]. Atlanta: ATSDR, s.d. [Consulta: 1 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp107.pdf>
- BROERS, Cam; LAPPALAINEN, J. New developments in the bioluminescence assay [En línea]. En: *Courier du Savoir*. 2004, (5):107-110. [Consulta: 10 de junio de 2010]. Disponible en: <http://www.webreview.dz/IMG/pdf/16-Broers.pdf>.
- BURT, Rebecca. *Soil survey laboratory methods manual*. v. 4.0. Lincoln: NRCS, 2004. (Soil Survey Investigations Reports: 42).
- CHAPMAN, Peter M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. En: *Marine Pollution Bulletin*. 2002,44:7-15
- DEWIS, J.; FREITAS, F. *Métodos físicos y químicos de análisis de suelos y aguas*. Roma: FAO, 1984. (Boletín de Suelos de la FAO; 10).
- HALDER, M.; LEONARD, M.; IGUCHI, T.; ORIS, J.; RYDER, K.; BELANGER, S.; BRAUNBECK, T.; EMBRY, M.; WHALE, G.; NORBERG-KING, T. & LILLICRAP, A. Regulatory aspects on the use of fish embryos in Environmental Toxicology. En: *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2010, 6(3):484-491
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 9562: *Water quality. Determination of adsorbable organically bound halogens (AOX)*. Geneva: ISO, 2004.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 5663: *Water quality. Determination of Kjeldahl nitrogen. Method after mineralization with selenium*. Geneva: ISO, 1984.
- JEZIEWSKA, BARBARA; LUGOWSKA, KATARZYNA; WITESKA, MALGORZATA. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). En: *Fish Physiology and Biochemistry*. 2009, 35:625-640.
- KATAGI, T. Behavior of pesticides in water-sediment systems. En: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2006, 187:133-251.
- KENDAL, R.J. et al. *Ecotoxicology*. En: KLAASSEN, Curtis D.; CASARETT; DOULL'S. *Toxicology: the basic science of poisons*. v. 29. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.
- LABAN, G.; NIES, L.; TURCO, R.; BICKHAM, J.; SEPÚLVEDA, M. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. En: *Ecotoxicology*. 2010, 19:185-195.
- LUGOWSKA, K. The effect of cadmium and cadmium/copper mixture during the embryonic development on deformed common carp larvae [En línea]. En: *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*. 2007, 10(4). [Consulta 1 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue4/art-11.html>
- MARTÍN-DÍAZ, M.L.; RIBA, I.; CASADO-MARTÍNEZ M.C.; DELLVALLS, A. Biodisponibilidad de metales en sedimentos de estuarios españoles utilizando *Carcinus maenas*. En: *Ciencias Marinas*. 2006, 32(2B):412-420
- MIGUEZ, D.; MARTINEZ, M.J.; DOL, I. Desarrollo del método análisis por inyección en flujo para la determinación de fósforo total en sedimentos. En: *1er. Congreso Uruguayo de Química Analítica-CUQA*, (Montevideo 9-10 de setiembre de 2009). Montevideo: s.n., 2009.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NAS. [En línea]. En: *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*. Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, National Research Council. Disponible en: <http://www.nap.edu/catalog/10523.html> [Consulta: 26/10/2010].
- OHLENBUSCH, GERD; KUMKE MICHAEL, U; FRIMMEL, FRITZ H. Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. En: *The Science of the Total Environment*. 2000, 253:63-74.
- SASKI, EIJA. K; MIKKOLA, R; KUKKONEN, JUSSI, V.K.; SALKINOJA-SALONEN, MIRJA S. Bleached Kraft pulp mill discharged organic matter in recipient lake sediment. En: *Environmental Science and Pollution Research*. 1997, 4(4):194-202.
- SIBLEY, P.K.; DIXON, D.G.; BARTON, D.R. Environmental assessment of benthic impacts associated with pulp mill discharges. II. Distribution of sediment EOX in relation to environmental factors. En: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1998, 34:158-166
- STEEL, R.; TORRIE, J. *Bioestadística. Principios y procedimientos*. 2a. ed. México: McGraw-Hill, 1993, 651 pp.
- ULITZUR, S.; LAHAV, T.; ULITZUR, N. A novel and sensitive test for rapid determination of water toxicity. En: *Environmental Toxicology*. 2002, 17:291-296.
- UNESCO; WHO; UNEP. *Water quality assessments: a guide to use of biota, sediments and water in environmental monitoring*. 2nd. ed. London: University Press, 1996.
- UOPA HONEYWELL COMPANY. *UOP methods*. s.l.: UOP, 2007.

- UOP method 856-07.
- UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. [*EPA's sampling and analysis methods*]. [En línea]. Washington: USEPA, [s.d.]. Method 823-R-00-001, 2000. [Consulta 2 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.epa.gov/waterscience/cs/biotesting/bioaccum.pdf>
  - UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. [*EPA's sampling and analysis methods*]. [En línea]. Washington: USEPA, [s.d.]. Method 9023, 1996. [Consulta 2 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/9023.pdf>
  - UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. [*EPA's sampling and analysis methods*]. [En línea]. Washington: USEPA, [s.d.]. Method 823-B-98-004, 1998. [Consulta 2 de julio de 2010]. Disponible en: [http://www.epa.gov/owow/oceans/regulatory/dumpdredged/pdf/itm\\_feb1998.pdf](http://www.epa.gov/owow/oceans/regulatory/dumpdredged/pdf/itm_feb1998.pdf)
  - UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. [*EPA's sampling and analysis methods*]. [En línea]. Washington: USEPA, [s.d.]. Method 821-R-02-013. [Consulta 2 de julio de 2010]. Disponible en: <http://www.epa.gov/>
  - VILLENEUVE, D.L.; CURTIS, L.R.; JENKINS, J.J.; WARNER, K.E.; TILTON, F.; KENT, M. L.; WATRAL, V.G.; CUNNINGHAM, M.E.; MARKLE, D.G.; SETAJINTANIN, D.; KRISANAKRIANGKRAI, O.; JOHNSON, E.R.; GROVE, R.; ANDERSON, K.M. Environmental stresses and skeletal deformities in fish from the Willamette River. En: *Environmental Science and Technology*. 2005, 39(10):3495-3506.
  - VOUSAS, EPAMINONDAS; MAGOULAS, KOSTIS; TASSIOS, DIMITRIOS. Prediction of the bioaccumulation of persistent organic pollutants in aquatic food webs. En: *Chemosphere*. 2002, 48:645-651
  - WARNER, K.; JENKINS, J. Effects of 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Bisphenol A on vertebral development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007, 26(4):732-737.
  - WEIS, J.; WEIS, P. Pollutants as developmental toxicants in aquatic organisms. En: *Environmental Health Perspectives*. 1987, 71:77-85.
-

# Línea de base para evaluar el impacto de una planta de celulosa en el Río Uruguay

Boccardi, L. <sup>(1)</sup>, Clemente, J. <sup>(1)</sup>, Dabezies, M. <sup>(1)</sup>, Ferrari, G. <sup>(1)</sup>, Saizar, C. <sup>(1)</sup>, Míguez, D. <sup>(2)</sup>, Teixeira-de Mello, F. <sup>(3)</sup>, Tana, J. <sup>(4)</sup>.

<sup>(1)</sup> Departamento Medio Ambiente. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Departamento Aguas y Productos Químicos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(3)</sup> Grupo de Ecología y Rehabilitación de Sistemas Acuáticos. CURE - Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(4)</sup> AF - Consult Ltd, Rajatorpantie 8, FI-01600 Vantaa, Finlandia.

Contacto: csaizar@latu.org.uy

Recibido: 15/07/2010 - Aprobado: 26/11/2010

## Resumen

Como parte del proceso de evaluación del impacto ambiental ante la puesta en funcionamiento de la planta de pulpa de celulosa Kraft Botnia (actual UPM), se realizaron estudios de línea de base entre los años 2005 y 2007. El diseño de muestreo incluyó tres transectas perpendiculares a la línea de costa, en tres sitios: Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas. Se realizaron estudios de parámetros físico-químicos del agua (nutrientes, sustancias orgánicas, metales, compuestos orgánicos adsorbibles (AOX), dioxinas y furanos), materia orgánica y granulometría del sedimento, estudios biológicos de las comunidades planctónicas, zoobentónicas e ícticas y bioacumulación de dioxinas en peces. El fósforo en la columna de agua presentó en promedio valores por encima de lo recomendado por la normativa nacional, mientras los contaminantes orgánicos (AOX, clorofenoles, ácidos resínicos, fitosteroles, dioxinas y furanos) se mantuvieron por debajo de los valores guía recomendados a nivel internacional. Las comunidades planctónicas variaron significativamente entre muestreos, la de peces entre sitios y muestreos, mientras que la de bentos no presentó variaciones significativas espaciales ni temporales. El bagre trompudo (*Iheringichthys labrosus*) es propuesto como especie a ser monitoreada debido a su ubicuidad y abundancia. Este trabajo ofrece una visión general de los estudios de línea de base, destacando la multiplicidad y la periodicidad de los parámetros en dos años de estudio.

Palabras clave: Planta celulosa, calidad agua, comunidades biológicas.

## Abstract

In the framework of the environmental impact assessment process undertaken for the commissioning of the Kraft Botnia (currently UPM) paper mill, baseline studies were conducted between 2005 and 2007. The sampling design included three transections perpendicular to the coast line at three sites: Nuevo Berlín, Fray Bentos and Las Cañas. The work included testing of physico-chemical parameters of water (nutrients, organic matter, metals, adsorbable organic compounds (AOX), dioxins and furanes), sediment organic matter and granulometry, biological studies of the planktonic, zoobenthonic and fish communities, and bioaccumulation of dioxins in fish. As an average, phosphorus in the water column presented values above those recommended by the national norms, while organic pollutants (AOX, chlorophenols, resinic acids, phytosterols, dioxins and furanes) remained below the guidance values recommended at an international level. Planktonic communities varied significantly across samplings; fish communities varied between sites and samplings, while the benthos results did not show significant space or time variations. The hag *Iheringichthys labrosus* has been proposed as the most suitable indicator species to be monitored, owing to its ubiquity and abundance. This paper offers an overview of the baseline assessments, highlighting the multiplicity and periodicity of the parameters collected in the course of two years.

Keywords: Paper mill, water quality, biological communities.

## Introducción

Las herramientas más usadas para evaluar impactos en los ecosistemas acuáticos son aquellas basadas en las características físicas, químicas y biológicas (Karr, 1981; Davenport y Sayer, 1993). Las variables fisicoquímicas aportan información referente a las posibles causas de la contaminación, mientras que las comunidades biológicas brindan una visión integrada de los efectos a mediano y largo plazo (Hutson y Roberts, 1994). En las últimas décadas, ha recibido especial atención el uso de indicadores biológicos como una herramienta potencialmente poderosa en la evaluación de la salud ambiental (USEPA, 2002; Hering et al., 2004). La generación temporal y espacial de información físico-química y biológica de forma combinada proporciona una visión general de las características y el funcionamiento del ecosistema, lo cual permite desarrollar o

definir descriptores para evaluar los cambios espacio-temporales del sistema.

El estudio de las condiciones ambientales antes del inicio de una actividad humana se puede definir como estudio de línea de base. Estos estudios se deben realizar a una escala temporal y espacial adecuada para registrar los procesos que regulan la dinámica de las comunidades biológicas, con el fin de compararlo con los datos de seguimiento luego que las actividades hayan comenzado. Los mismos se basan en posteriores comparaciones entre los sitios afectados y los de control, permitiendo determinar la presencia/ausencia de organismos y/o grados de impacto. Los efluentes de plantas de celulosa pueden generar ecotoxicidad y alterar el estado ecológico de un curso de agua. La materia orgánica y los nutrientes aportados por los efluentes pueden producir eutrofización, aumentar la conductividad, acumular taninos y lignina e inclusive alterar el curso de agua desde el punto de vista microbiológico (Karrash et al., 2006). Los efectos

de toxicidad crónica incluyen efectos de disrupción endocrina que pueden ocasionar cambio del sexo de los peces (Larsson y Forlin, 2002). Algunos de los posibles compuestos responsables serían los ácidos resínicos y los esteroides provenientes de la degradación de la lignina, así como también los compuestos orgánicos clorados tales como dioxinas y furanos y clorofenoles provenientes del blanqueo de la celulosa (Ali y Sreerkrishnan, 2001).

El Río Uruguay es un curso de agua internacional cuya cuenca hidrográfica forma parte de los territorios de Argentina, Brasil y Uruguay, abarcando un área de aproximadamente 339.000 km<sup>2</sup>. Tiene una longitud de 1.800 km y se extiende desde la Sierra do Mar (Brasil) hasta su desembocadura en el Río de la Plata. Aproximadamente el 30% corresponde al tramo binacional uruguayo-argentino, el cual se encuentra administrado por la Comisión Administradora del Río Uruguay (CARU), órgano binacional formado en 1975 a partir de la suscripción del "Estatuto del Río Uruguay" (CARU, 2009). Los estándares de calidad del agua que se deben cumplir en el Río Uruguay son los propuestos por el Digesto de la Calidad del Río Uruguay de la CARU. La normativa define estándares de calidad clasificados en cuatro clases, en base a los usos preponderantes de las aguas del río: abastecimiento público, recreación, actividades agropecuarias y conservación y desarrollo de la vida acuática. En el caso de los parámetros que no están incluidos en la normativa nacional se usan como referencia niveles guía internacionales, principalmente los valores guía de calidad de agua recomendados por organismos ambientales canadienses.

Este trabajo resume los resultados de los estudios de línea de base de calidad del agua y comunidades biológicas (plancton, bentos y peces) realizados por el LATU durante los años 2005 a 2007, en la zona donde posteriormente fue instalada una fábrica de celulosa (tramo inferior del Río Uruguay).

## Materiales y Métodos

El área de estudio se ubica en el tramo inferior del Río Uruguay, que se extiende entre el embalse de Salto Grande y la Punta Gorda, en el departamento de Colonia. Las muestras fueron obtenidas en tres zonas de este tramo (Figura 1). La primera zona se encuentra a la altura de la ciudad de Nuevo Berlín, 30 km al norte de la planta de celulosa. La zona Fray Bentos y la bahía de Yaguareté se ubican junto a la proyectada descarga de los efluentes de la planta y Las Cañas se sitúa 15 km aguas abajo de la planta. En los muestreos de calidad de agua se adicionó un punto a la altura del puente internacional de Fray Bentos, 3 km al norte de la planta de celulosa (marcado con una línea negra en la Figura 1).



Figura 1. Ubicación de las zonas de estudio en el Río Uruguay. La línea negra marca la ubicación del puente internacional.

El período de estudio se extendió de abril de 2005 a abril de 2007 para los parámetros de calidad de agua y la comunidad de peces, y de julio de 2006 hasta abril de 2007 para la calidad de sedimento y las comunidades de plancton y bentos. La frecuencia de estudio fue mensual para los parámetros de calidad de agua y estacional para las comunidades biológicas y sedimentos (Tabla 1).

Tipo de muestreo	Frecuencia	Meses
Calidad de agua	Mensual	Abril 2005 - Abril 2007
Plancton	Estacional	Julio 2006, Noviembre 2006, Febrero 2007, Abril 2007
Bentos y sedimento	Estacional	Julio 2006, Noviembre 2006, Febrero 2007, Abril 2007
Peces	Semestral	Abril (2005, 2006, 2007), Diciembre (2005, 2006)

Tabla 1. Frecuencia de los diferentes tipos de muestreo.

Las muestras para el monitoreo mensual de la calidad del agua fueron tomadas de forma directa de la capa subsuperficial del río, preservadas y analizadas en laboratorio en base a métodos estandarizados y acreditados (Tabla 2). En la Tabla 2 se presentan los parámetros analizados en el muestreo mensual de calidad de agua. Las muestras de microcistina se obtuvieron en enero y febrero de 2006 en el marco del monitoreo de calidad de agua, mediante la metodología planteada por Lawton (1994). En el marco de los estudios de la comunidad de peces se tomaron muestras de agua para analizar fenoles clorados, ácidos resínicos, fitoesteroides y dioxinas. En el sedimento se analizó la granulometría y materia orgánica por medio de las metodologías planteadas por Burt (2004) y USEPA (1995), respectivamente.

Para el estudio de las comunidades biológicas y calidad del sedimento, el diseño de muestreo constó de tres transectas perpendiculares a la línea de costa (aproximadamente 300 m de distancia entre ellas) en cada una de las zonas de estudio descritas. Las muestras cuantitativas de plancton fueron obtenidas en tres puntos (litoral, central y canal) de la transecta central con botella Van Dorne, realizando sucesivas extracciones en la capa eufótica hasta obtener 40 litros de agua. Se obtuvieron muestras para fitoplancton, fijadas con lugol, y el volumen restante fue filtrado por una red de 63 µm de malla para analizar zooplancton. Las muestras cualitativas se colectaron mediante arrastre oblicuo subsuperficial con redes de 20 y 63 µm de malla, para fitoplancton y zooplancton, respectivamente. Las muestras de zooplancton y cualitativas de fitoplancton fueron fijadas *in situ* con formaldehído al 4%.

Las muestras de plancton fueron analizadas bajo microscopio invertido (100-1000X) con la metodología de Utermöhl (1958) en cámaras de sedimentación de 5, 10 y 25 ml (fitoplancton) y las de zooplancton en cámaras SedgwickRafter y de Bogorov. Se calculó la densidad de organismos por unidad de volumen: el fitoplancton en células/ml y el zooplancton en organismos/litro.

Las muestras para calidad de sedimento y análisis de macrozoobentos fueron obtenidas en todos los puntos de las tres transectas definidas con draga Petit Ponar. Las muestras de sedimentos fueron conservadas en frío y las biológicas fueron tamizadas en campo por una malla de 500 µm de abertura y preservadas en alcohol al 70%. Los organismos fueron identificados y cuantificados bajo lupa estereoscópica Arcano hasta el nivel taxonómico de familia y se calculó la densidad como individuos/m<sup>2</sup>. Para evaluar diferencias espaciales (zonas y sitios) y temporales (entre muestreos) de las comunidades planctónicas y bentónicas se realizaron análisis no paramétricos de varianza (ANOSIM) con las matrices de densidad de cada comunidad.

Los muestreos de la comunidad de peces y los estudios en bilis de peces fueron realizados en las mismas zonas que los estudios de calidad de agua, plancton y bentos (Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas). Los resultados son expresados como captura por unidad de esfuerzo (CPUE). Los primeros tres muestreos fueron de ajuste de la metodología, sobre todo del número de redes a utilizar. En estos muestreos los peces colectados no se separaron por réplicas. Finalmente, el muestreo se estandarizó y se ha mantenido desde diciembre de 2006 de la siguiente manera: se utilizaron ocho series de redes Nórdicas estandarizadas según la norma EVS-EN 14757:2005 en cada uno de los sitios; cada una tiene 30 m de largo y 1.5 m de alto y están compuestas por 12 tramos de 2.5 m con diferentes tamaños

de malla (5,0, 6,25, 8,0, 10, 12,5, 15,5, 19, 5, 24, 29, 35, 43 y 55 mm entre nudos). En esta estandarización del muestreo se trató de cubrir un amplio rango espacial y temporal. Espacialmente, se optó por colocar en cada sitio cuatro de las redes en la zona litoral (aproximadamente 100 metros de la línea de costa) y cuatro redes en una zona más aguas abiertas (aproximadamente 300-500 metros de la línea de costa). Temporalmente, en cada época de muestreo, el procedimiento se repite exactamente igual siete días después; por lo tanto el esfuerzo de muestreo final en cada sitio es de 16 redes. Los datos que se muestran en este trabajo son la media de las CPUE, agrupando las capturas de esta secuencia espacial y temporal. Las redes fueron caladas durante 12 horas desde las 8 p.m. hasta las 8 a.m.

En función de la selección del Bagre trompudo como especie indicadora se estudiaron el índice somático, factor de condición e

índice gonadosomático en las tres zonas, en abril de 2007, en hembras de las clases de tamaño 15-22 capturadas en las tres áreas de estudio. Los resultados se compararon con el test de Kruskal-Wallis para un límite de confianza del 95%.

Las muestras de bilis fueron colectadas en diferentes especies, con jeringa de 1 ml y luego depositadas en vial de 5 ml con membrana de teflón. Se tomó una muestra compuesta para cada especie seleccionada a partir de 3-8 peces, lo cual dependió del tamaño de los individuos. Por otra parte, se tomaron muestras de músculo compuestas (3-5 peces) en diferentes especies para el análisis de dioxinas. Las muestras de músculo de aproximadamente 200 g, que corresponden a una sección transversal en la zona media del pez, se guardaron en papel de aluminio y se congelaron.

Parámetro	Método	LD (mg/l)
Temperatura	Medido in situ con termocupla, basado en APHA 2550B	NA
Conductividad	PEC.PQAR.112, basado en ISO 7888-1985-05-15	NA
pH	PEC.PQAR.101, basado en APHA 4500H <sup>+</sup> B	NA
Color (como Pt)	ISO 7887 20 ed., Sección 4	2,5
Oxígeno disuelto (como O <sub>2</sub> )	ISO 5814:1990	0,2
Turbiedad (FNU)	ISO 7027:1999	0,05
Sólidos disueltos totales	PEC.PQAR004, basado en APHA 2540C	6
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	PEC.PQAR006, basado en APHA 2540D, equivalente a ISO 11923:1997	5
Dureza total (como CaCO <sub>3</sub> )	PEC.PQAR106, basado en APHA 2340C, equivalente a ISO 6059-1984 (E)	0,6
Cloruros (como Cl)	ISO 10304/1-1992	0,2
Sulfatos (como SO <sub>4</sub> )	ISO 10304/1-1992	0,1
Nitrato (como N)	ISO 10304/1-1992	0,06
Nitrito (como N)	ISO 6777:1984 (E)	0,002
Nitrógeno Kjeldahl total (como N)	ISO 5663-1984 (E) / ISO 6778:1984	0,5
Nitrógeno total (como N)	ISO 905-2, con electrodo	0,5
Amonio (como N)	ISO 6778:1984	0,05
Fósforo total (como P)	ISO 6878:2004	0,005
Fósforo soluble (como P)	ISO 10304/1-1992 y APHA 4500-P-D	0,0002
Sílice reactiva soluble (como SiO <sub>2</sub> )	APHA 4500-SiO <sub>2</sub> C	0,001
Cromo hexavalente (como Cr)	APHA 3500 Cr B	0,05
Sulfuros disueltos (como S)	ISO 10530	0,007
Mercurio	ISO 5666 (CVACOMO)	0,0002
Sodio	ISO 9964-1 (FACOMO)	0,010
Potasio	ISO 9964-2 (FACOMO)	0,020
Cobre	ISO 8288 (FACOMO)	0,006
Zinc	ISO 8288 (FACOMO)	0,004
Manganeso	ISO 8288 (FACOMO) adapted-ISO 15587-2 Annex C (Nitric acid digestion)	0,008
Hierro	ISO 8288 (FACOMO) adapted-ISO 15587-2 Annex C (Nitric acid digestion)	0,011
Oxidabilidad (Índice de permanganato) (como O <sub>2</sub> )	ISO 8467:1993 (E)	0,5
Demanda Química de Oxígeno (DQO, como O <sub>2</sub> )	ISO 15705:2002	0,014
Carbono orgánico total (como C)	USP29, ISO 8245	0,15
Demanda Bioquímica de Oxígeno (cDBO <sub>5</sub> , como O <sub>2</sub> )	ISO 5815/2:2003 (E)	0,5
Aceites y grasas	APHA 5520 D	10
Sustancias fenólicas (como C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH) (µg/l)	ISO 6439:1990	0,001
Compuestos orgánicos adsorbibles (AOX)	EN ISO 9562:2004	0,008

Tabla 2. Parámetros de calidad de agua estudiados, métodos usados y límites de detección (LD) (NA: No aplica).

## Resultados

La variación de los parámetros medidos se presenta en la Tabla 3. Las concentraciones de nitrato fluctuaron entre 0.04 y 1.4 mg/l y las de fósforo total entre 0.01 y 0.6 mg/l.

Parámetro	Unidad	Nuevo Berlín	Puente	Fray bentos	Las Cañas
Temperatura	°C	21,7/14,7-32,5	21,8/14,9-31,5	21,8/14,8-30,7	21,6/14,8-29,8
Oxígeno disuelto	mg/l	8,5/6,8-9,8	8,6/7,2-9,7	8,5/7,4-9,7	8,6/7,4-9,9
Conductividad	μS/cm	69/49-109	69/48-149	69/54-103	75/53-153
pH		7,5/7,0-8,3	7,6/7,0-9,1	7,7/7,1-9,0	7,6/7,0-9,2
Color (como Pt)	mg/l	73/30-125	75/30-125	74/30-125	73/30-125
Turbiedad (FNU)	FNU	19,3/7,2-36,9	20,5/9,3-59,0	17,8/9,4-35,0	21,4/8,5-49,0
Sólidos suspendidos totales (mg/l)	mg/l	12,0/<5-28,5	11,0/<5-32,5	8,6/<5-18,6	14,3/<5-60,3
Sólidos disueltos totales	mg/l	76,7/16,5-145,0	73,5/27,5-158,0	75,7/27,5-136,0	78,9/29,5-128,0
Carbono orgánico total (como C)	mg/l	3,0/1,5-5,8	3,2/1,5-7,5	3,1/0,6-5,8	3,4/0,8-15,7
DBO <sub>5</sub>	mg/l	1,6/<0,5-4,8	1,8/<0,5-5,2	1,8/<0,5-5,7	2,0/<0,5-15,7
Nitrógeno total (como N)	mg/l	0,67/0,01-2,4	0,64/0,07-2,20	0,70/0,04-2,00	0,80/0,07-2,40
Fósforo total (como P) <sup>□</sup>	μg/l	68/26-121	70/11-197	66/25-118	68/27-103
Nitrato	mg/l	0,51/0,12-1,04	0,54/0,05-1,12	0,53/0,07-1,430	0,51/0,04-1,00
Nitrito	μg/l	9,5/1,3-44,8	8,8/1,5-40,0	9,1/1,7-31,3	6,9/0,9-32,3
Amonio	μg/l	97,5/ND-260,0	171,1/ND-540,0	111,1/ND-320,0	137,0/ND-360,0
Fósforo soluble (como P)	μg/l	37,2/8,0-93,9	30,3/4,6-90,8	30,6/6,9-82,0	35,7/5,5-80,3
Cloruro	mg/l	2,3/1,1-4,9	2,3/1,1-9,0	2,2/1,1-6,2	2,3/1,1-5,6
Sulfato (como SO <sub>4</sub> )	mg/l	1,6/0,9-4,1	1,7/0,9-6,8	1,7/0,8-3,1	1,9/0,9-3,5
Sílice reactiva	mg/l	15,4/11,5-17,2	15,1/8,4-17,1	15,1/7,2-17,4	14,9/4,0-17,5
Hierro	mg/l	1,4/0,4-4,5	1,4/0,4-4,5	1,4/0,6-3,9	1,4/0,5-3,5
Potasio	mg/l	1,7/1,1-2,8	1,7/1,1-2,8	1,7/0,7-4,2	1,9/1,2-3,6
Sodio	mg/l	3,3/1,7-5,9	3,3/1,7-5,7	3,3/1,9-5,7	3,8/2,0-6,0
Microcistina	μg/l	0,41/<0,03-0,79	7,17/0,16-14,1	0,46/0,45-0,46	0,45/0,24-0,66

Tabla 3. Valores promedio, mínimo y máximo de los parámetros fisicoquímicos estudiados durante los estudios de línea de base.

El oxígeno disuelto fluctuó entre 7 y 10 mg/l y el fósforo soluble varió entre 4,6 μg/l (Puente, julio de 2006) y 116,0 μg/l (Puente, setiembre de 2007) (Gráfico 1). Los resultados de las medidas de sustancias orgánicas en agua (compuestos orgánicos adsorbibles: AOX, compuestos clorofenólicos, ácidos resínicos, dioxinas y furanos) se presentan en la Tabla 4.

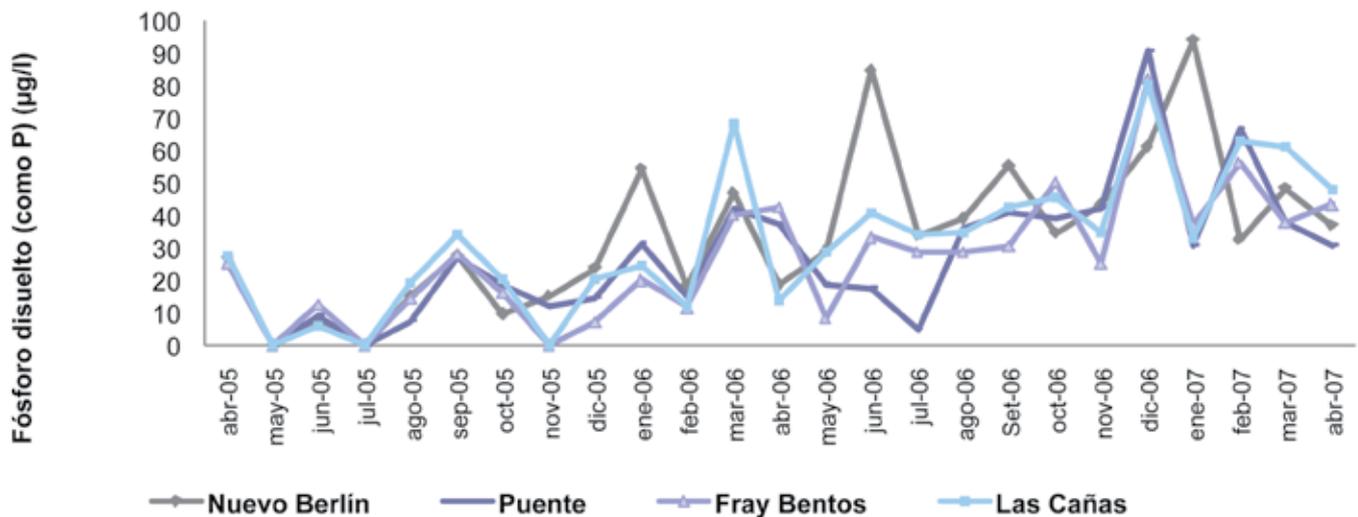


Gráfico 1. Concentración de fósforo soluble del agua en los muestreos realizados.

Parámetro	AOX µg/l	Cl-P µg/l	RA µg/l	Fitosteroles µg/l	PCDD/PCDF WHO-TEQ pg/l
Nuevo Berlín	8-11	0,089-0,104	27-224	ND-22	0,00-0,60
Fray Bentos	6-12	0,080-0,114	6-183	ND-2	0,00-0,89
Las Cañas	<5-12	0,089-0,185	3-202	ND-8	0,00-0,96

Tabla 4. Concentración de AOX, clorofenoles (Cl-P), ácidos resínicos (RA), fitosteroles y dioxinas y furanos (PCDD/PCDF) en agua del Río Uruguay en el período de línea de base.

Durante el período de estudio la comunidad de fitoplancton estuvo representada por 110 taxa, distribuidos en seis clases: Cyanophyceae, Dinophyceae, Euglenophyceae, Chlorophyceae, Bacillariophyceae y Cryptophyceae. El grupo dominante durante la mayor parte del período de estudio fueron Cryptophyceae (fitoflagelados nanoplantónicos <30 µm), pero en verano dominaron las cianobacterias. La densidad de fitoplancton presentó un valor mínimo de 32 cél/ml (julio de 2006, en Nuevo Berlín) y un máximo de 4.451 cél/ml (enero de 2007, en Fray Bentos) (Gráfico 2).

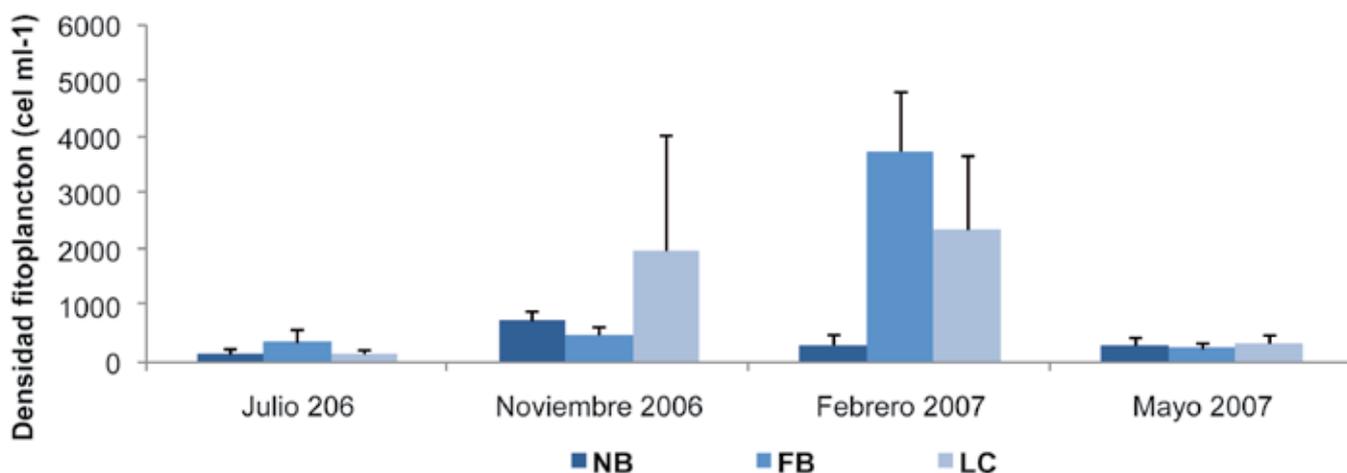


Gráfico 2. Densidad de fitoplancton (cél ml-1) en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

En la comunidad de zooplancton se encontraron 58 taxa, distribuidos en 36 de Rotíferos, 11 de Cladóceros, 7 de Copépodos y 4 taxa de otros grupos meroplantónicos, principalmente larvas del molusco *Limnoperna fortunei*. La comunidad zooplanctónica presentó variación estacional con valores mínimos de densidad en julio de 2007 (0,16 org/l en Nuevo Berlín) y máximos en mayo de 2007 (67,5 org/l en Las Cañas) (Gráfico 3). Esta comunidad presentó una variabilidad estacional definida por dominancia de organismos de menor tamaño (Rotíferos y nauplios de Copépodos) en otoño e invierno, aumento de organismos mayores en primavera (Cladóceros y larvas de *Limnoperna fortunei*) y codominancia de los diferentes grupos en verano.

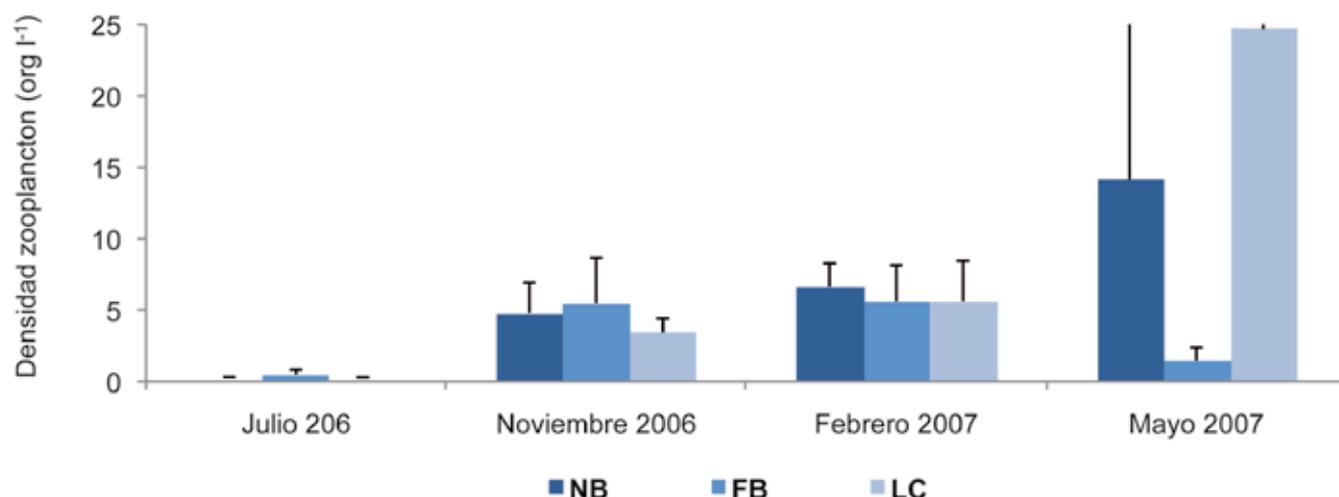


Gráfico 3. Densidad de zooplancton (org l<sup>-1</sup>) en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

La estructura granulométrica de los sedimentos en la zona de estudio varió entre arena gruesa y limo, predominando las fracciones de arena media, fina y muy fina. Los valores promedio de materia orgánica en sedimentos fueron mayores en octubre (2,87%), mientras que mayo fue el mes que presentó menores valores (0,59%). Durante el período de estudio se identificaron un total de 18 familias de macroinvertebrados bentónicos. Las más frecuentes pertenecieron a las clases Insecta, con un total de nueve familias (Chironomidae, Ceratopogonidae, Empidae, Leptoceridae, Caenidae, Polymitarcidae, Ephemeridae, Elmidae y Gomphidae) y a los moluscos, representados por seis familias. En el período indicado, la densidad de organismos varió entre 9.252 ind/m<sup>2</sup> en abril de 2007 y 30.677 ind/m<sup>2</sup> en octubre de 2006. La familia Mytilidae, representada por la especie *Limnoperna fortunei*, fue la que registró las mayores abundancias (Gráfico 4).

En la Tabla 5 se presentan los resultados de los análisis no paramétricos de varianza de las comunidades planctónicas y bentónica. Se analizó la diferencia entre los sitios de muestreo (Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas), las zonas (litoral, central y canal) y entre muestreos.

Diferencias		RGlobal	P(%)
Fitoplancton	Entre sitios (NB, FB, LC)	-0,108	0,9
	Entre zonas (litoral, central, canal)	-0,100	0,9
	Entre muestreos	0,926	0,1
Zooplancton	Entre sitios (NB, FB, LC)	-0,006	0,5
	Entre zonas (litoral, central, canal)	-0,016	0,6
	Entre muestreos	0,667	0,1
Zooplancton	Entre sitios (NB, FB, LC)	0,032	2,3
	Entre zonas (litoral, central, canal)	0,038	0,8
	Entre muestreos	0,052	0,3

Tabla 5. Resultados de los análisis no paramétricos de varianza (ANOSIM) de las comunidades planctónicas y bentónica. (NB: Nuevo Berlín, FB: Fray Bentos, LC: Las Cañas).

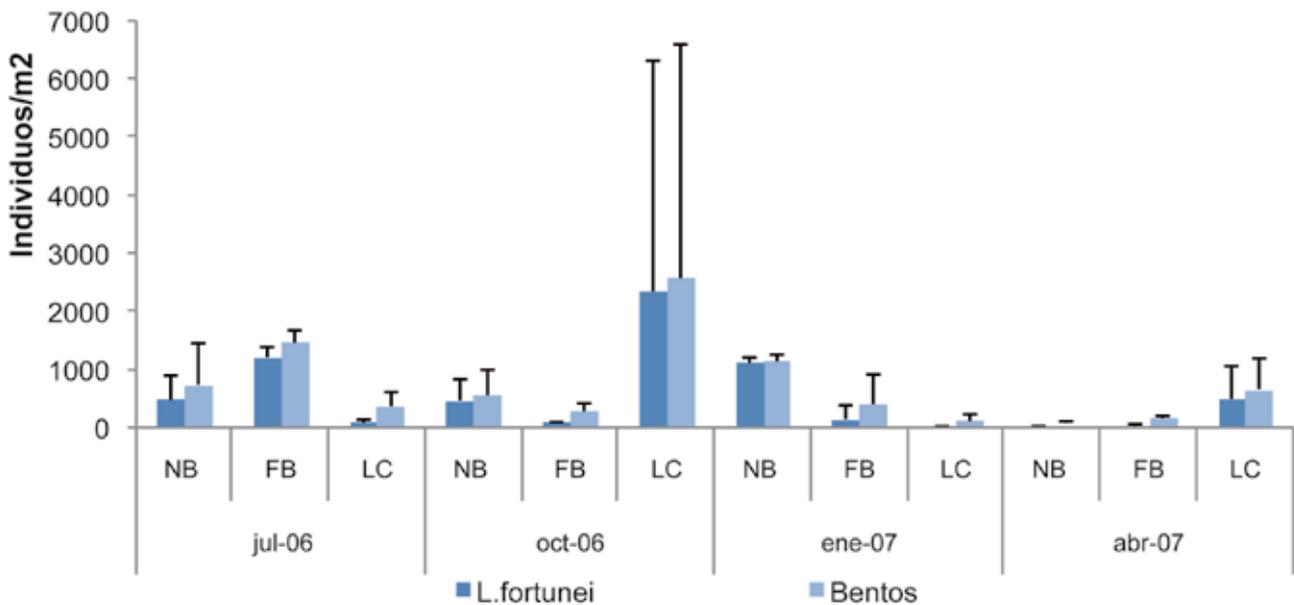


Gráfico 4. Densidad de macrozoobentos y de la especie *Limnoperna fortunei* (ind m<sup>-2</sup>) en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

El número de especies capturadas en este estudio en las tres áreas asciende a 56 (Tabla 6) y el número de especies se muestra en el Gráfico 5. Las especies más comunes capturadas en este estudio fueron el Bagre trompudo (*Iheringichthys labrosus*), Corvina de río (*Pachyurus bonariensis*), Bagre amarillo (*Pimelodus aff. maculatus*), Bagarito (*Parapimelodus valenciensis*), Vieja (*Paraloricaria vetula*), Vieja (*Loricariichthys melanocheilius*), Virolito (*Apareiodon affinis*), Anchoa de río (*Lycengraulis grossidens*) y varias especies de mojarra (*Characidae*). Todas ellas han estado presentes en los cinco muestreos realizados.

Excepto en el muestreo de mayo de 2006, el sitio con menor número de especies fue Las Cañas, con una variación de entre 16 y 27. En el área Nuevo Berlín el número de especies varió entre 13-32 y en la bahía Yaguareté (zona de la planta), entre 26 y 30 (Gráfico 5). La media de las capturas, individuos/red y kg/red, es presentada en los Gráficos 6 y 7; se destacan el bajo número y biomasa en el área Las Cañas.

Orden	Familia	Especie	Nombre común	
Clupeiformes	Engraulidae	<i>Lycengraulis grossidens</i>	Anchoita	
	Pristigasteridae	<i>Pellona Flavipinnis</i>	Lacha	
Characiformes	Parodontidae	<i>Apareiodon affinis</i>	Virolo	
	Curimatidae	<i>Cyphocharax spilotos</i>	Sabalito	
		<i>Cyphocharax platanus</i>	Sabalito	
		<i>Steindachnerina brevipinna</i>	Sabalito	
	Prochilodontidae	<i>Prochilodus lineatus</i>	Sábalo	
	Anostomidae	<i>Schizodon nasutus</i>	Boga	
		<i>Leporinus striatus</i>	Trompa colorada	
		<i>Leporinus obtusidens</i>	Boga	
	Characidae	<i>Astyanax aff. abramis</i>	Mojarra	
		<i>Astyanax eigenmanniorum</i>	Mojarra	
		<i>Astyanax aff. fasciatus</i>	Mojarra	
		<i>Bryconamericus iheringii</i>	Mojarra	
		<i>Bryconamericus stramineus</i>	Mojarra	
		<i>Oligosarcus jenynsii</i>	Dientudo	
		<i>Oligosarcus oligolepis</i>	Dientudo	
		<i>Cynopotamus argenteus</i>	Dientudo jorobado	
		<i>Galeocharax humeralis</i>	Dientudo jorobado	
		<i>Cheirodon interruptus</i>	Mojarra	
		<i>Heterocheirodon yatai</i>	Mojarra	
		<i>Brycon orbignyianus</i>	Salmón criollo	
		<i>Salminus brasiliensis</i>	Dorado	
		<i>Serrasalmus maculatus</i>	Piraña	
		<i>Pygocentrus nattereri</i>	Piraña	
Acestrorhynchidae		<i>Acestrorhynchus pantaneiro</i>	Dientudo paraguayo	
Cynodontidae	<i>Rhaphiodon vulpinus</i>	Machete		
Erithrynidae	<i>Hoplias aff. malabaricus</i>	Tararira		
Siluriformes	Loricariidae	<i>Hypostomus alatus</i>	Vieja de agua	
		<i>Hypostomus commersoni</i>	Vieja de agua	
		<i>Hypostomus laplatae</i>	Vieja de agua	
		<i>Pseudohemiodon devincenzii</i>	Vieja de agua	
		<i>Ricola macrops</i>	Vieja de agua	
		<i>Paraloricaria vetula</i>	Vieja de látigo	
		<i>Loricariichthys edentatus</i>	Brujita	
		<i>Loricariichthys melanocheilus</i>	Vieja de agua	
	Aspredinidae	<i>Bunocephalus</i> sp.	Guitarrero	
	Heptapteridae	<i>Rhamdia quelen</i>	Bagre negro	
		<i>Pimelodella gracilis</i>	Burrito	
	Pimelodidae	<i>Iheringichthys labrosus</i>	Bagre trompudo	
		<i>Pimelodus aff. maculatus</i>	Bagre pintado	
		<i>Pimelodus albicans</i>	Bagre blanco	
		<i>Luciopimelodus pati</i>	Patí	
	Auchenipteridae	<i>Trachelyopterus teaguei</i>	Torito	
		<i>Auchenipterus nuchalis</i>	Buzo	
		<i>Ageneiosus militaris</i>	Manduvi	
		<i>Ageneiosus inermis</i>	Manduva	
	Dorariidae	<i>Rhinodoras dorbignyi</i>	Marieta	
	Gymnotiformes	Sternopygidae	<i>Eigenmannia virescens</i>	Banderita
		Gymnotidae	<i>Gymnotus</i> sp.	Señorita
	Atheriniformes	Atherinopsidae	<i>Odontesthes perugiae</i>	Pejerrey
<i>Odontesthes humensis</i>			Pejerrey	
Perciformes	Cichlidae	<i>Crenicichla minuano</i>	Cabeza amarga	
		<i>Crenicichla missioneira</i>	Cabeza amarga	
		<i>Crenicichla vittatta</i>	Cabeza amarga	
	Sciaenidae	<i>Pachyurus bonariensis</i>	Corvina de río	
Pleuronectiformes	Achiridae	<i>Catathyridium jenynsii</i>	Lenguado	

Tabla 6. Listado de especies de peces (nombre científico y común) encontradas durante el período de estudio.

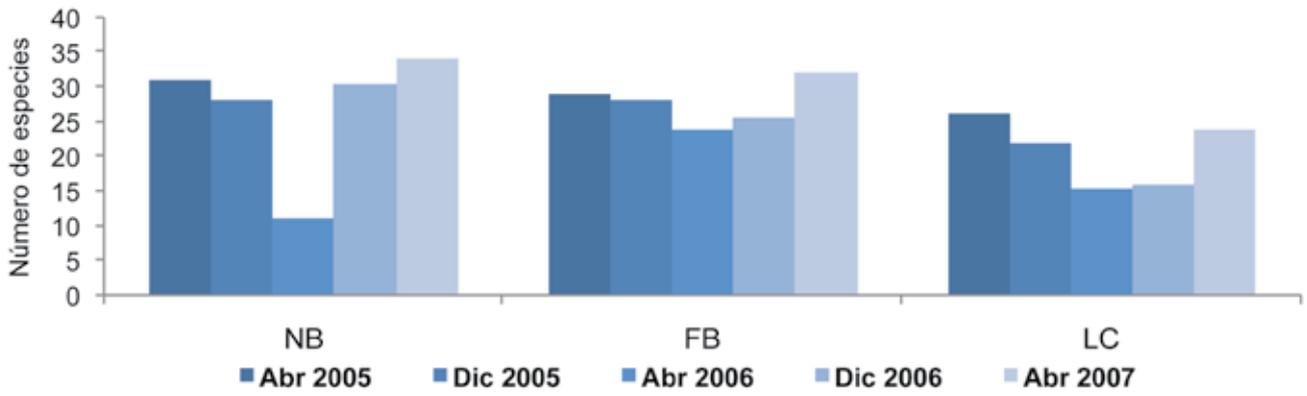


Gráfico 5. Número de especies de peces capturadas en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

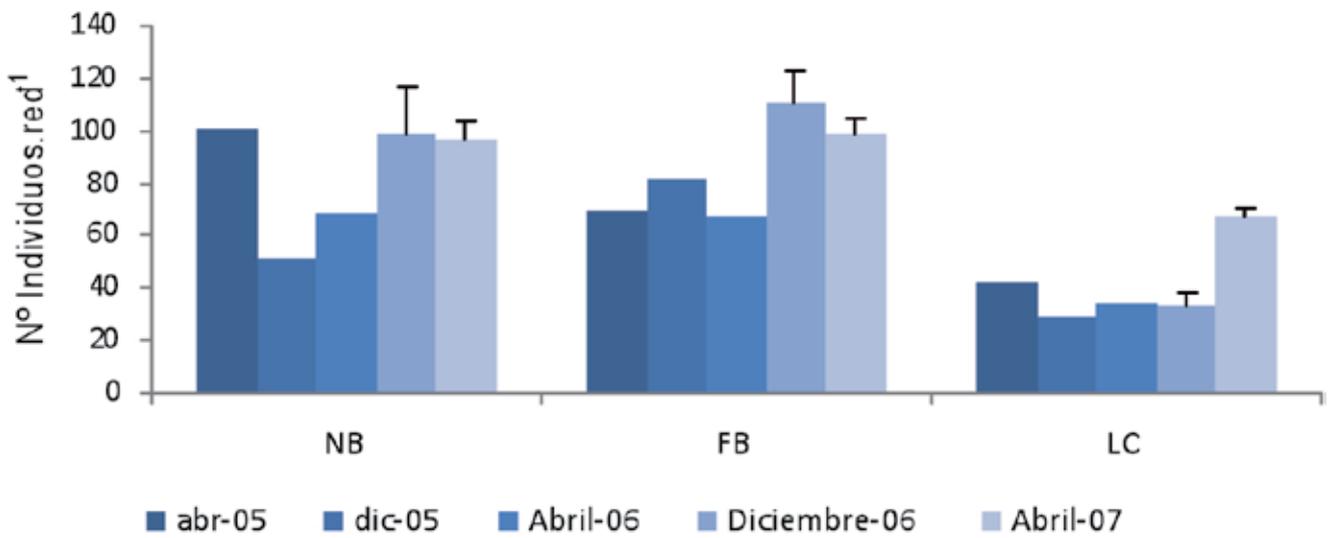


Gráfico 6. Comparación de las capturas promedio (individuos/red) en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

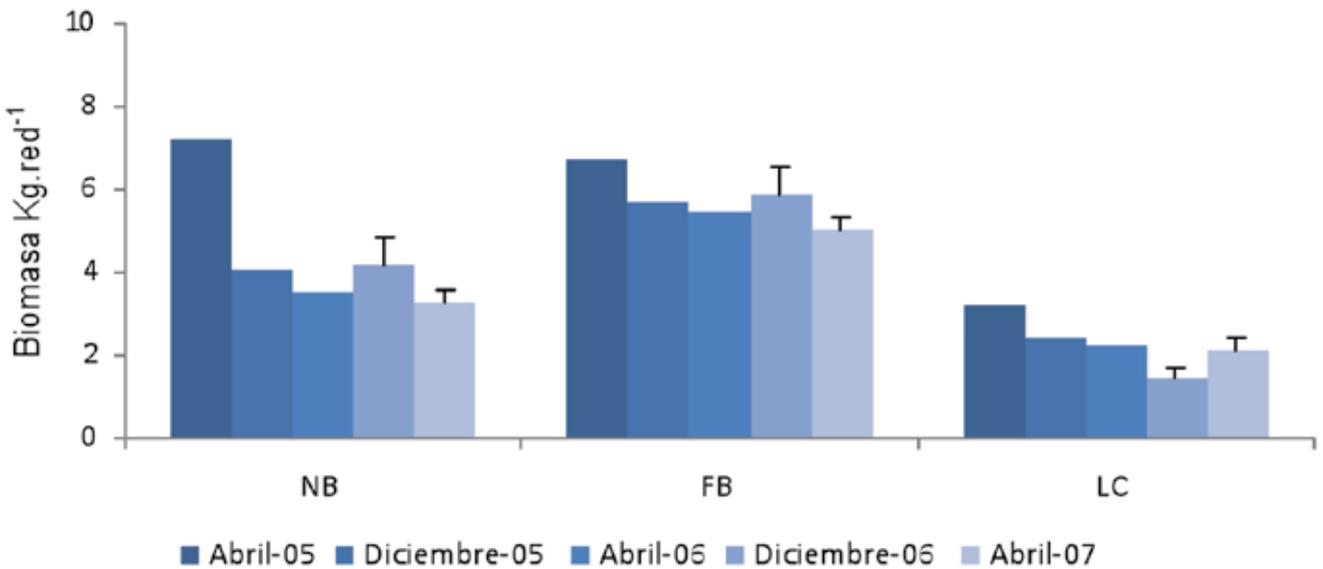


Gráfico 7. Comparación de unidades de captura (kg/red) en NB (Nuevo Berlín), FB (Fray Bentos) y LC (Las Cañas) durante el período de estudio.

En función de la selección del Bagre trompudo como especie indicadora se estudiaron índice somático, factor de condición e índice gonadosomático en las tres zonas, en abril de 2007 (Tabla 7).

	Nuevo Berlín	Fray Bentos	Las Cañas
CF	1,54±0,10	1,44±0,14	1,30±0,11
LSI	0,66±0,16	0,67±0,11	0,63±0,12
GSI	0,51±0,25	0,52±0,21	0,53±0,15

Tabla 7. Valores promedio de Factor de Condición (CF), Índice Somático (LSI) e Índice Gonadosomático (GSI) de hembras de Bagre trompudo de tamaño de clases 15-22, capturados en las tres áreas de estudio.

	Fenoles clorados (bilis) ng/g bilis d.w.	Ácidos resínicos (bilis) µg/g bilis d.w.	Fitoesteroles (bilis) µg/g bilis d.w.	PCDD/PCDF (músculo) WHO-TEQ pg/g f.w.
Nuevo Berlín	70-1560	2-1800	330-1170	0,11-0,30
Fray Bentos	80-1480	8-1080	12-1440	0,08-1,01
Las Cañas	160-1190	4-660	130-1640	0,19-0,49

Tabla 8. Variación de las concentraciones de fenoles clorados, ácidos resínicos y fitoesteroles analizados en bilis y PCDD/PCDF en músculo de diferentes especies de peces analizados durante el período de estudio.

## Discusión

El oxígeno disuelto se encontró por encima del mínimo recomendado por la normativa nacional (5 mg/l) y el fósforo total se presentó consistentemente por encima de los valores límite guía propuestos por la normativa nacional.

Las concentraciones medias de los compuestos orgánicos adsorbibles (AOX) fue de 9 µg/l, salvo en una ocasión (setiembre de 2005), cuando se observaron valores puntuales superiores a 200 µg/l en la zona del Puente y en la de Fray Bentos. Las concentraciones de fitosteroles, tales como sitosterol, campesterol y sitostanol, se mantuvieron por debajo del límite de cuantificación (50 µg/l).

Las concentraciones de AOX, compuestos clorofenólicos, ácidos resínicos y dioxinas pueden ser consideradas bajas y básicamente en los mismos niveles basales naturales medidos en cursos de aguas en Escandinavia (Tana, 2010).

Las dioxinas y furanos se mantuvieron por debajo del nivel guía de 10 pg/l (Health Canada, 2010). El OCDD es el congener que predomina en el ambiente (Green et al., 2004, Rappolder et al., 2005) y el de menor toxicidad entre los PCDD, con un factor de equivalencia tóxica (TEF) de la Organización Mundial de la Salud de 0,0003 respecto al 2,3,7,8-TCDD (Van den Berg et al., 2006). En áreas agrícolas y forestadas, como las que predominan en esta región, la deposición atmosférica es la fuente más probable de PCDD/Fs en sedimentos (Wentz et al., 1998) y, por lo tanto, también en agua. El OCDD es el congener predominante en las emisiones de camiones diesel, de vehículos a nafta sin plomo y de la combustión de madera (Cleverly et al., 1997).

Los metales pesados tóxicos (arsénico, cadmio, cinc, cobre, cromo, mercurio, níquel y plomo) se encontraron durante todo el monitoreo por debajo de los máximos establecidos por la normativa nacional para aguas Clase 1 (destinadas a abastecimiento público).

La riqueza de taxa de fitoplancton fue menor a la encontrada en estudios anteriores a lo largo del Río Uruguay y la abundancia fue similar a la encontrada en estudios anteriores en el mismo río (O'Farrell e Izaguirre, 1994; CELA, 2006). La comunidad de fitoplancton presentó variación estacional, típica de los ríos de esta región, con valores máximos en verano en todos los puntos de muestreo. Durante el período estival CELA registró la presencia de una floración de *Microcystis aeruginosa* en la zona de estudio (2006). Los valores de nutrientes (fósforo soluble y compuestos nitrogenados, Tabla 3), las altas temperaturas (29 °C promedio en enero) y las condiciones de bajo caudal (valores menores a 1000 m<sup>3</sup>s<sup>-1</sup> durante todo el período estival) fueron factores que favorecieron el crecimiento de cianobacterias. En enero se detectaron en todos los puntos densidades que estuvieron en el orden de las 20.000 – 30.000 cél/ml (CELA, 2006), en tanto la microcistina-LR detectada en agua alcanzó en ese mes los 0.79 µg/L

en Nuevo Berlín. La espuma de color verde se visualizó y permaneció en superficie durante el período estival (Figura 2), y alcanzó en febrero valores de microcistina superiores de 14.1 µg/l en Fray Bentos.



Figura 2. Observación costera de mancha verde producida por acumulación de cianobacterias durante el período estival del año 2006.

El aumento de cianobacterias en verano, principalmente de la especie *Microcystis aeruginosa*, no sólo marca signos de eutrofización sino que también implica riesgos para la salud por su capacidad de generar hepatotoxinas (Chorus y Bartram, 1999). La dominancia de los fitoflagelados nanoplantónicos el resto del año se debe a que son organismos pequeños, con alta relación superficie/volumen y altas tasas de reproducción, adaptados a condiciones de alta concentración de material suspendido y disminución de la transparencia del agua (Klaveness, 1988). La riqueza de taxa de zooplancton fue menor a la encontrada previamente en los ríos Uruguay, Paraná y Paraguay (Paggi y José de Paggi, 1990; Chalar et al., 1993, 2002; Frutos et al., 2006) y se observó un patrón similar que en dichos ríos: predominio de especies de Rotíferos y baja presencia de Cladóceros. La dominancia de Rotíferos se debe a su característica de tener generación de vida corta y alta tasa de reproducción, lo que reduce los impactos de pérdida por advección (Pace et al., 1992).

La abundancia de zooplancton estuvo dentro del rango presentado en el estudio realizado el año anterior por CELA (2006) en las mismas zonas de estudio. No obstante, el máximo registrado en este trabajo fue menor. Las mayores densidades se produjeron por la alta presencia de larvas de *Limnoperna fortunei*, especie de molusco cuyos primeros estadios de vida forman parte de la comunidad de zooplancton. Es una

especie exótica, originaria de China e introducida en la región en los años 90 mediante el agua de lastre de las embarcaciones (Darrigran y Pastorino, 1995). En Uruguay esta especie fue hallada por primera vez en 1994 en costas del Río de la Plata (Scarabino y Green, 1995) y a los pocos años ya se encontraba en cuatro de las seis principales cuencas de nuestro país (Brugnoli et al., 2005).

Los principales factores reguladores de las comunidades planctónicas son físicos (intensidad de la luz), químicos (concentración de nutrientes), biológicos (predación y competencia) e hidrológicos (caudales y tiempo de residencia) (Reynolds, 2006; Moss et al., 1989). En sistemas lóticos los factores más importantes son los hidrológicos, principalmente el caudal y sus efectos, como la turbulencia y el tiempo de residencia (Reynolds, 2006; Pace et al., 1992). Las comunidades planctónicas no presentaron diferencias significativas a escala espacial entre zonas de estudio ni puntos de las transectas, a diferencia de la escala temporal, en la que las diferencias se atribuyeron a las variaciones de caudales entre muestreos. En el caso del fitoplancton la temperatura jugó un rol importante como modulador de la abundancia de la comunidad.

Las concentraciones de materia orgánica en sedimentos fueron similares a las relevadas en esta zona durante el período 2005 - 2006 por CELA. Los valores de densidades de organismos bentónicos encontrados en este estudio se encuentran dentro de los rangos relevados por Ezcurra de Drago et al. (2004) en la zona baja del Río Paraguay. Al igual que la comunidad planctónica, la de bentos tampoco presentó diferencias significativas espaciales entre sitios ni zonas de muestreo. A pesar de que no se observaron cambios temporales significativos en la comunidad de macroinvertebrados, las abundancias fueron mayores en octubre y julio. Según LATU (2010), el caudal del Río Uruguay sería el principal factor regulador de los cambios espaciales y temporales observados en la abundancia de la fauna macrobentónica y la matriz sedimentaria.

En el tramo inferior del Río Uruguay, Devincenzi y Teague (1942) mencionan la presencia de aproximadamente 86 especies de peces. Además, Delfino et al. (1997) citan cinco especies más y Charbonier et al. (2002), 34 más. El total de especies ronda las 125, con la probable presencia de dos especies introducidas: carpa (*Cypriniiformes*, *Cyprinus carpio*) y esturión (*Acipenseriformes*, *Acipenser baeri*, no confirmada realmente). Esta es la zona más productiva del Río Uruguay en términos de biomasa (Spinetti, 1999). Las especies de mayor importancia comercial son el sábalo (*Prochilodus lineatus*), la boga (*Leporinus obtusidens*), el patí (*Luciopimelodus pati*) y el dorado (*Salminus brasiliensis*). En base a los resultados se observó una importante variación en la aparición de las especies en las tres zonas.

En términos generales, la comunidad de peces presentó variación en la aparición de las especies en las tres zonas a lo largo del período de muestreo. Dentro de esta comunidad, *P. valenciensis* presenta una elevada variabilidad en sus abundancias, pudiendo afectar la representación de las diferentes clases de tallas. Por otra parte, estos elevados cambios en las abundancias entre muestreos pueden estar indicando migraciones locales o de mayor extensión.

Los estudios de base de la comunidad de peces indican que la mejor especie para ser seleccionada como indicadora, debido a sus elevadas abundancias en los diferentes períodos de estudio en los tres sitios, es el Bagre trompudo (*Iheringichthys labrosus*). A pesar de la amplia distribución geográfica, existen muy pocos trabajos que traten sobre la especie propuesta para ser evaluada como indicadora (*I. labrosus*). En la represa de Itaipú, estado de Paraná, Brasil, los estudios indican que es una especie no migratoria, que no presenta cuidado parental y se reproduce tanto en el embalse como en sus tributarios (Santos et al., 2004).

El contenido en bilis de peces de compuestos clorofenólicos y resinas ácidas, entre otras, han sido ampliamente utilizados como medidas para establecer los niveles de exposición a efluentes de plantas de celulosa, por ejemplo en Finlandia y Suecia (Grahn et al., 1991; Tana et al., 1994; Johnsen et al., 1995; Tana, 2004). Las principales razones para el análisis de estos compuestos en bilis son la toxicidad para los peces y las concentraciones que pueden llegar a ser del orden

de  $10^5$  con respecto a las encontradas en el agua (proceso de bioconcentración). Su presencia también indica que estos compuestos han sido procesados por el sistema de detoxificación de los peces (Oikari y Holmbom, 1986). Las concentraciones de compuestos clorofenólicos encontradas consisten principalmente en clorofenoles y pueden ser consideradas bajas. Dentro de este grupo los más abundantes fueron 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y 2,3,6-triclorofenol, los cuales se ha demostrado que son ubicuos en aguas ricas en humus y formados por la acción de microorganismos (Grimvall et al., 1994).

Al analizar el factor de condición e índice gonadosomático no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres zonas (KW,  $p > 0.05$ ) y lamentablemente no existen trabajos previos en esta especie para el Río Uruguay que permitan realizar comparaciones con los datos obtenidos. Las concentraciones de ácidos resínicos pueden ser consideradas como niveles basales naturales si tomamos como referencia los cursos de agua escandinavos. Las elevadas concentraciones observadas en noviembre de 2006 en el área Las Cañas corresponden al ácido abiético en una muestra proveniente de un pool de cinco bagres trompudos (*I. labrosus*). Datos similares fueron observados en abril de 2007.

Los resultados de las concentraciones de los compuestos clorofenólicos, resinas ácidas y fitoesteroles analizadas en la bilis de diferentes especies capturadas en los tres sitios mostraron una gran variación entre especies, en el espacio y en el tiempo. Concentraciones excepcionalmente elevadas de cloroguaqueoles y clorocatecoles fueron detectadas en Nuevo Berlín en diciembre de 2005 en una muestra compuesta de tres Sábalo (*P. lineatus*, especie migratoria y de importancia en la pesca artesanal).

El consejo de la Unión Europea ha establecido en el Reglamento 199/2006 unos niveles máximos de determinados contaminantes en los productos alimenticios. El nivel máximo de PCDD/PCDF en pescado y productos pesqueros se fijó en 4,0 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g peso fresco. Los valores máximos de PCBs se establecen en dicho reglamento combinados con PCDD/PCDF en un límite admisible de 8,0 pg WHO-PCDD/F-PCB-TEQ/g peso fresco. Hasta el momento los valores encontrados en Uruguay para dioxinas y PCB no superan estos límites. La ingesta diaria total recomendada por la Unión Europea es de 1-4 pg/kg de peso corporal, y esto incluye un margen de seguridad en un factor de 10. Basado en esta recomendación no habría ningún tipo de limitación al consumo humano de los peces estudiados en cuanto a las concentraciones de dioxinas y furanos. Sin embargo, se debe prestar especial atención debido a estudios recientes que muestran elevadas concentraciones de endosulfan en varias de las especies aquí estudiadas (Zaldúa et al., 2010). Todos los datos de concentraciones de dioxinas observados se encuentran muy por debajo de los valores recomendados, y son hasta el momento los primeros datos disponibles para las concentraciones de dioxinas en los peces del Río Uruguay.

## Conclusiones

Existen pocos antecedentes en la zona de estudio, por lo que fue fundamental realizar una línea de base completa, con diversos parámetros abióticos y bióticos en conjunto, para luego poder evaluar si existieron cambios en el ambiente a partir de la puesta en funcionamiento de la planta de celulosa. La calidad fisicoquímica del agua fue uniforme en las zonas analizadas y los parámetros estudiados presentaron valores similares en todas las zonas de estudio. Las concentraciones estuvieron dentro de los valores límite guía de la normativa nacional, con la excepción del fósforo, el cual superó los máximos sugeridos. El área de estudio mostró señales de eutrofización debido a las altas concentraciones de fósforo en la columna de agua y a la presencia en altas concentraciones de especies de cianobacterias (principalmente *Microcystis aeruginosa*) en la comunidad de fitoplancton.

La comunidad de plancton estuvo dominada por grupos adaptados a la turbidez y turbulencia: fitoflagelados nanoplanctónicas (fitoplancton) y rotíferos (zooplancton). Los valores máximos de densidad de zooplancton y bentos se observaron por la alta presencia del molus-

co exótico invasor de origen asiático *Limnoperna fortunei*, la especie bentónica dominante en el período de estudio.

Las comunidades de plancton y bentos presentaron variabilidad temporal entre los muestreos y no se observó un patrón espacial que diferenciara las zonas de estudio.

La comunidad de peces fue similar en las tres zonas de estudio y la mayor cantidad de especies fue obtenida en la bahía de Yaguareté, cercana a la zona de Fray Bentos y a la futura planta de celulosa. Las menores capturas fueron obtenidas en la zona de Las Cañas, aguas debajo de la planta a la altura de la desembocadura del arroyo Caracoles chico. Los peces capturados se encontraban en buen estado y las investigaciones de la bilis de peces indicaron que las concentraciones de compuestos clorofenólicos, ácidos resínicos y fitosteroles se encontraban en niveles en los que no era de esperar efectos agudos o crónicos sobre esta comunidad.

Las concentraciones de dioxinas y furanos en músculo de peces se encontraron por debajo de los niveles recomendados por normativa internacional y el grupo más tóxico de las dioxinas (TCDD), por debajo de los límites de detección. En base a las concentraciones observadas y las recomendaciones internacionales no habría limitaciones al consumo humano de los peces estudiados para los contaminantes analizados.

La ausencia de diferencias significativas entre las tres zonas estudiadas en la etapa de línea de base es relevante para la posterior evaluación de la presencia de impactos de la planta de celulosa.

## Reconocimientos

Agradecemos especialmente a la empresa UPM S.A. que nos permitió utilizar los datos generados en el marco de los servicios prestados, a las personas que junto a nosotros participaron en los muestreos, principalmente Marcelo Bado, Pablo Morales y Gonzalo Useta, y a todos los compañeros del LATU que de alguna forma contribuyeron con este trabajo. Agradecemos a Diego Larrea, Nicolás Vidal, Carlos Iglesias, Iván Gonzales-Bergonzoni y Roberto Ballabio por su participación en el muestreo y procesamiento de peces. También queremos agradecer a los dos revisores anónimos que permitieron mejorar este trabajo.

## Referencias

- ALI, M.; SREEKRISHNAN, T.R. Aquatic toxicity from pulp and paper mill effluents: a review. En: *Advances in Environmental Research*. 2001, 5:175-196.
- BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, J.; BOCCARDI, L.; BORTHAGARAY, A.; SCARABINO, F. Update and prediction of golden mussel (*Limnoperna fortunei*): distribution in the principal hydrographic basin of Uruguay. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2005, 77(2):1-10.
- BURT, R. *Soil survey laboratory methods manual*. v. 4.0. Lincoln: NRCS, 2004.
- CARU. COMISIÓN ADMINISTRADORA DEL RÍO URUGUAY. *Cuenca del Río Uruguay* [En línea]. Paysandú: CARU, s.d. [Consulta marzo 2009]. Disponible en: [www.caru.org.uy](http://www.caru.org.uy)
- CELA. CENTROS DE ESTUDIOS LIMNOLÓGICOS APLICADOS. *Establecimiento de una línea de base de las comunidades de fitoplancton, zooplancton y bentos en el Río Uruguay (desde Nuevo Berlín a Las Cañas)*, depto. Río Negro-Uruguay. s.l.: CELA, 2006.
- CHALAR, G.; DE LEÓN, L.; DE LEÓN, R.; FABIÁN, D.; GORGA, J. *Evaluación de la eutrofización del Embalse de Salto Grande. Análisis de las relaciones entre los parámetros físico-químicos y biológicos. Informe final de la primera etapa*. Montevideo: CTM-SG; Universidad de la República, 1993.
- CHALAR, G.; DE LEÓN, L.; PARADISO, M.; BRUGNOLI, E.; CLEMENTE, J. *Dinámica de la eutrofización del embalse Salto Grande: informe del período setiembre de 2000-marzo 2002*. Montevideo: Facultad de Ciencias, 2002.
- CHARBONIER, E.; D'ANATRO, A.; GARCÍA, D.; LOUREIRO, M.; TEIXEIRA DE MELLO, F. Medio Biótico: peces. En: CAYSSIALS, R.; MANEYRO R.; PERES-MILES, F. *Pautas para la elaboración de un plan de manejo para el área de Esteros de Farrapos. Primera Parte: medio físico y fauna*. Montevideo: DINAMA; Facultad de Ciencias, 2002.
- CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic Cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: WHO; E&FN Spon, 1999.
- CLEVERLY, D.; SCHAUM, J.; SCHWEER, G.; BECKER, J.; WINTERS, D. *The Congener Profiles of Anthropogenic Sources of Chlorinated Dibenzo-P-Dioxins and Chlorinated Dibenzofurans in the U.S.* Bayreuth: Ecoinforma Press, 1997.
- DARRIGRAN, G.; PASTORINO, G. The recent introduction of asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. En: *Veliger*. 1995, (38):183-187.
- DAVENPORT, J.; SAYER, MD. Physiological determinant of distribution in fish. En: *Journal of Fish Biology*. 1993, 43(Supplement A):121-145.
- DELFINO, R.; AMESTOY, F.; SVERLIJ, S.; SPINETTI, M.; ESPINACH, ROS A; FOTI, R.; CHEDIAK, G.; BELLAGAMBA, M. *Estructura de las comunidades de peces. Conservación de la fauna íctica en el embalse de Salto Grande*. Montevideo: Comisión Administradora del Río Uruguay; Comisión Técnica Mixta de Salto Grande, 1997.
- DEVINCENZI, G.; TEAGUE, G. Ictiofauna del Río Uruguay medio. En: *Anales del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 1942, 2ª Serie 5(4).
- EZCURRA DE DRAGO, I.; MARCHESE, M.; WANTZEN, K.M. Spatial patterns in Benthic invertebrate community structure along the Lower Paraguay Floodplain System. En: *Arch. Hydrobiol.* 2004, 160:347-374.
- FRUTOS, S.; POI DE NEIFF, A.; NEIFF, J. Zooplankton of the Paraguay River: a comparison between sections and hydrological phases. En: *Ann. Limnol. Int. J. Lim.* 2006, 42(4):277-288.
- GRAHN, O.; TANA, J.; MONFELT, C.; HÄRDIG, J.; LEHTINEN, K. Environmental impact of two Swedish bleached kraft pulp mills as determined by field surveys. En: *Proceedings of the 1st Symposium on Environmental Fate and Effects of Bleached Pulp Mill Effluents*. Stockholm: s.n. 1991. pp. 248-256.
- GREEN, N.; HASSANIN, A.; JOHNSTON, A.; JONES, K. Observations on historical, contemporary, and natural PCDD/Fs observations on historical, contemporary, and natural PCDD/Fs. En: *Environmental Science and Technology*. 2004, 38(3):715-723.
- GRIMVALL, A.; LANIEWSKI, K.; BOREN, H.; JOHANSSON, S.; KAUGARE, S. Organohalogenes of natural or unknown origin in surface water and precipitation. En: *Toxicology Environmental Chemistry*. 1994, 46(3):183-196.
- HEALTH CANADA. *Current canadian objectives, guidelines and regulations* [En línea]. Ottawa: Health Canadá, [s.d.]. [Consulta noviembre 2010]. Disponible en: [http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/dioxins\\_furans\\_dioxines\\_furannes/guidelines-canada-objectifs-eng.php](http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl1-lsp1/dioxins_furans_dioxines_furannes/guidelines-canada-objectifs-eng.php).
- HERING, D.; MOOG, O.; SANDIN, L.; VERDONSCHOT, P. Overview and application of the AQEM assessment system. En: *Hidrobiología*. 2004, 516(1-3):1-20.
- HUTSON, D.; ROBERTS, T. *Environmental fate of pesticides*. v. 7.

- s.l.: John Wiley & Sons, 1994. (Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology)
- JOHNSEN, K.; MATTSSON, K.; TANA, J.; STUTHRIDGE, T.R.; HEMMING, J.; LEHTINEN, K. Uptake and elimination of resin acids and physiological responses in rainbow trout exposed to total mill effluent from integrated newsprint mill. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1995, 14(9):1561-1568.
  - KARR, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. En: *Fisheries*. 1981, 6:21-27.
  - KARRASCH, B., PARRA O., CID H., MEHRENS M., PACHECO P., URRUTIA R., VALDOVINOS C., ZAROR C. Effects of pulp and paper mill effluents on the microplankton and microbial self-purification capabilities of the Biobío River, Chile. En: *Science of the Total Environment*. 2006, 359:194-208.
  - KLAVENESS, D. Ecology of the Cryptomonadida: a first review. En: SANDGREN, C.D. *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.
  - LARSSON, D.G.J; FÖRLIN, L. Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: temporary recovery after a short-term shutdown. En: *Environmental Health Perspectives*. 2002, 110(8):739-742.
  - LATU. *Estudio de las comunidades de fitoplancton, zooplancton y macrozoobentos en el tramo inferior del Río Uruguay (Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas)*. Montevideo: LATU, 2007. (Informe de asesoramiento; 952512)
  - LATU. *Tercer año de estudio de las comunidades biológicas y variables abióticas en el tramo inferior del Río Uruguay*. Montevideo: LATU, 2010. (Informe de asesoramiento; 1135493)
  - LAWTON, L.; EDWARDS, CH.; CODD, G. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. En: *Analyst*. 1994, 119(7):1525-1530.
  - MOSS, B.; BOOKER, I.; BALLS, H.; MANSON, K. Phytoplankton distribution in a temperate floodplain lake and river system. Hydrology, nutrient sources and phytoplankton biomass. En: *Journal of Plankton Resources*. 1989, 11:813-838.
  - O'FARRELL, I.; IZAGUIRRE, I. Phytoplankton ecology and limnology of a River Uruguay Lower Basin (Argentina). En: *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 1994, 99:(1/2):155-179.
  - OIKARI, A.; HOLMBOM, B. Assessment of water contamination by chlorophenolics and resin acids with the aid of fish bile metabolites. En: POSTON, T.M.; PURDY, R. *Aquatic toxicology and environmental faste*. v. 9. Philadelphia: ASTM, 1986. pp. 225-267. (ASTM STP 921)
  - PACE, M.; STUART, E.; LINTS, D. Zooplankton in advective environments. The Hudson River community and a comparative analysis. En: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1992, 49:1060-1069.
  - PAGGI, J.C.; JOSE DE PAGGI, S.B. Zooplankton of the lotic and lentic environments of the middle Paraná River. En: *Acta Limnol. Brazil*. 1990, 3:685-719.
  - RAPPOLDER, M.; BRÜDERS, N.; SCHRÖTER- KERMANI, C. Comparison of congener patterns and TEQs in environmental and human samples. En: *Organohalogen Compounds*. 2005, 67:2086-2089.
  - REYNOLDS, C.S. *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. (Ecology, Biodiversity and Conservation).
  - SANTOS, J.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SANTOS, G. Reproduction of the catfish *Iheringichthys labrosus* (Lütken) (Pisces, Siluriformes) in Furnas reservoir, Minas Gerais, Brazil. En: *Revista Brasileira de Zoologia*. 2004, 21(2):139-200.
  - SCARABINO, F.; VERDE, M. *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) en la costa uruguaya del Río de la Plata (*Bivalvia; Mytilidae*). En: *Comunicaciones Malacológicas del Uruguay*. 1995, 7(66-67):374-375.
  - SPINETTI, M. Evaluación de los recursos pesqueros mediante técnica hidroacústicas y pesca exploratoria. En: COMISIÓN ADMINISTRADORA DEL RÍO URUGUAY. *Primeras Jornadas sobre Conservación de la Fauna Íctica en el Río Uruguay*, (Paysandú 22-23 de noviembre de 1999). Paysandú: C.A.R.U, 1999. pp. 9-12.
  - TANA, J. *Aquatic environmental impact evaluation of the April Riau Industrial Complex*, Indonesia. Espoo: CTS, 2004. (ÁF-CTS report April 2004).
  - TANA, J. *Concentrations of resin acids, chlorinated phenols and plant sterols in fish from Río Uruguay. Monitoring studies in the recipient of Botnia pulp mill*. [s.l.]: [s.n.], 2010. (ÁF-Consult report ENVI-569, June 2010).
  - TANA, J.; ROSEMARIN, A.; LEHTINEN, K.; HÄRDIG, J.; GRAHN, O.; LANDNER, L. Assessing impacts on Baltic coastal ecosystem with mesocosm and fish biomarker tests. A comparison of new and old wood pulp bleaching technologies. En: *Science of the Total Environment*. 1994, 145(3):213-234.
  - TEIXEIRA-DE MELLO, F. Monitoreo de la pesca artesanal en el Río Uruguay a través de información generada por pescadores de la zona de Nuevo Berlín, Fray Bentos y Las Cañas (periodo 2007-2009). En: *Informe técnico presentado a la empresa Botnia*, 2010.
  - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. United States of America. Environmental Monitoring and assessment Program (EMAP). *Laboratory methods manual: estuaries*. Washington: USEPA, 1995. (EPA/620/R-95/008).
  - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Summary of Biological Assessment Programs and Biocriteria Development for States, Tribes, Territories, and Interstate Commissions: Streams and Wadeable Rivers. Washington: USEPA, 2002. (EPA-822-R-02-048).
  - UTERMHÖL. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitteilungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte En: *Limnologie*. 1958, 9:1-38.
  - VAN DEN BERG, L. ; SCHILDER, M.; DE VRIES, H.; LEEGWATER, P.; VAN OOST, B. Phenotyping of aggressive behaviour in Golden Retriever dogs with a questionnaire. En: *Behav Genet*. 2006, 36(6):882-902.
  - ZALDÚA, N.; RÍOS, M.; TEIXEIRA-DE MELLO, F.; GONZÁLEZ-BERGONZONI, I.; MIGUELE, C.; ROSANO, A.; SPINELLI, W. Evaluación participativa de niveles de plaguicidas en peces de interés comercial del sitio RAMSAR. En: RÍOS, M.; ZALDÚA, N.; CUPEIRO, S. *Evaluación participativa de plaguicidas eb el sitio Ramsar, Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay*. Montevideo: Vida Silvestre, 2010. pp. 59-76.
  - WENTZ, D.A.; BONN, B.A.; CARPENTER, K.D.; HINKLE, S.R.; JANET, M.L.; RINELLA, F.A.; UHRICH, M.A.; WAITE, I.R.; LAENEN, A.; BENCALA, K.E. *Water quality in the Willamette Basin, Oregon, 1991-95*. Denver: U.S. Department of the Interior, 1998. (U.S. Geological Survey Circular; 1161).

# Estudio comparativo de la determinación del tamaño de partícula por dos métodos: tamizado en seco y difracción láser

Cabrera, S. <sup>(1)</sup>, Irigaray, R. <sup>(1)</sup>, Míguez, D. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento Aguas y Productos Químicos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: dmiguez@latu.org.uy

Recibido: 30/06/2010 - Aprobado: 25/11/2010

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue comparar el desempeño analítico de la tecnología de medición de tamaño de partícula por difracción láser con la técnica clásica de tamizado en seco para partículas superiores a 80 micras. Se utilizó arena como muestra de referencia interna. El procedimiento mecánico se realizó con equipo vibrador de tamices durante 15 minutos y batería de tamices estándar ASTM números 20, 40, 70 y 170. La determinación por difracción tri-láser, que implica hacer incidir tres haces de luz láser sobre la partícula, permite evaluar las dimensiones y realizar una distribución de tamaños generada por frecuencias de datos dispuestas en rangos. La muestra tamizada se reconstituyó uniendo sus porciones y se cuarteó por separador rotativo de alta exactitud y reproducibilidad. Una muestra representativa se suspendió en agua con agitación mecánica y los datos de las medidas se representaron gráficamente usando el software del equipo. Se realizaron 10 réplicas por cada método para evaluarlos estadísticamente mediante los métodos de los momentos y Falk y Ward. Se concluye que ambos clasifican la muestra de la misma forma pero existen diferencias en los coeficientes de curtosis para las distribuciones de las poblaciones según una y otra técnicas. Palabras clave: Granulometría, arena, Geofísica.

## Abstract

The aim of this work was to compare the analytical performance of the laser diffraction technology for the particle size determination by the classical dry sieving procedure for particles bigger than 80 micrometers. Sand was used as reference sample. The sieving was done using one mechanic equipment through a battery of standard ASTM sieves numbers 20, 40, 70 and 170 with vibration time of 15 minutes. The tri-laser diffraction method consists on the incidence of three laser beams on the particles to evaluate their dimensions and produces a frequency histogram for the representation of the size ranges. After sieving, the sample was reconstituted by mixing by a rotary sample divider of high accuracy and reproducibility to get representative sub-portions. An amount was suspended in water, mechanically stirred and introduced in the equipment for measurement and graphical processing by the instrument software. Ten replicate determinations were done by each method for statistical evaluation by the method of the moments and Falk and Ward method, concluding that laser diffraction rates the sample in similar way as sieving but with differences regarding kurtosis coefficients for the population distribution of each technique.

Keywords: Granulometry, sand, Geophysics .

## Introducción

Este trabajo se diseñó con el fin de demostrar la utilidad del método difracción láser para medición del tamaño de partícula y compararlo con el método de referencia por tamizado, analizando por medio de ambos métodos muestras de arena. Una partícula es una discreta masa de materia sólida o líquida y puede incluir desde partículas atómicas a grandes trozos de mineral. Aunque en la realidad esto no ocurre para la mayoría de los casos, se asume que las partículas son perfectamente esféricas y que ésta es la forma regular de referencia. De este modo, el tamaño de la partícula se puede establecer de forma más útil midiendo una propiedad característica de una partícula irregular que pueda ser relacionada con la misma propiedad de una partícula con forma regular. Los tamaños de las partículas se pueden describir en base a una esfera equivalente, combinando los parámetros tamaño y forma e incorporando las variaciones de tamaño aparente. Se establece así una definición para el tamaño de partícula reproducible e inequívoca, con una sola dimensión (Jhon y Rojas, 2004). En el caso de los granos de sedimentos naturales, por ejemplo, en lugar de la esfera las formas más típicas son las de elipsoides tridimensionales (Komar y Bingquan,

1984). El estudio del tamaño de partícula es de gran importancia para variadas ramas industriales, desde la agrícola hasta la cosmética, farmacéutica (Kippax 2005), y ambiental.

## Materiales y Métodos

En el método de tamizado se mide la habilidad del diámetro menor de una partícula para pasar a través de un orificio de perfil determinado. Sus ventajas son que emplea un equipo de costo relativamente bajo y la medida se hace en forma directa sin preparación en un rango de medidas amplio, pero la cantidad de muestra debe ser grande para que el resultado sea representativo. Las interferencias posibles son de tipo físico, ya que los orificios se pueden cerrar o deformar las mallas. Además de separar por tamaño, separa por forma, ya que la esfericidad de la partícula influye en determinar el pasaje a través de la malla (Komar y Bingquan, 1984).

El procedimiento empleado consistió en lavar una muestra de arena proveniente de la playa de Costa Azul, Canelones, Uruguay, con agua destilada para quitarle posibles sales y se la pasó a través de un tamiz ASTM N° 325 (45 µm). La muestra obtenida se secó en

estufa a 105 °C y se cuarteó con un equipo divisor de muestras de alta precisión (Retsch Modelo PT 100, Haan, Alemania) a fin de obtener porciones representativas. Cada porción se tamizó usando una batería compuesta por los tamices estándar ASTM N° 20 (840 µm), 40 (420 µm), 70 (210 µm) y 170 (88 µm), empleando la técnica de FAO (1984) para determinación de tamaño de partícula de suelos con un equipo vibrador de tamices (Retsch Modelo Vibro VM1, Haan, Alemania).

El método de dispersión estática de luz (difracción) mide la habilidad de analizar patrones combinados de luz dispersada; estas mediciones se traducen mediante ecuaciones algorítmicas a una señal representada gráficamente como dispersión del tamaño de partículas (USP 31, Medición del Tamaño de Partículas por Difracción de Luz, <429>). Estas medidas de dispersión de luz se realizan en la región del ángulo delantero angular (alrededor de 0° a 160°) de acceso al espectro del láser. El láser primario produce la dispersión de luz a unos 60°, mientras que el segundo haz (fuera del eje) produce más allá del nivel de dispersión de 60°. El tercer láser (fuera del eje) produce retro dispersión usando los mismos detectores (Freud et al., 1994). El tiempo requerido para el análisis por muestra es breve (5 min). Los sensores ópticos se calibran diariamente y la medida se puede contrastar contra materiales de referencia trazables NIST. Además, los resultados son representados fácilmente en forma visual. Sin embargo, el método no es primario, pues estima el tamaño de partícula correlacionando la dispersión de la luz, pues requiere una preparación previa de la muestra y el equipo es de costo más elevado. El rango de trabajo es desde 0.026 µm a 2800 µm. El sistema básico se compone de un módulo óptico, un módulo manejador de muestra y una computadora. La verificación de la exactitud de los sensores se realizó utilizando los siguientes materiales de referencia trazables NIST (Microtrac, Inc, Florida, Estados Unidos): vidrio 1 (D10: 41.1-58.3, D50: 56.1-60.3, D90:58.1-82.2), vidrio 2 (D50: 620-665), BCR66 (D10: 0.53-0.75, D50: 1.00-1.40, D90: 2.10-2.80). Las expresiones entre paréntesis son los porcentajes de las partículas del percentil 10, 50 y 90 que se deben cumplir para conformar los requisitos de calidad analítica de la medida.

Estos instrumentos permiten analizar partículas en una amplia gama de tamaños desde las de la región sub-micrónica. El tamaño de los haces de luz láser se relaciona en forma inversa al tamaño de las partículas y el diámetro estadístico promedio indica la tendencia central del tamaño de partículas representado en un gráfico de frecuencia del tipo de distribución y de dispersión de los tamaños (Gráfico 1).

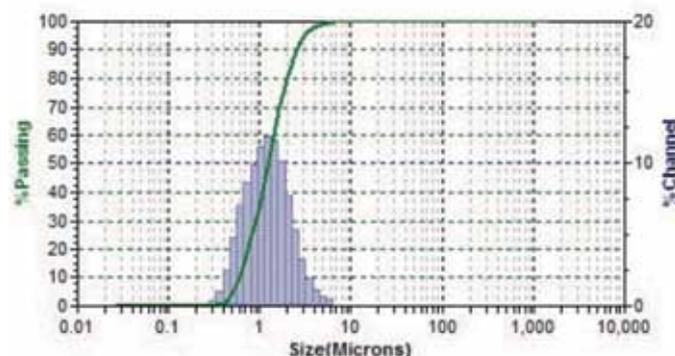


Gráfico 1. Distribución de tamaño de partícula mediante el método de difracción láser.

Para realizar el análisis por el método de tri-laser, se reconstituyó cada porción retenida en los tamices individuales y cada una se re-suspendió en un volumen apropiado de agua mediante agitación con un agitador mecánico con paleta de acero inoxidable. Con una pipeta Pasteur se realizó agregados de muestra tomando cada porción de la superficie, de la zona media y del fondo de la suspensión (con agitación entre cada toma) para obtener una toma de muestra representativa. Luego se la introdujo en el dispensador de un equipo de medida de tamaño de partícula por difracción láser (Microtrac, Inc, Modelo S3500, Florida, Estados Unidos). Esta operación se continúa hasta

estabilidad de la medida. Los resultados obtenidos por ambos métodos se analizaron estadísticamente y se representaron gráficamente.

## Resultados

Los siguientes son los resultados de granulometría realizados por el método de tamizado en seco para los tamices ASTM números 20, 40, 70 y 170 (Tabla 1).

Porcentaje retenido Tamiz No.				
20	40	70	170	réplicas
0,08	1,51	67,22	31,10	1
0,06	1,55	67,50	30,80	2
0,03	1,24	67,57	31,12	3
0,00	1,53	67,73	30,67	4
0,01	1,58	66,94	31,41	5
0,02	1,58	69,53	28,76	6
0,04	1,68	68,17	30,05	7
0,00	1,86	74,54	23,58	8
0,00	1,90	74,76	23,34	9
0,01	1,89	74,82	23,28	10
0,03	1,63	69,88	28,41	<b>media</b>

Tabla 1. Distribución de tamaño de partícula por el método de tamizado seco.

La distribución del tamaño de partícula por el método por difracción láser se muestra en la Tabla 2 para los mismos rangos de tamaño de partícula ensayados antes por el método de tamizado.

Porcentaje retenido Tamiz No.				
20	40	70	170	réplicas
0,00	3,15	73,01	23,84	1
0,02	2,77	72,16	23,07	2
0,03	1,60	75,95	20,45	3
0,02	2,08	71,65	26,27	4
0,01	1,99	79,49	22,54	5
0,02	1,59	79,46	15,95	6
0,03	2,46	78,79	15,75	7
0,04	1,31	80,99	13,31	8
0,03	2,45	79,27	24,28	9
0,02	1,06	72,13	22,81	10
0,02	2,05	76,29	20,83	<b>media</b>

Tabla 2. Distribución de tamaño de partícula por difracción láser.

## Discusión

Se realizaron dos gráficas de comparación para ambos métodos, donde se grafica uno contra otro en cada tamiz (Gráfico 2). Se lo representa también como porcentaje acumulado en función al tamaño de tamiz (Gráfico 3), en base a lo propuesto por Wen et al. (2002). En ambas gráficas se observa una buena correlación de los métodos ( $r^2 0.9793$ ).

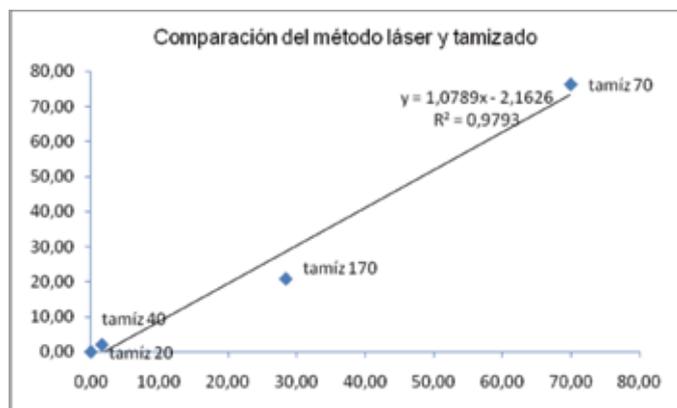


Gráfico 2. Comparación de los resultados obtenidos por el método láser y tamizado.

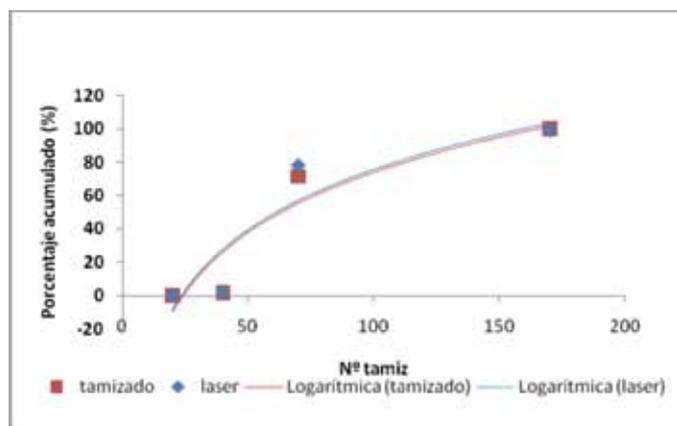


Gráfico 3. Comparación de los métodos por láser y por tamizado expresados en porcentajes de partículas retenidas acumulados.

Se utilizó el programa GRADISTAT v. 6.0 (Blott y Pye, 2001) para calcular los parámetros del estudio de tamaño de grano mediante los métodos de los momentos y método de Falk y Ward. Los parámetros estadísticos media, bondad de la clasificación, asimetría y curtosis fueron calculados para comparar el método de medida de tamaño de partícula por tamizado y por láser, evaluando los análisis de regresión para ambas técnicas. Las dos metodologías consideradas describen la muestra como arena fina. El análisis de asimetría de la probabilidad de la distribución de la variable aleatoria es coincidente, pero el apuntamiento o coeficiente de curtosis es diferente en uno y otro métodos (Tabla 3).

		Tamizado en seco	Difracción láser
Método de los momentos	Media	196,2	207
	Clasificación	69,91	66,13
	Asimetría	0,478	0,478
	Curtosis	7,945	8,772
Método de Folk y Ward (um)	Media	173,5	176,6
	Clasificación	1,459	1,445
	Asimetría	-0,794	-0,809
	Curtosis	0,500	3,591
Método de Folk y Ward (f)	Media	2,527	2,501
	Clasificación	0,545	0,531
	Asimetría	0,794	0,809
	Curtosis	0,500	3,591
Método de Folk y Ward	Media	Arena fina	Arena fina
	Clasificación:	Moderadamente bien clasificada	Moderadamente bien clasificada
	Asimetría:	Muy fina asimetría	Muy fina asimetría
	Curtosis:	Muy platicúrtica	Extremadamente leptocúrtica
% Arena:		100,0%	100,0%
% Arena mediana:		1,6%	2,1%
% Arena fina:		69,9%	76,9%
% Arena muy fina:		28,4%	21,0%

Tabla 3. Método de los momentos y método de Falk y Ward para la descripción estadística de una muestra de arena evaluada por las técnicas de tamizado en seco y de difracción láser.

En el gráfico de cajas y bigotes se muestra que los mayores apartamientos se encuentran en las porciones más finas de la muestra (Gráfico 4) (STATISTICA versión 8).

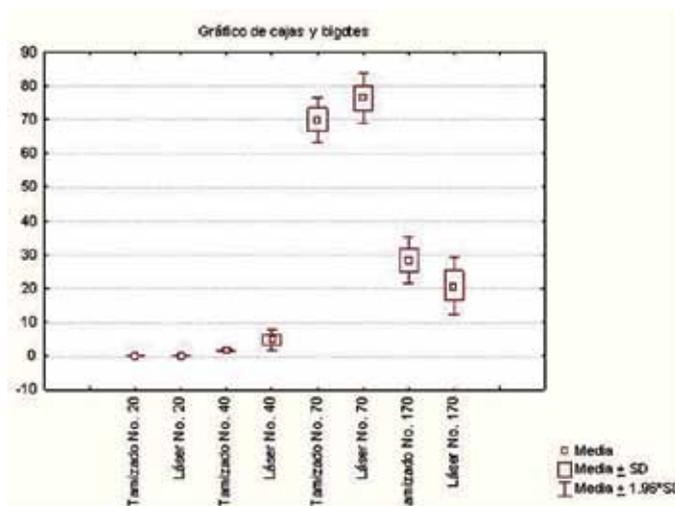


Gráfico 4. Comparación de los métodos tamizado en seco y difracción láser para evaluar el tamaño de partícula de una muestra de arena a través de los tamices números 20, 40, 70 y 170 representado en el diagrama de cajas y bigotes.

En las fracciones individuales, el método láser muestra poblaciones más cercanas a la normalidad para los tamaños de malla números 20 y 40 (Gráfico 5). Los valores promedio para las partículas por el método láser son levemente más gruesas que por el método de tamizado, pero ambos permiten clasificar a la muestra como arena fina. Las ligeras diferencias se podrían deber a que el tamizado en seco selecciona los

granos por la longitud de los ejes menor e intermedio en las partículas reales haciendo difícil su equivalencia a una esfera teórica. En el caso del método por difracción láser, el área proyectada de la partícula es influida por su orientación, por lo cual los resultados podrían eventualmente ser mayores (Rodríguez y Uriarte, 2009).

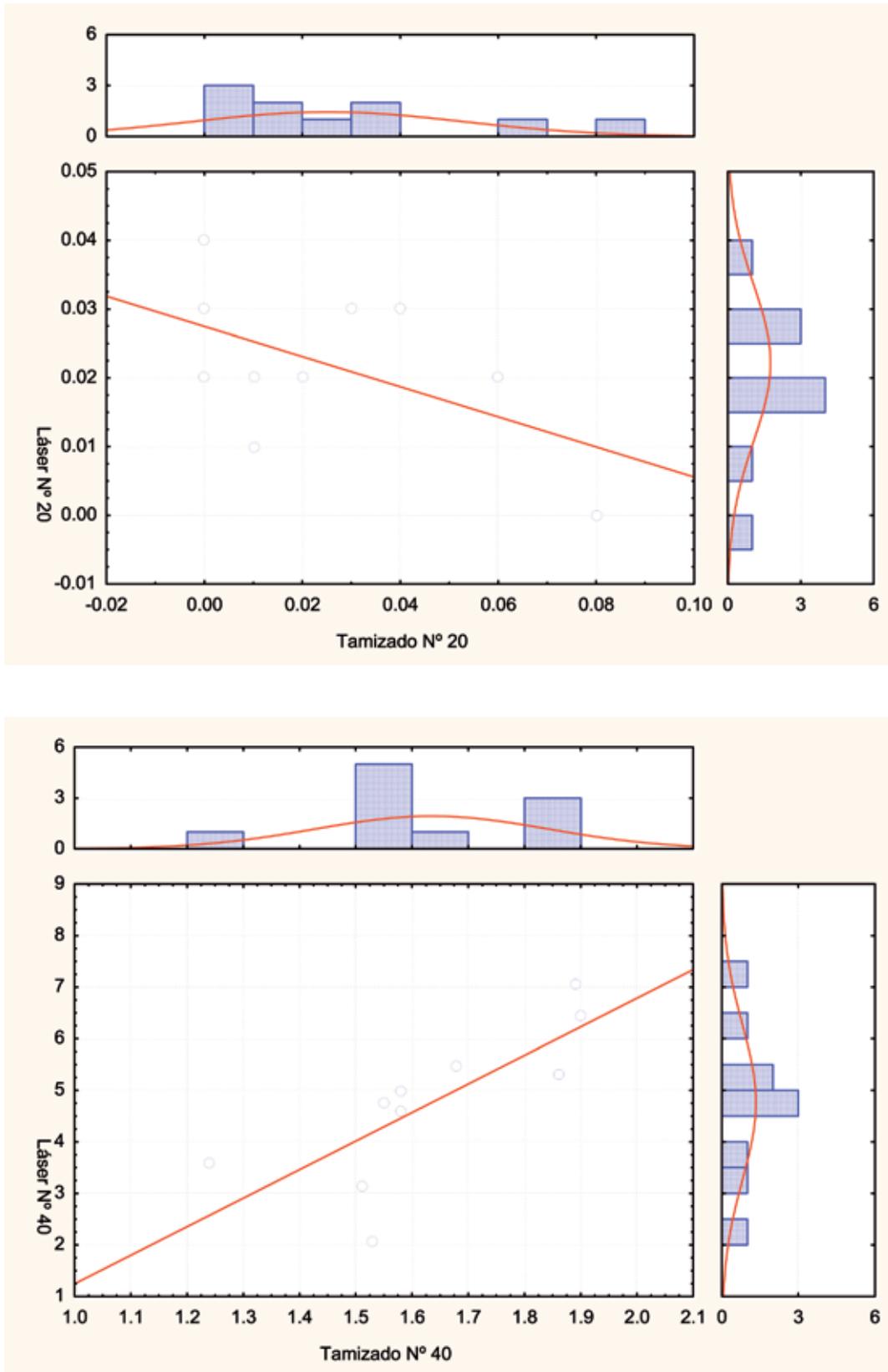


Gráfico 5. Gráficos de dispersión para comparación por tamaño de malla e histogramas para los métodos de tamizado y por difracción láser para las mallas números 20 y 40.

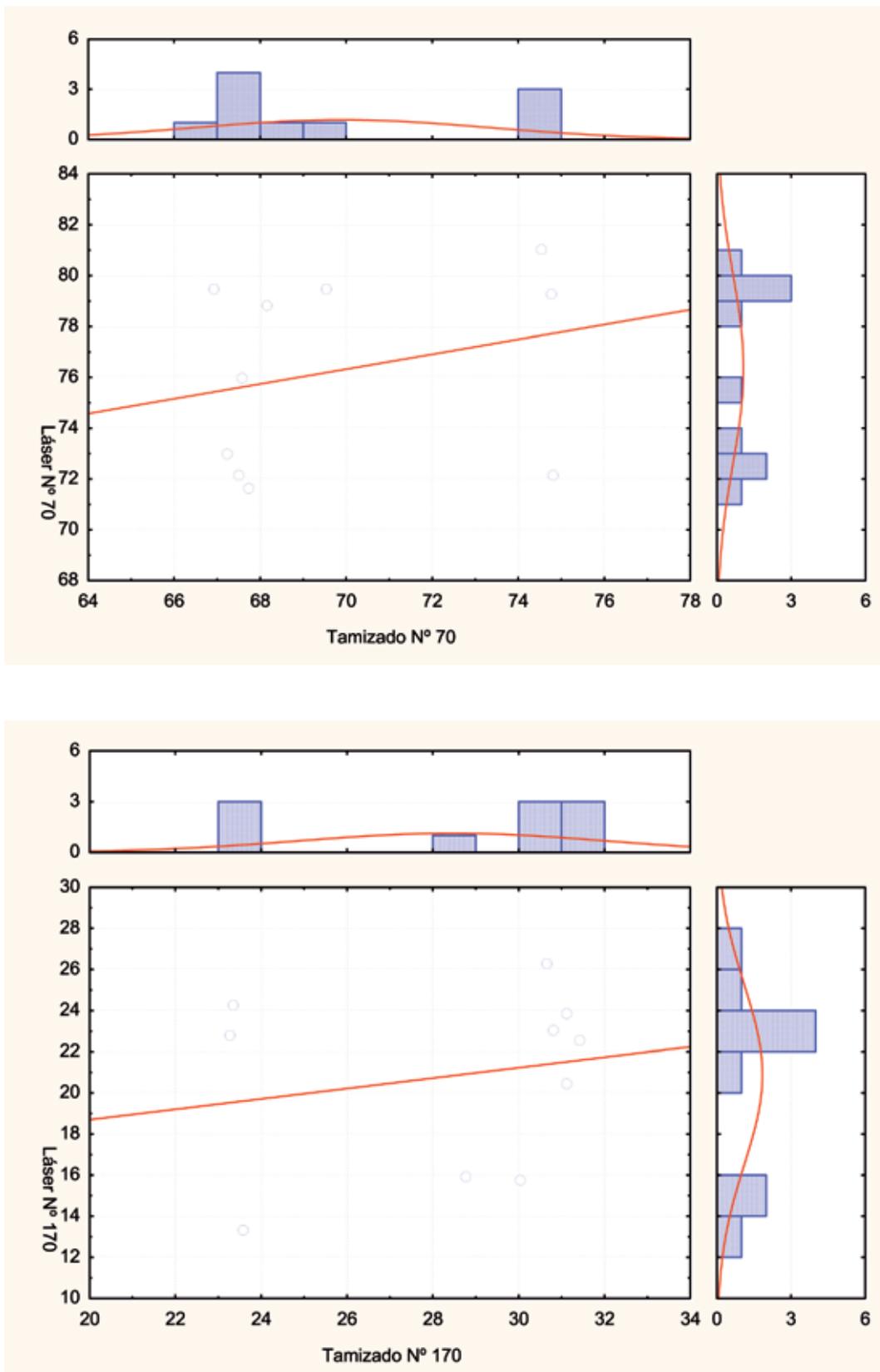


Gráfico 6. Gráficos de dispersión para comparación por tamaño de malla e histogramas para los métodos de tamizado y por difracción láser para las mallas números 70 y 170.

## Conclusiones

Del estudio de los resultados se puede concluir que ambos métodos son comparables, pero presentan apartamientos con respecto a las partículas más pequeñas, como por ejemplo las evaluadas por el tamaño de malla N° 170. A pesar de esto, ambas muestras fueron clasificadas de la misma manera. Se continuará evaluando la influencia que puede provenir de las desviaciones con respecto a la esfericidad de las partículas naturales para calcular las fuentes de incertidumbre en los resultados analíticos por ambos métodos.

## Reconocimientos

Los autores al Laboratorio Tecnológico del Uruguay, al personal del departamento Aguas y Productos Químicos y en especial a Ignacio Seoane, Agustín Carnikián y Patricia Baklayan. Se agradecen los aportes conceptuales de Gabriel Mathus y José Fuentes.

## Referencias

- BLOTT, S.J.; PYE, K. GRADISTAT: A grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. En: *Earth Surface Processes and Landforms*, 2001. 26:1237–1248.
- FAO. Distribución de tamaño de partícula. Análisis mecánico. En: *Métodos físicos y químicos de análisis de suelos y aguas*. Roma: FAO. 1984.
- FREUD. P.J.; TRAINER. M.; FROCK. H.N. *Unified scatter technique for full-range particle size measurement*. Montgomeryville: Microtrac, 1994. (Application Note. SL-AN-10 RevA).
- JHON. J.; ROJAS. C. *Curso de farmacotécnica I* [En línea]. Antioquia: Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia. 2004. [Consulta 20 de junio de 2010]. Disponible en: [http://docencia.udea.edu.co/qf/farmacotecnia/02/02\\_diametros.html](http://docencia.udea.edu.co/qf/farmacotecnia/02/02_diametros.html).
- KIPPAX. P. Appraisal of the laser diffraction particle-sizing technique [En línea] En: *Pharmaceutical technology*. 2005. 88-96. [Consulta 25 de junio de 2010]. Disponible en: <http://pharmtech.findpharma.com/pharmtech/data/articlestandard//pharmtech/112005/150841/article.pdf>.
- KOMAR. P.D.; BINGQUAN. C. The analysis of grain-size measurements by sieving and settling-tube techniques. En: *Journal of Sedimentary Petrology*. 1984. 54(2):603-614.
- RODRÍGUEZ, G.; URIARTE, A. Laser Diffraction and Dry-Sieving Grain Size Analyses Undertaken on Fine- and Medium-Grained Sandy Marine Sediments: A Note. En: *Journal of Coastal Research*. 2009, 25(1):257–264.
- UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. Medición del tamaño de partícula por difracción de luz <429>. En: *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. 31va. ed. Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention. 2008. pp.164.
- WEN. B; AYDIN. A; DUZGOREN-AYDIN, N. S. A comparative study of particle size analysis by sieve-hydrometer and laser diffraction methods. En: *Geotechnical Testing Journal*. 2002. (25):1-9.

# Desarrollo de superficies modificadas oro – anticuerpo anti-PSPB para su uso como biosensor en la detección de preñez bovina

Keel, K.<sup>(1,2)</sup>, Tosar, J. P.<sup>(1)</sup>, Laíz, J.<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Unidad de Bioquímica Analítica. Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(2)</sup> Departamento de Aguas y Productos Químicos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: jlaiz@cin.edu.uy

Recibido: 01/07/2010 - Aprobado: 19/10/2010

## Resumen

En este trabajo se presentan los resultados preliminares para el desarrollo de un biosensor amperométrico destinado a la cuantificación de Proteína B Específica de la Preñez (PSPB) en fluidos biológicos como medio de diagnóstico clínico precoz de la preñez bovina. A la superficie de oro modificada con ácido mercaptoundecanoico (MUA) se fijaron anticuerpos anti-PSPB y peroxidasa de rábano (HRP). Se verificó la inmovilización de las biomoléculas mediante voltamperometría cíclica y medida del ángulo de contacto. Se estudió el comportamiento electroquímico del electrodo desarrollado por medio de voltamperometría cíclica y medidas a potencial constante, estableciendo la relación entre el cambio de corriente catódica (al potencial de reducción de la quinona) y la concentración de PSPB. Esta relación se ve afectada por la formación de complejos antígeno – anticuerpo que limitan el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima, provocando una disminución en la señal eléctrica. El electrodo modificado de oro – anti-PSPB – HRP respondió de forma inversamente proporcional a la concentración de PSPB a un potencial de -200 mV (contra electrodo de referencia Ag/AgCl), tanto por voltamperometría cíclica como a potencial constante, y por tanto podría ser la base para el desarrollo de un biosensor amperométrico para detectar precozmente la preñez bovina.

Palabras clave: Proteína B Específica de la Preñez, inmunosensor, voltamperometría cíclica.

## Abstract

Due to big importance of early clinical diagnosis of pregnancy in cattle, the aim of this work was the development of an amperometric biosensor which enables protein quantification of pregnancy specific protein B in biological fluids. To achieve this goal Mercapto Undecanoic Acid was immobilized on the gold surface, with anti-PSPB and Horseradish Peroxidase. The immobilization was verified by electrochemical and non electrochemical methods, such as cyclic voltammetry and contact angle measurements respectively. The electrochemical performance of the electrode was studied by cyclic voltammetry and constant potential amperometry, to establish the relationship between the change in cathode current (the quinone reduction potential) and the concentration of PSPB. Due to the formation of large antigen antibody complexes which limit the access of the enzyme's specific substrate to its active site, the cathodic current would decrease as was observed. The developed gold – anti-PSPB – HRP electrode showed a lineal dependence on the concentration of PSPB at potential of -200 mV (vs Ag/AgCl), both by cyclic voltammetry and constant potential amperometry. Therefore this study could be use for the design of an amperometric biosensor which allows the detection of bovine pregnancy at the earlier stages.

Keywords: Pregnancy Specific Protein B, immunosensor, cyclic voltammetry.

## Introducción

La detección temprana de la preñez en el ganado resulta relevante para el productor desde el punto de vista económico, pues permite un uso racional de los recursos disponibles. Los ensayos hormonales constituyen hasta el momento los marcadores más precoces y eficientes de la preñez bovina. Sin embargo, la valoración de Proteína B Específica de la Preñez (PSPB) ha demostrado ser un marcador mucho más eficiente que los hormonales, debido a que su concentración se incrementa a nivel sérico semanas antes de que los valores hormonales se alteren significativamente (Ropstad, 1999). Se han realizado estudios comparativos con otros métodos, los cuales demostraron que es más exacto que la valoración de progesterona (Sasser, 1986) y que el ultrasonido (Ropstad, 1999). Aproximadamente en el día 25

de la preñez los valores séricos de PSPB se acercan a 1 ng/ml (Butler, 1982). Sobre la base de los estudios efectuados en las últimas décadas, algunos investigadores han planteado que las proteínas específicas de la preñez están implicadas en el mantenimiento del cuerpo lúteo (Butler, 1982), en la regulación de la función folicular (Kiracofe, 1993), en el reconocimiento maternal de la preñez y en el mantenimiento de la misma, mediante inducción de agentes luteotróficos y mecanismos antiluteolíticos como, por ejemplo, PGE<sub>2</sub> (Del Vecchio, 1995).

Debido a la gran importancia que reviste la detección precoz de preñez y lo útil que puede resultar la detección temprana en fluidos de la PSPB, se han desarrollado numerosos trabajos que han permitido su determinación por RIA y ELISA (enzime- linked immunosorbent assay), los métodos más empleados hasta el día de hoy (Sasser, 1986). Los inmunoensayos pueden ser específicos para PSPB, no obstante, en varios casos se dan reacciones cruzadas que impiden la unión de

PSPB marcada con el antisuero (Semambo, 1992). A su vez, estos métodos presentan la desventaja de que deben desarrollarse en el laboratorio y por personal especialmente entrenado, lo que aumenta sus costos. Sería de interés, en consecuencia, hallar otra estrategia experimental que resultara de más fácil aplicación y/o mejorara la sensibilidad y robustez del diagnóstico. Un método novedoso podría ser el uso de biosensores electroquímicos basado en la inmovilización de anticuerpos anti-PSPB.

Las ventajas de los biosensores son su relativa simpleza, el equipamiento económico, su alta sensibilidad y su posibilidad de automatización (Ghindili, 1998).

Los biosensores de afinidad, con anticuerpos como elementos de bioreconocimiento, reciben el nombre de inmunosensores (Morgan, 1996). Dado que los anticuerpos no poseen electroactividad intrínseca, se han desarrollado algunas estrategias, emplear anticuerpos o antígenos marcados con un isótopo radiactivo, enzimas, o partículas luminiscentes, entre otras, como mecanismos de detección tanto electroquímicos como no electroquímicos (Evtugyn, 2003). La inmovilización de los anticuerpos sobre la superficie del electrodo es un paso crítico, ya que deben mantener su estructura nativa para el desarrollo del biosensor (Shaojun, 1997). A tales efectos, la modificación de superficies de oro con monocapas auto-ensambladas de alcanotioles es una de las prácticas más aplicadas en los últimos años (Sun, 2005). Una monocapa de tioles auto-ensamblada se comporta como un microambiente celular con una estructura de bicapa lipídica, por lo que se pueden inmovilizar sobre ellas biomoléculas como anticuerpos, ácidos nucleicos, enzimas, etcétera (Chaki, 2002). La fijación de anticuerpos a la superficie del electrodo puede medirse por métodos no electroquímicos, como la medida del ángulo de contacto (Wang, 2006).

Entre los métodos electroquímicos de análisis, la voltamperometría cíclica es altamente utilizada en estudios de procesos de adsorción y reacciones de óxido-reducción en disolución (Gileadi, 1993). Un método de detección indirecto mediante la coimmobilización de los anticuerpos y la enzima peroxidasa de rábano (HRP: Horseradish Peroxidase) ha permitido desarrollar inmunosensores amperométricos en los cuales se ha visto que la corriente catódica varía proporcionalmente con la concentración del antígeno en estudio (Evtugyn, 2003), base sobre la cual se ha llevado a cabo este trabajo.

El antígeno (PSPB) al interactuar específicamente con los anticuerpos coimmobilizados con la enzima sobre la superficie del electrodo forma grandes complejos antígeno-anticuerpo, que limitan el acceso del sustrato específico al sitio activo de la enzima, provocando por tanto una disminución en la señal eléctrica medida (Figura 1). Por esta razón, si se comparara la señal obtenida en una disolución buffer, que contenga hidroquinona y peróxido de hidrógeno, con la obtenida, de igual forma, luego de incubar el electrodo en distintas diluciones de PSPB, se espera una inhibición de la corriente catódica proporcional al aumento de concentración de la proteína.

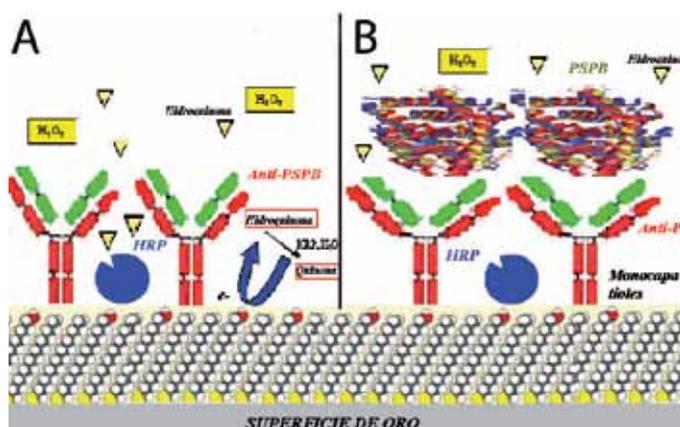


Figura 1. Esquema del funcionamiento de un inmunosensor donde se coimmobiliza anticuerpo anti-PSPB y HRP.

**A.** Funcionamiento del biosensor sin la presencia de PSPB, el sustrato accede hasta la enzima, la cual cataliza la reacción (Hidroquinona  $\rightarrow$  Quinona) y se detecta una señal eléctrica por la reducción electroquímica de la quinona (Quinona  $\rightarrow$  Hidroquinona).

**B.** Funcionamiento del biosensor en presencia de PSPB, la unión de la PSPB a los anticuerpos anti-PSPB limitan el acceso de la hidroquinona hasta el sitio activo de la enzima, disminuyendo la señal eléctrica producida por la reacción.

Este trabajo está orientado al desarrollo futuro de un electrodo específico para la determinación de la PSPB en fluidos biológicos. Con este objetivo se inmovilizó sobre superficies de oro anticuerpos anti-PSPB y HRP. La señal se obtuvo realizando medidas electroquímicas luego de colocar el electrodo en contacto con disoluciones de PSPB de concentración creciente.

## Materiales y Métodos

### Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de calidad puro para análisis. En la preparación de soluciones y lavado de electrodos se utilizó agua de calidad ultrapura (agua MiliQ, resistividad 18,2 M $\Omega$ ). Buffer Fosfato Salino (PBS), pH 6,9, 0,0117 M (NaCl 0,16 M, KCl 0,0027 M). Disolución piraña, 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (v/v). KMnO<sub>4</sub> 5% (m/v) en solución de NaOH (2,5 g/l). Disolución de Ácido Mercaptoundecanoico (MUA) 10 mm en etanol absoluto. La disolución de trabajo de anticuerpos anti PSPB – HRP se preparó a partir de anticuerpos liofilizados que se suspendieron en agua hasta una concentración final de 1,37  $\mu$ g/ml y de una disolución de HRP 0,05 U/ml (donada por la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química). Para ello se adicionó un volumen de 5  $\mu$ l de la disolución de HRP a una alícuota de 10  $\mu$ l de la disolución de anticuerpos diluida 10 veces en buffer PBS. Como cupla indicadora en los estudios voltamétricos se utilizó K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/ K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O en una concentración final de 2 mm cada especie en una disolución de nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) 0,2 M. Para preparar la curva de diluciones estándar de PSPB se resuspendió una muestra liofilizada de la misma en PBS hasta una concentración final de 6,3  $\mu$ g/ml; a partir de esta solución se prepararon diluciones de concentraciones finales de 500, 250, 100, 10 y 1 ng/ml. Las muestras liofilizadas de PSPB y anticuerpo anti-PSPB fueron donadas por el Dr. Jonathan Green, profesor asistente de la División Ciencia de los Animales de la Universidad de Missouri-Columbia (<http://animalscience.missouri.edu/faculty/green>).

El electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl 3M) fue preparado en el laboratorio sumergiendo un electrodo de Ag/AgCl en una disolución de KCl 3M contenida en un capilar en forma de U, estandarizándose frente a un electrodo de quinidrona. Todo el material de vidrio utilizado fue previamente tratado con permanganato de potasio y solución piraña y luego enjuagado con abundante agua ultrapura.

### Limpieza de los alambres de oro

Los alambres de oro (> 99,99% de pureza, diámetro 1 mm y longitud 2 cm, adquiridos en Goodfellow, Reino Unido) se pulieron con papel lija de grano 1000 y luego se trataron según se describe en Ruder (1988). Se verificó la limpieza mediante una voltamperometría cíclica en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M a 100 mv/s desde 0 a 1800 mv vs Ag/AgCl (Fu, 2005). Para realizar todas las medidas por voltamperometría cíclica se utilizó un potencióstato Voltalab, Radiometer Analytical, modelo PGZ 301. Las medidas se llevaron a cabo en una celda electroquímica estándar, empleando un sistema de tres electrodos, consistente en un electrodo de trabajo de oro (u oro modificado), un contraelectrodo de carbono grafito y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Se midió además el ángulo de contacto de la superficie (Wang, 2006). Para ello se empleó un goniómetro, diseñado según Lages (2006).

## Inmovilización de MUA y del anticuerpo anti-PSPB

Un alambre de oro fue incubado durante 48 horas en una solución de MUA. Luego de ser enjuagado con etanol se depositó sobre su superficie la solución correspondiente de anti-PSPB y HRP, y se incubó toda una noche. Las superficies laterales del electrodo se recubrieron con teflón, dejando expuesta un área circular de 1 mm de diámetro correspondiente a la sección transversal del mismo. Se verificó la inmovilización mediante voltamperometría cíclica y medida del ángulo de contacto, como se describe en Mello (2002). Las medidas de voltamperometría cíclica se realizaron utilizando una velocidad de barrido de 100 mv/s y potenciales de cambio de -200 y +600 mv. En las medidas de ángulo de contacto la gota depositada de agua mili Q fue de 0,1 µl.

### Verificación del funcionamiento del biosensor

El comportamiento del electrodo fue estudiado mediante voltamperometría cíclica y a potencial constante, determinando en ambos casos la variación de la corriente catódica (al potencial de reducción de la quinona) en función de la concentración de PSPB. Cada electrodo se incubó en soluciones de concentración creciente de PSPB durante 15 minutos. Luego de realizadas las medias correspondientes y antes de incubar en la siguiente disolución, el electrodo se enjuagó cuidadosamente con solución buffer. En la solución de trabajo se agregó, previo a cada medida, hidroquinona y peróxido de hidrógeno hasta una concentración final de 1 mM de cada uno.

En la voltamperometría cíclica se utilizó siempre una velocidad de barrido de 100 mv/s y potenciales de cambio de -500 y + 1000 mv. En la amperometría a potencial constante fue usada la misma celda que en casos anteriores; para su realización se diseñó un circuito formado por una fuente regulable, un milivoltímetro y un miliamperímetro. Las medidas se realizaron a -200 mv, voltaje elegido a partir de las medidas de voltamperometría cíclica.

Todos los potenciales que se mencionan en el presente trabajo son referidos al estándar de Ag/AgCl.

## Resultados y Discusión

### Limpeza de los alambres de oro

Se obtuvo un voltamperograma en donde se observa la evolución de la reacción de oxígeno a partir de +1200 mv en la zona de oxidación anódica, mientras que en la zona de reducción catódica puede apreciarse el pico característico de la reducción del óxido formado en el barrido anódico a +900 mv. La ausencia de otros picos en la región de doble capa electroquímica del voltamperograma permite concluir que el proceso de limpieza fue efectivo y no existen otras especies redox sobre la superficie del electrodo. En consecuencia se procedió a realizar los pasos siguientes de inmovilización y detección.

### Verificación de inmovilización de MUA y anticuerpo

**Medidas de ángulo de contacto.** El grupo carboxílico (polar) del MUA provoca un cambio de humectabilidad de la superficie (ver Figura 2 y Tabla 1), que confiere a las interfases formadas un carácter más hidrofílico y, como resultado, el ángulo de contacto disminuye (Schreiber, 2000). El valor reportado de ángulo de contacto para MUA adsorbido sobre oro es  $58,1^\circ \pm 3,5$  (Lages, 2006), que coincide razonablemente con el valor obtenido en nuestro laboratorio,  $59,4^\circ \pm 0,9$ . El aumento del ángulo de contacto luego de la incubación con las

proteínas (anticuerpos y HRP) indica probablemente un incremento de la hidrofobicidad de la superficie, debido a la presencia de grupos apolares de las cadenas laterales expuestas de los aminoácidos constituyentes. Los resultados obtenidos fueron reproducibles y similares a los reportados por Danczyk (2003).

Ángulo contacto promedio Método utilizado: Gota sésil			
	Oro	Oro - MUA	Oro - MUA Anti-PSPB y HRP
Ángulo de contacto	64,1	59,4	65,5
Desviación estándar	1,40	0,86	0,94
DER (%)*	0,90	0,51	0,61

Tabla 1. Resultados de medidas de ángulo de contacto.  
\*DER: Desviación Estándar Relativa. n=5



Figura 2. Imágenes de la gota de agua colocada sobre: a) oro desnudo, b) oro - MUA y c) oro - MUA - Anti-PSPB y HRP.

**Voltamperometría Cíclica.** En los voltamperogramas se aprecian notables cambios en dependencia del grado de modificación de la superficie (Gráfico 1). Si se formase una monocapa auto ensamblada de tioles, es de esperarse que la carga superficial negativa debida a los grupos carboxilos del MUA produzca una repulsión electrostática al caracterizar los electrodos con una cupla redox negativa ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ). Esto afectaría la accesibilidad de la cupla al electrodo y por consiguiente produciría una disminución de la señal. Si se comparan las curvas correspondientes al sistema oro - MUA con las registradas para el oro desnudo, se observa una importante disminución de las intensidades registradas para todos los potenciales, en particular en los potenciales de oxidación y reducción de la cupla, resultados que coinciden con los obtenidos por Chaki (2002). En conclusión, las bajas corrientes registradas permiten afirmar que se formó la monocapa de MUA.

La inmovilización de las proteínas neutraliza la carga negativa generada por la monocapa de MUA como producto de interacciones electrostáticas entre el grupo carboxílico desprotonado del ácido y el grupo amino lateral totalmente protonado de la lisina al pH de trabajo, reestableciéndose la capacidad de la cupla redox de acceder a la superficie. El aumento registrado en la intensidad de los picos de oxidación y reducción de la cupla evidencia que el proceso de inmovilización proteica fue exitoso.

La distancia entre los picos catódicos y anódicos aumenta en los voltamperogramas correspondientes a los electrodos oro - MUA respecto al oro desnudo, con diferencias de potencial de 200 mv para el oro desnudo y 350 mv para el oro incubado con MUA. Medidas similares fueron obtenidas por Wang (2004) y Chaki (2002). La distancia entre los picos para la superficie oro - MUA - anti-PSPB fue ligeramente menor que para el oro, aunque de valores aparentemente no significativos. Estos fenómenos pueden explicarse también en las diferencias de polaridades antes expuestas, la superficie negativa tióica disminuiría la difusión, con lo cual el sistema se acercaría a condiciones de irreversibilidad.

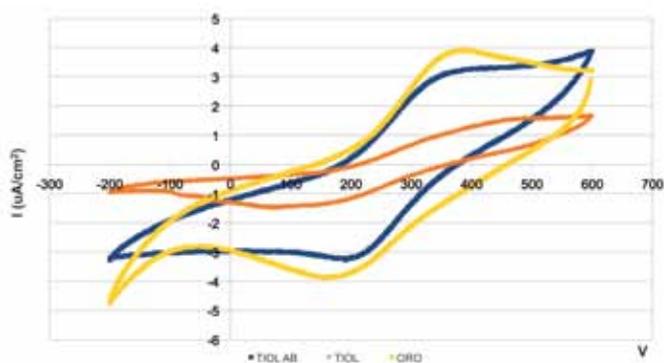


Gráfico 1. Voltamperograma cíclico de electrodo de oro desnudo (línea amarilla), incubado con MUA (línea roja) e incubado con anticuerpo anti-PSPB y HRP (línea azul).

## Determinación del potencial de reducción electroquímica de la quinona

Con la finalidad de establecer el potencial de medida en el cual ocurre la reducción electroquímica de la quinona (pico catódico), se realizaron ensayos de voltamperometría cíclica (Gráfico 2). Se procuró reproducir las condiciones que serían posteriormente utilizadas para la detección de PSPB, con la diferencia de que la quinona se generó por oxidación electroquímica a 500 mV y no enzimáticamente. Esto produjo una concentración de quinona suficientemente alta como para observar su reducción electroquímica. De este modo se estableció que en el sistema de estudio la quinona es capaz de reducirse a un potencial de  $-200$  mV.

### Verificación del funcionamiento del biosensor

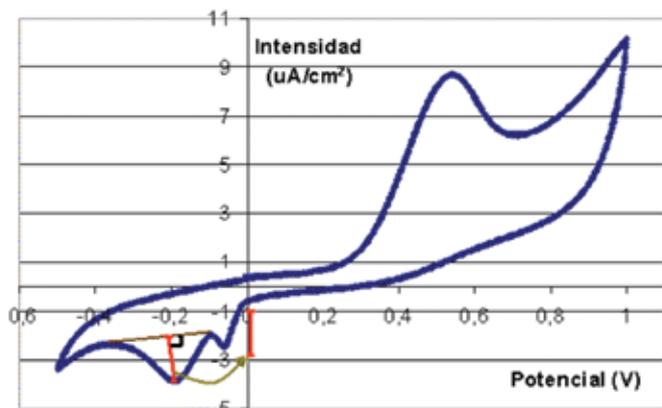


Gráfico 2. Voltamperograma de electrodo de oro - anti-PSPB - HRP sin incubación con PSPB. La medida de la intensidad del pico catódico se realizó midiendo la altura de pico con respecto a la línea de base del mismo y luego se determinó el valor de intensidad extrapolando en el gráfico. La línea de base se representa por la línea marrón y la altura de pico con la línea roja.

**Voltamperometría Cíclica.** Para este tipo de ensayos se incubaron los electrodos en soluciones de concentraciones crecientes de PSPB y se determinó la intensidad de corriente en el pico catódico debido a la reducción electroquímica de la quinona generada en este caso a partir de la hidroquinona por acción enzimática y electroquímica. Los resultados obtenidos se graficaron en términos de variación de la fracción de corriente en función de la concentración de PSPB (Gráfico 3). Puede apreciarse que la corriente disminuye en función del aumento de la concentración de PSPB, debido a que la unión de la proteína al anticuerpo anti-PSPB provoca un impedimento estérico que limita la unión de la hidroquinona a la enzima HRP. Como consecuencia, no se lleva a cabo la reacción enzimática, disminuyendo así la concentración de quinona disponible en solución. Una menor concentración de quinona, cuya reducción pueda ser registrada en la superficie del electrodo, provoca la disminución de la intensidad de la corriente medida.

La disminución de la corriente es proporcional al aumento de PSPB hasta ciertos niveles de concentración de proteína (250 ng/ml), a partir de los cuales se apreciaría una cierta saturación.

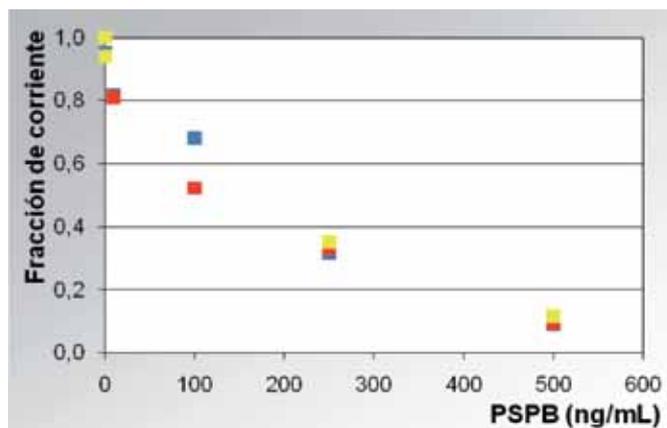


Gráfico 3. Fracción de corriente en función de la concentración de PSPB obtenido a partir de los ensayos de voltamperometría cíclica. Se muestran con diferentes colores los resultados de tres ensayos independientes.

**Medidas a potencial constante.** Si se comparan el gráfico de fracción de corriente en función de la concentración de PSPB obtenido a potencial constante (Gráfico 4), se observa la misma tendencia que en el gráfico obtenido por voltamperometría cíclica. Se puede observar que la saturación del electrodo a potencial constante comienza a valores menores de PSPB que para las medidas obtenidas por voltamperometría cíclica en las mismas condiciones. Por otro lado, la variación de la corriente (respuesta del electrodo) es mayor a bajas concentraciones de PSPB en las medidas a potencial constante que por voltamperometría cíclica.

Ambas observaciones indican que las medidas a potencial constante son más sensibles. El fenómeno de una mayor variación en la señal medida correspondiente a variaciones pequeñas de antígeno, en el caso de medidas a potencial constante, puede explicarse porque en ese caso la quinona proviene solamente de la acción enzimática, y se descarta de ese modo su generación electroquímica por exposición a altos potenciales, como sucede en el caso de la voltamperometría cíclica.

Además del mayor grado de respuesta, las medidas a potencial constante tienen la ventaja de que a la hora de producir el biosensor resulta más económico ya que no se requiere instrumental costoso, y su uso a nivel de campo sería más sencillo, dado que el método puede ser fácilmente automatizado.

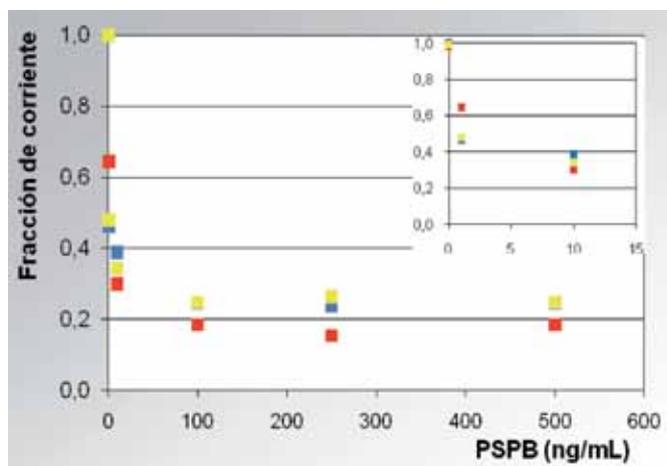


Gráfico 4. Fracción de corriente en función de la concentración de PSPB, obtenido a partir de los ensayos a potencial constante. En el recuadro se muestra en una escala más apropiada la respuesta del electrodo frente a las tres concentraciones menores.

## Conclusiones

Este trabajo constituye la base preliminar para el desarrollo de un biosensor amperométrico que permita la cuantificación de PSPB en fluidos biológicos con el fin de detectar precozmente el estado de preñez bovina.

Se ha demostrado satisfactoriamente que es posible la adsorción de anticuerpos anti-PSPB y HRP a una superficie de oro modificada previamente con un tiol por los métodos elegidos.

Las proteínas inmovilizadas sobre la superficie del electrodo conservan sus propiedades biológicas, lo que permite, por métodos electroquímicos, reconocer y cuantificar PSPB contenida en una muestra especialmente preparada.

Se ha expuesto que el uso como electrodo de la superficie modificada obtenida permite discriminar distintas concentraciones de PSPB en una muestra.

Si bien este estudio ha demostrado que la superficie desarrollada es capaz de reconocer la presencia de PSPB en muestras acuosas especialmente preparadas, es necesario realizar estudios de validación en muestras reales de sangre y sueros de animales preñados y no preñados para establecer las posibles reacciones cruzadas que pueden existir y la sensibilidad del método en una muestra real, así como el límite de detección de PSPB.

## Reconocimientos

Al Dr. Santos Gama, a los integrantes de la cátedra de Bioquímica de Facultad de Química por la donación de la HRP, al Dr. Jonathan Green de la Universidad de Missouri- Columbia por la donación de anticuerpos y proteínas liofilizadas y a los integrantes del Instituto de Biomateriales de Facultad de Ciencias por permitirnos el uso de su potenciómetro.

## Referencias

- BUTLER, J.; HAMILTON, W.; SASSER, R.; RUDER, C.; HASS, G.; WILLIAMS, R. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. En: *Biology of Reproduction*. 1982, 26(5):925-933.
- CHAKI, N.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. En: *Biosensors and Bioelectronics*. 2002, 17(1-2):1-12.
- DANCZYK, R.; KRIEDER, B.; NORTH, A.; WEBSTER, T.; HOGENESCH, H.; RUNDELL, A. Comparison of antibody functionality using different immobilization methods. En: *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 84(2):215-223.
- DEL VECCHIO, R.; SUTHERLAND, W.; SASSER, R. Effect of pregnancy-specific protein B on luteal cell progesterone, prostaglandin, and oxytocin production during two stages of the bovine estrous cycle. En: *Journal of Animals Science*. 1995, 73:2662-2668.
- EVTUGYN, G.; MINGALEVA, A.; BUDNIKOV, H.; STOIKOVA, E.; VINTER, V.; EREMIN, S. Affinity biosensors based on disposable screen-printed electrodes modified with DNA. En: *Analytica Chimica Acta*. 2003, 479(2):125-134.
- FU, Y.; YUAN, R.; TANG, D.; CHAI, Y. XU, L. Study on the immobilization of anti-IgG on Au-colloid modified gold electrode via. En: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005, 40(1):61-66.
- GHINDILI, A.; ATANASOV, P.; WIKINS, M. y WIKINS, E. Immunosensors: electrochemical sensing and other engineering approaches. En: *Biosensors and Bioelectronics*. 1998, 13:113-131.
- GILEADI, E. *Electrode kinetics for chemists, chemical engineers, and material scientists*. New York: VCH Publishers, 1993. ISBN: 0-471-18858-1.
- KIRACOFÉ, G.; WRIGHT, J.; SCHALLES, R.; RUDER, C.; PARISH, S. Y SASSER R. Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. En: *Journal of Animal Science*. 1993, (71):2199-2205.
- LAGES, C. *Implementación de la técnica de ángulo de contacto para el estudio de interfases*. Montevideo: Facultad de Ciencias, 2006. (Tesis de grado)
- MELLO, L.; KUBOTA, L. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. En: *Food Chemistry*. 2002, 77(2):237-256.
- MORGAN, C.; NEWMAN, D.; PRICE, C. Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. En: *Clinical Chemistry*. 1996, (42):193-209.
- ROPSTAD, E.; JOHANSEN, O.; KING, C.; DAHL, E.; ALBON, S.; LANGVATN, R.; IRVINE, R.; HALVORSEN, O.; SASSER, R. Comparison of plasma progesterone, transrectal ultrasound and pregnancy specific proteins (PSPB) used for pregnancy diagnosis in reindeer. En: *Acta Vet. Scand.* 1999, 40(2):151-162.
- RUDER C.; STELLFLUG, J.; DAHMEN J.; SASSER, R. Detection of pregnancy in sheep of sera for pregnancy-specific protein B. En: *Theriogenology*. 1988, 29(4):905-911.
- SASSER, R.; RUDER, C.; IVANI, K.; BUTLER, J. y HAMILTON W. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. En: *Biology of Reproduction*. 1986, 35:936-942.
- SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. En: *Progress in Surface Science*. 2000, 65(5):151-256.
- SEMAMBO, D.; AYLIFET, R.; BOYD, J.; Y TAYLOR, D. Ultrasonographic study of early embryonic loss induced by *Actinomyces pyogenes* in cattle. En: *Veterinarian Record*. 1992, 131:7-12.
- SHAOJUN, D; JINGHONG, L. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. En: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1997, 42(1):7-13.
- SUN, T.; FENG, L.; GAO, X.; JIANG, L. Bioinspired surfaces with special wettability. En: *Acc. Chemycal*. 2005, 38(8):644-352
- WANG, M.; WANG, L.; WANG, G.; JI, X.; BIE Y.; LI, T.; GONG, S. Y LI, J. Application of impedance spectroscopy for monitoring colloid Au-enhanced antibody immobilization and antibody-antigen reactions. En: *Biosensors and Bioelectronics*. 2004, 19(6):575-582.
- WANG Z.; VIANA, A.; JIN, G.; ABRANTES, L. Immunosensor interface based on physical and chemical immunoglobulin G adsorption onto mixed self-assembled monolayers. En: *Bioelectrochemistry*. 2006, 69(2):180-186.

# Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes

Keel, K. <sup>(1)</sup>, Míguez, D. <sup>(1)</sup>, Soares, A. <sup>(2)</sup>, Parodi, A. <sup>(3,4)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Aguas y Productos Químicos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Cranfield University, School of Applied Science, Centre for Water Science, College Road, Cranfield, Bedfordshire, MK43 0AL - <sup>(3)</sup> Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(4)</sup> Unidad de Biología Molecular. Instituto Pasteur, Uruguay.

Contacto: kkeel@latu.org.uy

Recibido: 1/07/2010 - Aprobado: 25/10/2010

## Resumen

Los disruptores endocrinos son sustancias químicas, exógenas al organismo, capaces de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo. Un grupo de ellos, los compuestos estrogénicos, pueden ocasionar efectos negativos sobre la capacidad reproductiva de algunos peces, disminución de la fertilidad, la aptitud sexual y la producción de espermatozoides y feminización de los machos. En este trabajo se describe el desempeño analítico de un método para la cuantificación de estrogénicidad en aguas. Se utilizó la técnica Yeast Estrogen Screen (YES) con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, una levadura modificada genéticamente que expresa el receptor de estrógenos humano y un plásmido de expresión con el gen reportero lacZ, bajo el control de elementos de respuesta a estrógenos. Dicho gen codifica para la  $\beta$ -galactosidasa, que se secreta al medio y metaboliza un sustrato cromogénico, observándose un cambio de color que se mide a 420 nm. Se utilizaron estándares de 17  $\beta$ -estradiol para realizar una curva de calibración en el rango de concentraciones entre 1.75 ng/l y 7.5  $\mu$ g/l. Las curvas sigmoideas dosis-respuesta obtenidas se ajustaron mediante la función de Hill y los  $r^2$  fueron mayores a 0,95. El límite de detección fue de 55 ng/l. La estrogénicidad para las muestras ensayadas fue no detectable.

Palabras clave: Estrogénicidad, YES,  $\beta$ -galactosidasa.

## Abstract

Endocrine disruptors are exogenous chemical substances to the organism, capable of altering the homeostasis of the endocrine-reproductive system. A group of these, estrogenic compounds, may cause negative effects on reproductive capacity of some fish, decreasing fertility, sexual ability, sperm production and feminization of males. This paper describes the analytical performance of a method for the quantitation of estrogenicity in water. The technique used was the Yeast Estrogen Screen (YES) with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, a genetically modified yeast with human estrogen receptor expression and a plasmid with the lacZ reporter gene under the control of estrogen response elements. The gene coding for  $\beta$ -galactosidase, which is secreted to the medium catalyzes the metabolism of a chromogenic substrate, showing a color change measure to 420 nm. The standard 17  $\beta$ -estradiol was used to build a calibration curve in the range of concentrations between 1.75 ng/l and 7.5  $\mu$ g/l. Sigmoid curves of dose - response obtained were fitted by the Hill function and  $r^2$  was greater than 0.95. The method detection limit is 55 ng/l. The analyzed samples showed no detectable estrogenicity.

Keywords: Estrogenicity, YES,  $\beta$  galactosidase.

## Introducción

Durante las dos últimas décadas se ha generado un gran interés por los disruptores endocrinos (endocrine disrupting compounds - EDC). Los EDC son sustancias químicas, exógenas al organismo, que tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo (Argemi, 2005). En general, son sustancias lipofílicas, por lo cual se bioacumulan fácilmente en el tejido adiposo, persisten y pueden transmitirse en la cadena alimentaria.

Los EDC pueden ser encontrados en ambientes naturales: feromonas, micoestrógenos, fitoestrógenos y hormonas esteroideas presentes en desechos humanos y animales, los cuales son descargados a efluentes municipales y plantas de tratamiento que en muchas ocasiones no tienen tecnología para removerlos (Wolfand, 2007). Entre los EDC artificiales se encuentran insecticidas, muchos de ellos de uso doméstico, como el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos, el aldrin y el paratión, funguicidas (mancozeb, zineb), moluscocidas (tributilestaño) y herbicidas (atrazina, trifluralin)

(Jobling, 2002). Además, pertenecen a este grupo sustancias de uso cotidiano en el hogar o la industria, como alquilfenoles (tensoactivos no iónicos en artículos de limpieza y en ciertos alimentos elaborados), bifenilos policlorados (PCBs) (lubricantes y aisladores en transformadores), ftalatos (componentes de plásticos blandos en juguetes infantiles), bisfenol-A (policarbonatos y resinas epoxi, en mamaderas transparentes y envases de alimentos, respectivamente), estrógenos artificiales, como el dietilestilbestrol - DES (anticonceptivo), 3-benzofenona (componente de los filtros UV en cremas) y contaminantes ambientales, como las dioxinas, los furanos y ciertos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Olea, 2001).

Los EDC pueden ser la causa de: incremento de anomalías reproductivas y disfunciones sexuales, tanto en humanos como en la vida salvaje (Arnold, 1996), aumento de ciertos cánceres, como por ejemplo el de seno (De Boever, 2001), baja cantidad de espermatozoides (Jobling, 2002), disminución de la fertilidad (Parrott, 2005), cambio de la aptitud sexual (Kristensen, 2005), feminización de peces machos (Lange, 2001), anatomía gonadal modificada, concentraciones

hormonales alteradas en plasma (Arnold, 1996).

Años atrás se utilizaban los ensayos químicos para determinar la presencia de compuestos estrogénicos; hoy en día los estudios basados en bioindicadores son los más aplicados. Estos indicadores no sólo distinguen activadores xenobióticos mediados a través de unión ligando-receptor, como los estrógenos, sino también a aquellos que pueden estimular indirectamente eventos intracelulares (Biales, 2007).

## Funcionamiento del Biosensor - *Saccharomyces cerevisiae* recombinante

En este caso se utilizan como biosensor levaduras *Saccharomyces cerevisiae* manipuladas genéticamente, con el objetivo de otorgarle la capacidad de detectar el potencial estrogénico de compuestos con actividad hormonal por medio de respuestas colorimétricas. Esta técnica lleva por nombre "Yeast Estrogen Screen" (YES), según lo establecido por el protocolo de Routledge y Sumpter (1996). *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo al que se le conoce totalmente su genoma y es considerado también como modelo simple de célula eucariótica. Para transformarlo en un biosensor se lo modifica específicamente, con la adición de la secuencia de ADN del receptor estrogénico humano (hER- $\alpha$ ) en el genoma propio de la levadura y de un plásmido que lleva un gen reportero (lac-Z), el cual codifica para la síntesis de la enzima  $\beta$ -galactosidasa gracias a la ayuda del promotor transcripcional y secuencias específicas de ADN que se comportan como elementos de respuesta a estrógenos (estrogen responsive elements -ERE).

Los estrógenos tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógeno y luego regular la expresión de ciertos genes (Figura 1). El receptor de estrógeno es expresado desde el genoma de la levadura (1) y capaz de unirse a los ERE, los cuales se ubican por delante de un promotor fuerte del plásmido de expresión (2). Cuando la levadura modificada se expone a un contaminante con potencial estrogénico, se une al receptor hormonal y éste se transforma en un receptor activo (3). El receptor activo modula así positivamente la transcripción génica. Esto provoca la expresión del gen reportero lac-Z (4) y la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, que es secretada al medio (5). Esta enzima puede metabolizar sustratos cromogénicos como O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG), hidrolizado en una solución alcalina a galactosa y O-nitrophenol (ONP). Se observa un cambio de color de incoloro a amarillo debido a la presencia de ONP; la medida de absorbancia se realiza a 420 nm (6).

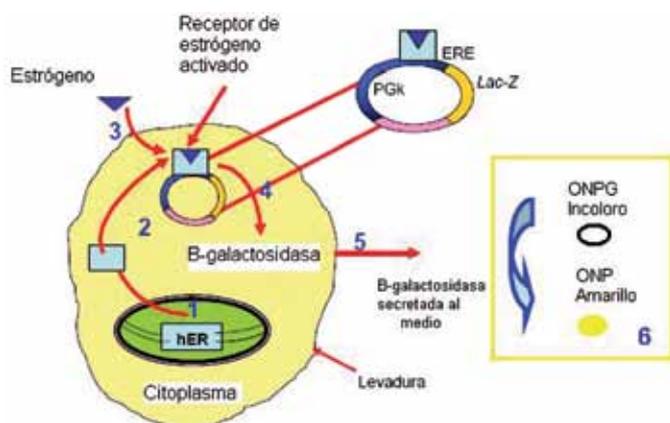


Figura 1. Esquema de las reacciones en cadena que ocurren luego de que un compuesto estrogénico se une al receptor de estrógenos incorporado en la levadura (extraída y modificada de Routledge, 1996).

El objetivo de este trabajo fue poner a punto la técnica de YES, realizar un estudio de desempeño analítico del método, comparando su sensibilidad con la obtenida por otros autores y, por último, aplicarlo en la determinación de posible estrogénicidad de muestras ambientales, tales como agua natural y efluentes.

## Materiales y Métodos

El agua usada para la realización de soluciones fue ultrapura (agua miliQ de resistividad mayor a 18,2 M $\Omega$ ) y esterilizada previamente con filtración por 0,2  $\mu$ m. El material utilizado fue esterilizado y todas las manipulaciones se realizaron en ambiente estéril. Las placas de selección se prepararon agregando 20 ml de YNB (Yeast Nitrogen Base without Amino Acid, Difco, 67 g/l), 4 g de bactoagar (Amresco, grado bacteriológico) y 156 ml de agua, luego de ser autoclavadas se le adicionaron 2 ml de solución de Lisina (L-Histidina-HCl, Amresco USP grade, 2,4 g/l), 2 ml de solución de Histidina (L-Histidina-HCl, Amresco FCC grade, 2,4 g/l) y 20 ml de solución de dextrosa 20% (Mallinckrodt Chemical, Estados Unidos). Luego se colocaron aproximadamente 15 ml de medio por cada placa de aproximadamente 10 cm de diámetro (Nelson, 2007). El medio de crecimiento fue preparado con 100 ml de YNB previamente autoclavado (67 g/l), 100 ml de dextrosa 20%, 10 ml de lisina (1,8 g/500ml) y 10 ml de histidina (1,2 g/500ml) para 1000 ml de volumen final. Luego se esteriliza filtrando por filtros de 0,2  $\mu$ m (cellulose nitrate filter, Santorius, Goettingen, Alemania) (Nelson, 2007).

### Extracción de muestras en fase sólida

Las muestras ensayadas fueron provenientes de la zona de mezcla de un efluente cloacal con agua natural y un efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario, ambas con posible presencia de sustancias estrogénicas. Se realizó una toma de 1 litro de muestra, acidificando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta pH 2,0 y se filtró por 0,45  $\mu$ m (filtros de membrana de vidrio, Macherey Nagel, Deutshlan, Suiza). Se realizó una extracción en fase reversa (Sep-Pak® Vac 6cc, 500mg, Waters, Irlanda) con equipo de filtración Easy-Prep (Whatman, Inglaterra). Previamente la columna se acondicionó con 5 ml de metanol anhidro y 5 ml de agua. Luego de la extracción la columna se centrifugó por 10 minutos a 2000 g y se secó bajo corriente de nitrógeno. La elución se realizó con 5 ml de acetona, luego se secó bajo corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 ml de etanol absoluto. Se almacenó a 4 °C hasta la realización del ensayo (máximo 14 días) (Pawlowski, 2004).

### Reconstitución de levadura recombinante

Se trabajó con la cepa de levadura recombinante (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa BJ3505) que contiene el receptor de estrógenos humano (Gaido, 1997). Para la reconstitución se colocaron los filtros con la cepa de levadura en forma invertida dentro de una placa de selección, se cultivaron a 30 °C y se esperó entre cinco y siete días a que las colonias se hicieran visibles.

Luego de crecidas se repicaron las colonias a otra placa de selección y una vez que crecieron nuevamente se seleccionó una colonia y se la colocó en medio Gold en un tubo de polipropileno (medio Gold en Nelson, 2007, p. 88). Se mantuvo toda la noche a 30 °C con agitación (300 rpm). Con el fin de conservar la levadura para subsiguientes análisis, se extrajeron alícuotas iguales de cultivo de levadura y de solución autoclavada de glicerol 30% y se las mantuvo a -80 °C.

## Ensayo de estrogenicidad

Se cultivó toda la noche 1 ml del cultivo de levadura, almacenado a -80 °C, con 9 ml de medio de crecimiento (30 °C y 300 rpm). A la mañana siguiente se adicionó 10 ml de medio de crecimiento y se permitió crecer hasta la tarde; luego se diluyó con mismo medio hasta densidad óptica de 0,03 (660 nm). Se adicionaron 100 µl de solución de sulfato de cobre pentahidratado 10 mm, por cada 20 ml de solución de levadura. Se colocaron 5 ml del cultivo en tubos de 50 ml, se dispuso de 10 tubos para blanco con agregado de 5 µl de etanol absoluto, dos tubos por cada muestra con agregado de 5 µl de cada extracto de muestra y un tubo por cada estándar de estradiol (5 µl de estándar correspondiente). Los estándares se realizaron a partir de diluciones seriadas de un stock de 1.89 g/l (material certificado, Dr. Ehrenstorfer, Augsborg, Alemania) en etanol absoluto. Las concentraciones fueron desde 1.75 ng/l a 7.5 µg/l. A continuación se incubó 18 hs a 30 °C y 300 rpm y se diluyó posteriormente con medio de crecimiento hasta que la OD fuera de 0.25 (660 nm).

Para la continuación del ensayo se utilizó el kit Yeast β Galactosidase Assay (Thermo Fisher Scientific, 2010). Se colocaron 70 µl de cada uno de los tubos ensayados por triplicado en una placa de ELISA (en tres pocillos de la placa se colocaron 70 µl de medio de crecimiento). Se agregó 70 µl de solución de trabajo (mezcla 1:1 de Y-PER reagent y βgalactosidase Assay buffer) y se midió absorbancia a 660 nm con un lector de multiplaca, Multiskan EX de Thermo Scientific, Shanghai, China. Se comenzó el conteo con el cronómetro y al aparecer un color amarillo se midió absorbancia a 420 nm (aproximadamente 2 a 4 horas después de agregada la solución de trabajo) (Yeast β Galactosidase Assay Kit Instructions Microplate Plate Assay Protocol, non-stopped).

## Cálculos y tratamiento estadístico

$$\text{Actividad } (\beta - \text{Galactosidasa}) = \frac{1000 \times (A_{420\text{muestra}} - A_{420\text{mediocultivo}})}{T_{(\text{minutos})} \times V_{(\text{mL})} \times A_{(660\text{muestra}} - A_{660\text{mediocultivo}})}$$

T: tiempo transcurrido desde agregado de solución de trabajo hasta la medida.

V: volumen final del cultivo

$$\text{Actividad relativa: } \frac{\text{Actividad } \beta\text{-Galactosidasa} \times 100}{\text{Mayor actividad de la } \beta\text{-Galactosidasa obtenida en estándar}}$$

Para el análisis estadístico se trabajó con las actividades relativas. Los ensayos de dosis-respuesta fueron ajustados mediante la función de Hill (inrate Hill-n/Michaelis-Menten/line/quadratic/lag-phase/monomolecular) en el programa SIMFIT de la Universidad de Salamanca. Luego se calculó una sigmoide de tres parámetros usando una regresión no lineal.

$$\text{respuesta} = \frac{V_{\max} \times \text{Dosis}^n + C}{K^n + \text{Dosis}^n}$$

$V_{\max}$ : es la respuesta máxima obtenida.

$K_m$ : dosis a la cual se obtiene un 50% de actividad relativa.

N: coeficiente de Hill.

C: constante.

## Resultados y Discusión

En el Gráfico 1 se observa que la levadura modificada ha respondido frente a la presencia de un compuesto estrogénico como el 17 β-estradiol al que fue expuesta, expresando actividad de la β-galactosidasa. Asimismo, se puede observar que la respuesta de la actividad relativa de la β-galactosidasa frente a logaritmo de diferentes concentraciones de 17 β-estradiol (desde 1.75 ng/l a 7.5 µg/l) es de tipo sigmoide.

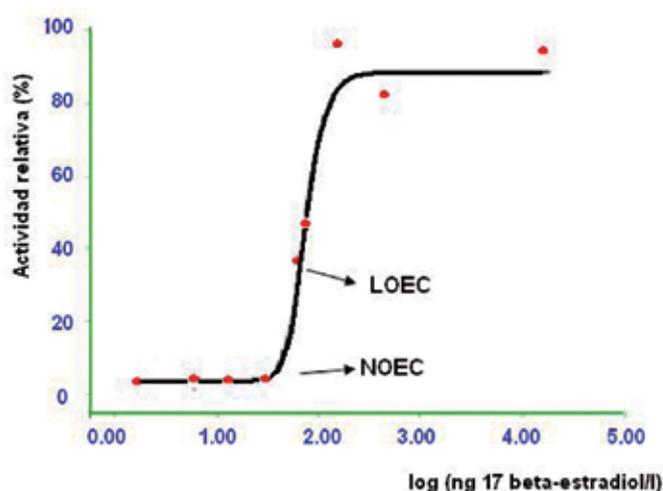


Gráfico 1. Actividad relativa de la β-galactosidasa obtenida luego de la exposición de las levaduras modificadas a diferentes concentraciones de 17 β-estradiol.

Para estos datos de actividad relativa se realizó un ajuste según la función de Hill y se obtuvieron los valores de parámetros de la ecuación que se observan en la Tabla 1. Se puede apreciar que la respuesta máxima obtenida está entre 59 y 99% de actividad. A partir del valor de  $K_m$  calculado ( $1.851 \pm 0.087$ ) se puede calcular el EC50, concentración de 17 β-estradiol con la cual se produce una actividad estrogénica igual al 50% del máximo obtenido. El EC50 en nuestro caso se calcula como la potencia en base 10 del valor de  $K_m$  y es de  $70,8 \pm 13$  ng/l. Este último valor de EC50 calculado concuerda con los obtenidos por Gaido en 1997 ( $65,9 \pm 8$  ng/l) y por Routledge en 1996 ( $55,3 \pm 18$  ng/l).

Parámetro	Valor
$V_{\max}$	$79,07 \pm 20$
$K_m$	$1,851 \pm 0,087$
C	3,880
n	19,87
$r^2 = 0,976$	

Tabla 1. Valores de los parámetros obtenidos para la función de Hill calculada luego del ajuste de datos con el programa SIMFIT.

El coeficiente de correlación aceptable, según publicaciones anteriores, es  $r^2 > 0.95$  (Nelson, 2007) y el obtenido en nuestro ensayo fue de 0.976, el cual se encuentra dentro de valores admisibles.

Se determinaron también los valores NOEC (mayor concentración ensayada sin efecto observable) y LOEC (menor concentración ensayada con efecto observable) (EPS1/RM/46): 30 y 59 ng/l, respectivamente. Si son comparados con los obtenidos por Gaido (1997) y Routledge (1996): 8 ng/l (NOEC) y 27 ng/l (LOEC),

los valores de este estudio son mayores. Para determinarlos más precisamente, resta realizar mayor número de ensayos con nuevos puntos entre ambas concentraciones.

El límite de detección (LD) se determinó a partir de la realización de 10 blancos, con el agregado de 5 µl de etanol absoluto al cultivo de levadura. Se calculó como la concentración correspondiente de 17 β-estradiol para la actividad relativa promedio obtenida más tres desvíos estándares; el resultado obtenido fue de 55 ng/l (21,9% de actividad relativa). Coincide este valor con el EC20 para este ensayo, valor arbitrario utilizado como límite de detección por Lorenzen (2004).

Muestras	Actividad relativa promedio (%)	Resultado (ng/l)
Zona de mezcla de efluente cloacal con agua natural	21	No detectable
Efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario	21	No detectable
LD: 55 pg/l		

Tabla 2. Resultados de estrogenicidad para muestras ensayadas.

En la Tabla 2 se puede apreciar que las muestras ensayadas no presentaban actividad estrógena por encima del límite de detección del método. Para el ensayo de cada muestra se realizó una toma de 1 litro y luego de su filtración se concentró hasta un volumen final de 1 ml, por lo que el límite de detección considerado para compuestos estrogénicos en la muestra fue de 55 pg/l. Ambas muestras arrojaron actividades estrogénicas menores al límite de detección.

El ensayo YES ha sido utilizado como un screening para sustancias estrogénicas, pero debemos considerar que sus resultados se podrían ver indirectamente afectados por antiestrógenos, los cuales suprimen la actividad de la β-galactosidasa, dando como resultado falsos negativos en la muestra a ensayar (Buckley, 2010; Conroy, 2005). Para verificar ausencia de antiestrógenos en las muestras se debería realizar agregados de concentraciones conocidas de 17 β-estradiol y verificar su recuperación (Buckley, 2010).

## Conclusiones

Se logró con éxito poner a punto el método de YES para determinar potencial de estrogenicidad en muestras ambientales. Además, fueron determinados algunos parámetros que describen el desempeño analítico del método, obteniendo para ellos valores aceptables.

Por último, es posible concluir que la actividad estrogénica en las muestras provenientes de zona de mezcla de un efluente cloacal con agua natural y un efluente industrial de producción de pulpa de celulosa con tratamiento secundario fue no detectable para el método de screening utilizado.

## Reconocimientos

María Victoria Carrara, por el apoyo en el filtrado y tratamiento de muestras. Personal de los departamentos de Aguas y Productos Químicos, Medio Ambiente y Microbiología de LATU. Dr. Kevin Gaido (CIIT Centers for Health Research, Research Triangle Park, NC, USA), por proporcionar la cepa de levadura modificada y a la Universidad de Cranfield por el mantenimiento de la cepa.

## Referencias

- ARGEMI, F.; CIANNI, N.; PORTA, A. Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. En: *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2005, 39(3):291-300.
- ARNOLD, S.; COLLINS, B.; ROBINSON, M.; GUILLETTE, L.; MCLACHLAN J. Differential interaction of natural and synthetic estrogens with extracellular binding proteins in a yeast estrogen screen. En: *Steroids*. 1996, 61(11):642-646.
- BIALES, A.; BENCIC, D.; FLICK, R.; LAZORCHAK, J.; LATTIER, D. Quantification and associated variability of induced vitellogenin gene transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*) by quantitative real-time polymerase chain reaction assay. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007, 26(2):287-296.
- BUCKLEY, J. Quantifying the antiestrogen activity of wastewater treatment plant effluent using the yeast estrogen screen. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010, 29:73-78.
- CONROY, O.; QUANRUD, D.; ELA, W.; WICKE, D.; LANSEY, K. Y ARNOLD, R. Fate of wastewater hER-agonists and h-ER antagonists during soil aquifer treatment. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005, 39:2287-2293.
- DE BOEVER, P.; PIETERS, G.; SICILIANO, S.; D'HOOGHE, W.; VERSTRAET, W. Optimization of a yeast estrogen screen and its applicability to study the release of estrogenic isoflavones from a soygerm powder. En: *Environmental Health Perspectives*. 2001, 109(7):691-697.
- CANADA. ENVIRONMENT CANADA. *Guidance document on statistical methods for environmental toxicity test*. Ottawa: Environment Canada, 2007. (Environmental Protection Series; 1/RM/46)
- GAIDO, K.; LEONEL, L.; LOVELL, S.; GOULD, J.; BABAI, D.; PORTIER, C.; MCDONNELL, D. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. En: *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997, 143(1):205-212.
- JOBLING, S.; COEY, S.; WHITMORE, J. G.; KIME, D. E.; VAN LOOK, K.J.W.; MCALLISTER, B.G.; BERESFORD, N.; HENSHAW, A.C.; BRIGHTY, G.; TYLER, C.R.; SUMPTER, J. P. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. En: *Biology of Reproduction*. 2002, 67(2):515-524.
- KRISTENSEN, T.; BAATRUP, E.; BAYLEY, M. 17β Ethinylestradiol reduces the competitive reproductive fitness of the male guppy (*Poecilia reticulata*). En: *Biology of Reproduction*. 2005, 72(1):150-156.
- LANGE, R.; HUTCHINSON, T.; CROUDACE, C.; SIEGMUND, F.; SCHWEINFURTH, H.; HAMPE, P.; PANTER, G.; SUMPTER, J. Effects of the synthetic estrogen 17 α ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001, 20(6):2001-2012.
- LORENZEN, A.; HENDEL, J.; CONN, K.; BITTMAN, S.; KWABIAH, A.; LAZAROVITZ, G.; MASSÉ, D.; MCALLISTER, T.; TOPP, E. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures. En: *Environmental Toxicology*. 2004, (19):216-225.
- NELSON, James. *Screening of endocrine disrupting compounds using estrogen receptor transcriptional activation in vitro bioassay*. Burnaby: Symon Fraser University, 2007. (Thesis of Master Science)
- OLEA SERRANO, N.; ZULUAGA, A. Exposición infantil a disruptores endocrinos. En: *An Esp Pediatr*. 2001, 54(1):58-62.
- PARROTT, J.L.; BLUNT, B.R. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. En: *Environmental Toxicology*. 2005, 20(2):131-141.
- PAWLOWSKI, S.; TERNES, T.; BONERZ, M.; RASTALL, A.; ERDINGER, L.; BRAUNBECK, T. Estrogenicity of solid phase-

- extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. En: *Toxicology in Vitro*. 2004, 18(1):129-138.
- ROUTLEDGE, J.; SUMPTER, J. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. En: *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996, 15(3):241-248.
  - THERMO FISHER SCIENTIFIC. Yeast  $\beta$  galactosidase microplate assay protocol (non-stopped). En: THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Yeast  $\beta$  galactosidase assay kit instructions*. Rockford: Pierce Biotechnology, 2010. (N° 75768)
  - UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. *Paquete estadístico Simfit*. [En línea]. Salamanca: Universidad de Salamanca, [s.d]. [Consulta junio 2010]. Disponible en: <http://simfit.usal.es/>
  - WOLFAND, J.; MARYLAND, B. Active ingredient in oral contraceptives (17 $\alpha$ -ethinylestradiol) alters male competitive courtship behaviors and secondary sexual characteristics in fathead minnows (*Pimephales promelas*). En: *Journal of the U.S. SJWP*. 2007.
-

# Sensibilidad a antibióticos, actividad antibacteriana frente a patógenos y fermentaciones ácido lácticas de una cepa nativa de *Lactobacillus paracasei* de origen humano

Vázquez, S. <sup>(1,2)</sup>, Lopretti, M. <sup>(1,2)</sup>, Rey, F. <sup>(1)</sup>, Zunino P. <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Biotecnología y Bioprocesos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(3)</sup> Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

Contacto: frey@latu.org.uy

Recibido: 02/03/2010 - Aprobado: 28/10/2010

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue caracterizar una cepa nativa de *Lactobacillus paracasei* aislada en el Departamento de Bioprocesos y Biotecnología del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Se realizaron fermentaciones ácido lácticas (FAL) en leche, a los efectos de determinar las características de crecimiento de la cepa. Se evaluaron tres cinéticas en las FAL: los ácidos orgánicos determinados por titulación en leche, la acidificación del medio a lo largo de las fermentaciones por medidas directas de pH sobre el medio y la biomasa producida en 10 ml de cultivo.

Asimismo, se evaluó la actividad antimicrobiana frente a un patógeno gastrointestinal como *Salmonella* sp. por análisis de discos impregnados con diferentes concentraciones del probiótico. También se determinó la sensibilidad a dicloxacilina y penicilina por medio de un antibiograma modificado.

La cepa exhibió buen crecimiento en leche, con curvas de crecimiento típicas de bacterias lácticas. Se detectaron los halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella* sp. dependiendo de la concentración bacteriana. Fueron obtenidas las curvas de inhibición del crecimiento bacteriano en función de las concentraciones de antibiótico.

En conclusión, esta cepa de *Lactobacillus paracasei* aislada de materia fecal humana es un prometedor candidato a ser usado en la preparación de productos probióticos.

Palabras clave: Probióticos, actividad antimicrobiana, antibióticos, cinética.

## Abstract

The objective of this study was the characterization of a native *Lactobacillus paracasei* strain isolated at the Bioprocesses and Biotechnology Department of the Technological Laboratory of Uruguay (LATU). Lactic acid fermentations were made in order to determinate the strain growth's characteristics. We evaluated three kinetics: the organic acids by titration in milk, acidification of the medium throughout the fermentation by pH measurement and biomass produced in 10 ml of culture medium.

The anti-microbial activity against *Salmonella* sp. a gastrointestinal pathogen, was tested by means of a disk diffusion test. Sensitivity to penicillin and dicloxacillin was assayed through a modified antibiogram.

The strain showed good growth in milk, with growth curves characteristic of lactic bacteria. Halos of growth inhibition of *Salmonella* sp. were detected depending on the bacterial concentration. Curves were obtained for inhibition of bacterial growth as a function of concentrations of antibiotic.

In conclusion, this strain of *Lactobacillus paracasei* isolated from human faeces is a promising candidate to be used in the formulation of probiotic products.

Keywords: Probiotic, antimicrobial activity, antibiotics, cinetic.

## Introducción

Los probióticos, microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico en la salud del huésped (FAO, WHO, 2001), han sido incorporados en tabletas, cápsulas y derivados lácteos como las leches fermentadas, leches acidófilas dulces, yogur y, más recientemente, queso (Saito, 2004; Taranto et al., 2005). Por este motivo las cepas probióticas seleccionadas para ser utilizadas en la industria láctea deben ser capaces de crecer y vivir en leche, así como proporcionar características sensoriales aceptables.

El consumo de productos probióticos favorece la capacidad de restablecer la flora intestinal tras episodios de diarrea en niños, y de interferir con patógenos, por mecanismos de competencia de la

adhesión o por la producción de sustancias antibacterianas (Senok et al., 2005; Ballabriga, 2001; Reid, 1999). Es por esta razón que uno de los criterios de selección de probióticos es la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos gastrointestinales como *Salmonella* sp., *Shigella* sp. y *Escherichia coli* (Annuk et al., 2003; Saarela et al., 2005; Calderon, et al., 2007).

En trabajos anteriores los autores reportaron el aislamiento y la caracterización fenotípica de una cepa nativa de *Lactobacillus* sp. con propiedades que permiten clasificarla como una posible cepa probiótica (Vázquez et al., 2007). El objetivo de este trabajo fue continuar la caracterización de dicha cepa realizando fermentaciones ácido lácticas (FAL) en leche a los efectos de determinar las características de su crecimiento. Asimismo, se evaluó la actividad antimicrobiana frente a un patógeno gastrointestinal como *Salmonella* sp. y se determinó la sensibilidad a dicloxacilina y penicilina.

## Materiales y Métodos

### Cepas bacterianas

La cepa denominada HA-9 nativa de origen humano fue identificada como *Lactobacillus paracasei* por ensayos moleculares. La misma se encuentra disponible en el Banco de Cepas del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

La cepa de *Salmonella* sp. pertenece al banco de cepas del LATU y es de origen alimenticio.

### Fermentaciones Ácido Lácticas

Se realizaron fermentaciones en leche a los efectos de determinar las condiciones de crecimiento de la cepa. Para el desarrollo del inóculo se realizó un cultivo *overnight* de la cepa, transfiriendo tres o cuatro colonias de un cultivo fresco en medio MRS-agar a un tubo con 10 ml de leche libre de semisólidos reconstituida al 10% y previamente tratada térmicamente (100 °C, 30 minutos, sin presión). El cultivo se incubó a 37 °C durante 16 horas en jarra de anaerobiosis y luego se centrifugó a 3.500 g por 30 minutos y se resuspendió en suero fisiológico, ajustando la concentración inicial por absorbancia a 560 nm en  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc). Luego se transfirieron volúmenes de inóculo a matraces que contenían 500 ml de leche descremada tratada térmicamente, de modo que la concentración inicial fuera de 1% v/v.

Al inicio del ensayo (tiempo cero) se tomaron cuatro muestras de la siguiente forma: 7 ml para determinar acidificación por peachímetro (744 pH Meter Metrohm), 10 ml para determinar acidificación por titulación con NaOH 0.1 N (producción de ácidos orgánicos), 0,1 ml para determinar ufc/ml por recuento en placa de MRS y 10 ml para determinar la biomasa producida. Los matraces se colocaron en estufa a 37 °C sin agitación y el crecimiento se evaluó por 29 horas, realizando tomas a diferentes tiempos. Como control se procedió de forma análoga con un matraz sin inocular. La titulación se llevó a cabo según norma ISO 6091:1980 con soda 0.1 N, con fenolftaleína como indicador. Para determinar la biomasa se centrifugó cada toma a 3.500 rpm durante 30 minutos (Hettich Zentrifugen D-7200). Los sobrenadantes se descartaron y los tubos se colocaron en estufa a 40 °C hasta peso constante (aproximadamente ocho días), que se determinó por pesada directa en balanza analítica (Mettler Toledo AG204).

### Sensibilidad a antibióticos

A los efectos de determinar el comportamiento de HA92 frente a diferentes antibióticos, se realizó un ensayo empleando discos de papel de filtro impregnados con diferentes concentraciones de penicilina y dicloxacilina (Bauer et al., 1966).

Brevemente, HA92 se cultivó en 10 ml de caldo MRS en jarra de anaerobiosis a 37 °C por 18-24 hs. Posteriormente se esparcieron 200 µl del cultivo en la superficie de las placas de MRS agar sobre las cuales se colocaron discos de papel de filtro estériles impregnados con 20 µl de diferentes concentraciones de dicloxacilina (SIGMA concentraciones entre 0,15-2,5 µg/ml) y penicilina (SIGMA 10MU concentraciones entre 0,09-1,32 µg/ml). Las placas fueron incubadas por 24 horas en condiciones anaerobias a 37 °C. Se determinaron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de los discos, los cuales se graficaron en función de la concentración del antibiótico. Como control se utilizaron discos sin impregnar. Fueron conducidos tres ensayos independientes por triplicado.

### Actividad antibacteriana frente a patógenos

Para evaluar la capacidad de la cepa HA92 de inhibir el crecimiento de un patógeno gastrointestinal como *Salmonella* sp., se realizó un ensayo de discos sobre agar con modificaciones (Jacobsen et al., 1999;

Fraga et al., 2005).

En resumen, 20 µl de un cultivo fresco de HA92 (concentraciones entre  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  ufc/ml) fueron inoculados sobre discos de papel de filtro previamente esterilizados y colocados sobre una placa de agar MRS. La placa fue incubada por 24 horas en jarra de anaerobiosis y luego cubierta con 10 ml de agar (1,5%) inoculado con un cultivo fresco de *Salmonella* sp. ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) e incubada a 37 °C en condiciones aerobias. Los posibles efectos inhibitorios del MRS fueron testeados en cada placa. La capacidad de inhibición del crecimiento fue determinada por medidas de la zona de inhibición que rodea el disco. Se condujeron tres ensayos por triplicado.

## Resultados y Discusión

### Fermentaciones Ácido Lácticas

De las curvas de producción de ácidos orgánicos y variación del pH (productos del metabolismo primario) se puede inferir que la bacteria mostró una fase lag de aproximadamente cuatro horas (Gráfico 1). La producción de ácidos orgánicos correspondió con la acidez producida en el medio, el pH inicial fue de 6,65, y llegó a 5,83 a las 25 horas. El pH óptimo de *L. paracasei* es de 5,4 - 5,8, por lo que la bacteria nunca se encontró bajo condiciones óptimas de pH. El desarrollo de la acidez no necesariamente se debe a los ácidos orgánicos producto del metabolismo de la lactosa, sino que también puede provenir de otros productos de fermentación.

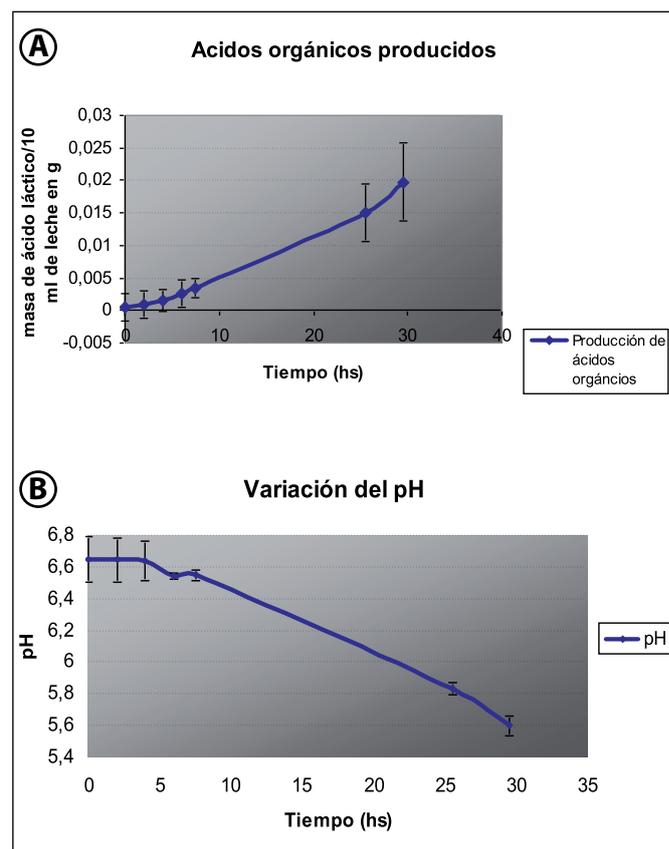


Gráfico 1. a) Producción de ácidos orgánicos en leche determinados por titulación del medio de crecimiento. b) Variación del pH en 29 horas de fermentación.

La curva de biomasa en función del tiempo (Gráfico 2) presenta una fase lag de alrededor de cuatro horas de duración, que se corresponde con los ácidos orgánicos generados en el medio de crecimiento. La fermentación comenzó con una concentración bacteriana de aproximadamente  $10^6$  ufc/ml, y al cabo de 29 horas, ya en fase estacionaria desde la hora 8, el recuento se ubica en el orden de  $10^7$  unidades.

En futuros ensayos se modularán las condiciones de concentración inicial y de incubación con el fin de alcanzar la concentración de células bacterianas necesarias para obtener un producto con propiedades de probiótico.

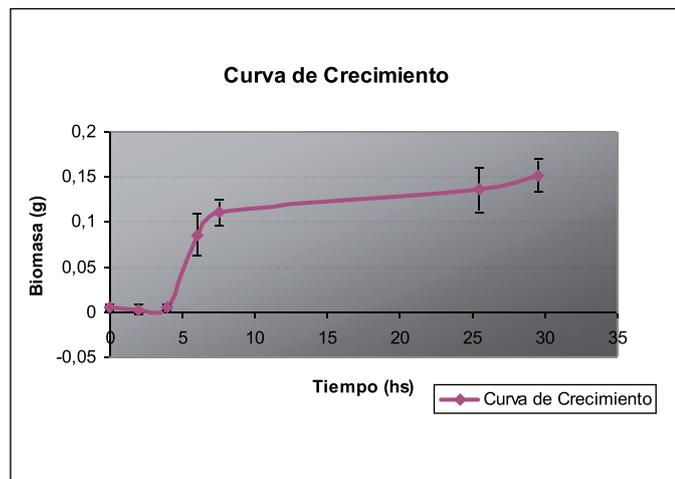


Gráfico 2. Curva de crecimiento en leche determinada por la biomasa (expresada en g) producida en 10 ml de cultivo durante 29 horas.



### Sensibilidad a penicilina y dicloxacilina

De la lectura de las curvas de sensibilidad de la cepa a la penicilina (SIGMA 10MU) se puede afirmar que en las condiciones del ensayo la concentración mínima de inhibición se encuentra en el entorno de los 0,062 µg/ml (Gráfico 3, Figura 1). En el caso de la dicloxacilina (SIGMA), la concentración mínima de inhibición es menor a 0,1562 µg/ml. Los discos utilizados como control no presentaron zonas de inhibición, por lo que los halos de inhibición del crecimiento se debieron exclusivamente a la acción de las diferentes concentraciones de antibiótico utilizadas en el ensayo.

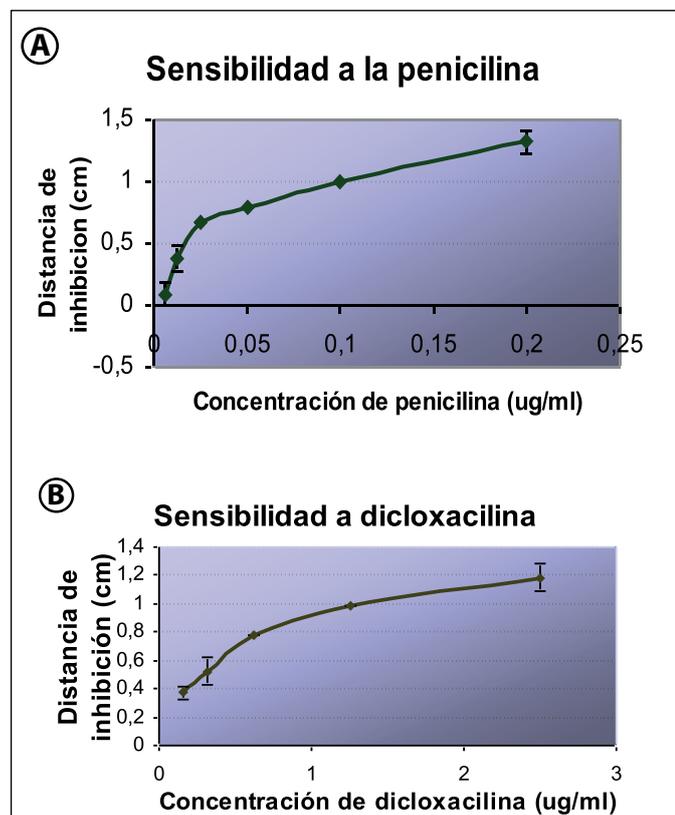


Gráfico 3. a) Curvas de sensibilidad a penicilina y b) dicloxacilina de la cepa expresada en función de la distancia de inhibición a diferentes concentraciones de antibiótico.



Figura 1. Ensayo de discos para penicilina (arriba) y dicloxacilina (abajo).

### Actividad antibacteriana frente a patógenos

De los resultados de la capacidad de la cepa en estudio de presentar actividad antibacteriana frente a un patógeno gastrointestinal por medio de la inhibición de su crecimiento (Gráfico 4), se observa que a concentraciones del *Lactobacillus* inferiores a  $1 \times 10^6$  no se evidencia inhibición del crecimiento de esta cepa de *Salmonella* sp. (concentración  $1 \times 10^8$  ufc/ml). A concentraciones superiores se produce un halo de inhibición de entre 19 y 21 mm. En las zonas de la placa lejanas al crecimiento del *Lactobacillus* no se observó inhibición del crecimiento.

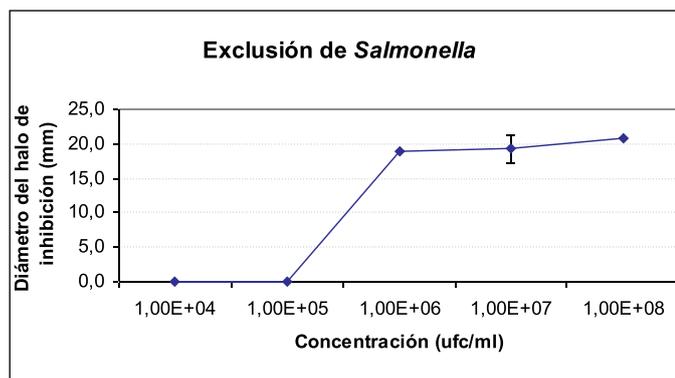


Gráfico 4. Diámetros de inhibición del crecimiento de *Salmonella* (mm) vs las diferentes concentraciones de la cepa HA9-2 utilizadas.

## Conclusiones

La cepa exhibió buen crecimiento en leche. Por las características del crecimiento, puede concluirse que sería posible obtener la biomasa necesaria para su empleo como probiótico.

La presencia de halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella* sp. hace pensar que HA9-2 produce alguna sustancia difusible con actividad antibacteriana. Los discos utilizados como control no presentaron zonas de inhibición, por lo que los halos de inhibición del crecimiento se deben exclusivamente a la acción de dicha sustancia. El hecho de que no se presenten zonas de inhibición en regiones de la placa lejanas al crecimiento del *Lactobacillus* permite inferir que la inhibición del crecimiento no se produjo por ningún efecto del MRS.

También fueron obtenidas las curvas de inhibición del crecimiento bacteriano en función de las concentraciones de dos antibióticos. La posible sensibilidad frente a los antibióticos testeados aparecería como ventajosa en caso de administración en humanos, ya que una cepa con distintas resistencias podría representar un potencial peligro para la salud del consumidor.

En conclusión, esta cepa de *Lactobacillus paracasei* aislada de materia fecal humana es un prometedor candidato para ser utilizado en la preparación de productos probióticos.

## Referencias

- ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Caracterización de intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. En: *Journal of Applied Microbiology*. 2003, (94):403-412.
- BALLABRIGA, A. *Nutrición en la infancia y adolescencia*. Madrid: Ergon, 2001. pp. 625-662
- BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. En: *Am. J. Clin. Pathol* 2006, 45(4):493-496.
- CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogur natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteridis*. En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2007, 57(1):1-6.
- FAO; WHO. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba: FAO, 2001.
- FRAGA, M.; SCAVONE, P.; ZUNINO, P. Preventive and therapeutical administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in

a mouse model. En: *Antonie van Leeuwenhoek*. 2005, 88(1):25-34.

- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 86: *Dried milk, Determination of titratable acidity reference method*. Brussels: IDF, 1981.
- JACOBSEN, C.N.; ROSENFELDT, N.V.; HAYFORD, A.E.; MOLLER, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PAERREGAARD, A.; SANDSTROM, B.; TVEDE, M.; JACOBSEN, M. Screening of probiotics activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. En: *Applied Environ. Microbiology* 1999, 65(11):4949-4956.
- REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. En: *Applied Environ. Microbiology*. 1999, 65(9):3763-3766.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTILA-SHANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J. Probiotic bacteria: safety, functional and technological proprieties. En: *Journal of Biotechnology*. 2000, 84(3):197-215.
- SAITO, T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. En: *Animal Science Journal*. 2004, 75(1):1-13.
- SENOK, A. C.; ISMAEEL, A. Y.; BOTTA, G. A. Probiotics: facts and myths. En: *Clin. Microbiol. Infect.* 2005, 11(12):958-996.
- TARANTO, M.P.; MÉDICI, M.; FONT DE VALDEZ, G. Alimentos funcionales probióticos. En: *Química Viva*. 2005, 4(1):26-34.
- VÁZQUEZ, S.; LOPRETTI, M.; REY, F.; ZUNINO, P. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. En: *INNOTEC*. 2007, (2):12-14.

# **Bioinfo\_eXtrema: un enfoque bioinformático para integrar información ambiental, bioquímica y genómica, enfocado en bioprospección y selección de consorcios de microorganismos con aplicaciones en biorremediación**

Capdevielle, F. <sup>(1)</sup>, Ottati, C. <sup>(2)</sup>, Lopretti, M. <sup>(2,3)</sup>

<sup>(1)</sup> Unidad de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA - <sup>(2)</sup> Departamento de Bioprocesos y Biotecnología. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(3)</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología. CIN, Facultad de Ciencias. Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: fcapdevielle@inia.org.uy

Recibido: 28/06/2010 - Aprobado: 21/09/2010

## **Resumen**

La identificación de componentes funcionales clave para diversos bioprocesos de interés industrial ha permitido seleccionar aislamientos adaptados a condiciones ambientales extremas en tres especies de hongos del género *Penicillium*. Dichos aislamientos fueron evaluados *in vitro* para caracterizar su potencial como componentes de un consorcio microbiano aplicable en biorremediación de efluentes industriales que contienen residuos lignocelulósicos.

Los resultados de la anotación de secuencias genómicas disponibles para una de las especies identificadas apuntan a la existencia de genes con alta similaridad respecto a los existentes en diversos hongos considerados como referencia en materia de degradación de lignina en ambientes naturales. Las anotaciones funcionales propuestas a partir de secuencias accesibles –identificadas a través de la base de datos Fungal Oxidative Lignin Enzymes– podrían contrastarse con los resultados experimentales para cepas creciendo en diferentes medios con lignina, representando ambientes industriales extremos. Mediante este trabajo se propone el ensamblado de Bioinfo\_eXtrema como parte de un enfoque bioinformático centrado en la selección de consorcios de extremófilos para aplicaciones en biotecnología industrial, combinando diversas técnicas de minería de datos –integradas a través del Waikato Environment for Knowledge Analysis– para facilitar la integración de información molecular disponible e indicadores funcionales relevantes para aplicaciones en biorremediación.

Palabras clave: Extremozimas, lignina, minería de datos, *Penicillium*.

## **Abstract**

The ability to identify microbe extremophiles with metabolic capabilities suited for specific bioprocesses opens the doors of extreme environments for development of new industrial products. Identification of key functional components from existing biodiversity supported selection of candidate isolates from three *Penicillium* fungal species. These candidates were evaluated *in vitro* to further characterize their potential as components of a microbial consortium for biorremediation of industrial effluents containing lignocellulosic residues. Results from annotation of available genomic sequences for one of these *Penicillium* species pointed to the existence of putative genes highly similar to those functionally identified in reference fungi for degradation of lignin in natural environments. Proposed functional annotations from available sequences were identified through a specialized database –Fungal Oxidative Lignin Enzymes (FOLy)– and could be contrasted straightforward with experimental results for strains growing in different media containing lignin, representing extreme industry-related environments. We propose the assembly of Bioinfo\_eXtreme as an industrial-biotechnology-centered bioinformatics approach for consortia selection, combining diverse data mining techniques –components of the Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA)–, to facilitate integration of available molecular information and relevant phenotypic indicators for biorremediation applications.

Keywords: Extremozymes, lignin, data mining, *Penicillium*.

## **Introducción**

Por medio del mejoramiento en las técnicas de cultivo y/o detección de microorganismos se ha podido verificar que diversos ambientes con características “extremas” –caracterizados por condiciones restrictivas para el desarrollo de organismos vivos (alta o baja temperatura, acidez, salinidad, presión, etcétera)– presentan una importante biodiversidad de microorganismos “extremófilos” adaptados a dichas condiciones. La bioprospección de este tipo de microorganismos ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años en ambientes distribuidos en todo el mundo, considerando las aplicaciones alcanzadas en

diferentes industrias (diagnósticos, bioprocesos, entre otras) y servicios ambientales (remediación de ambientes contaminados), así como el potencial de uso industrial de las enzimas producidas por estos organismos (denominadas extremozimas).

El proyecto en el que se inscribe este trabajo apunta a establecer una plataforma biotecnológica como estrategia para impulsar el desarrollo productivo de microorganismos con características adaptativas “extremas” (tolerancia a factores físicos y/o químicos) con potencial para el desarrollo sustentable de nuevos productos y/o servicios biotecnológicos con alto valor industrial. A partir de muestras ambientales tamizadas a través de columnas que contienen “licor negro” –un residuo de la industria celulósica con alto contenido de

compuestos fenólicos— en condiciones de acidez (pH 4,5), se aislaron cepas de tres especies del género *Penicillium* (*Penicillium citrinum* Thom., *Penicillium variable* Sopp., y *Penicillium chrysogenum* Thom.) adaptadas a condiciones que representan posibles ambientes “extremos” vinculados con el tratamiento de residuos lignocelulósicos industriales.

En este trabajo se discute la importancia de incorporar enfoques bioinformáticos como soporte para el diseño de experimentos relevantes en el desarrollo de prototipos para nuevos productos biotecnológicos. El propósito es contribuir a la identificación de cepas de microorganismos extremófilos que contienen información genética para enzimas de interés biotecnológico industrial (extremozimas) con apoyo de procedimientos bioinformáticos. De esta manera se busca facilitar el acceso a información molecular y su integración, mediante técnicas de minería de datos, respecto a diversas categorías de descriptores fenotípicos y capacidades metabólicas estimadas en forma experimental.

## Materiales y Métodos

Las cepas de *Penicillium* estudiadas (Figura 1) pueden crecer y desarrollarse en medios de cultivo con niveles elevados de compuestos fenólicos; ha sido evaluada su capacidad metabólica para modificar diferentes ligninas—organosolv, kraft y sulfonadas— y decolorar medios que contienen “licor negro”. Las enzimas potencialmente involucradas en la degradación de lignina fueron identificadas por medio del análisis comparativo de sus secuencias proteicas e integradas en una base de datos denominada Fungal Oxidative Lignin enzymes (FOLy), enfocada en la provisión de herramientas para la anotación funcional de los genomas de diversas especies de hongos que resultan de interés (Levasseur et al., 2008) como modelos de capacidades metabólicas aplicables en procesos de biorremediación.

Se utilizó el sistema WEKA (Waikato Environment for Knowledge Analysis, Witten y Frank, 2005) como soporte para la evaluación de diversas técnicas de minería de datos aplicables en la identificación de patrones diferenciales entre las secuencias de ADN correspondientes a diversas categorías funcionales definidas en FOLy. La utilización de información proveniente de secuencias anotadas con alto grado de confianza mediante integración de criterios estructurales y funcionales—accesibles en bases de datos *ad hoc* gestionadas por expertos del dominio funcional correspondiente— permitiría definir conjuntos de entrenamiento que faciliten la revisión continua de anotaciones realizadas en las primeras etapas de diferentes programas de investigación genómica. En nuestro análisis se consideraron dos categorías de enzimas con potencial ligninolítico definidas en FOLy a partir de referencias caracterizadas funcionalmente—con información bioquímica disponible—; una de ellas comprende enzimas con actividad oxidasa directa sobre lignina (Lignin Oxidasas: LOs) y otra agrupa enzimas con actividad oxidasa que actúan como auxiliares del proceso de degradación de lignina (Lignin Degrading Auxiliary enzymes: LDAs).

Asimismo, se utilizaron técnicas de minería de datos aplicadas a textos para integrar información funcional reportada en la bibliografía (National Center for Biotechnology Information) como apoyo en la identificación de posibles enzimas ligninolíticas en *Penicillium*. Las posibles asociaciones conceptuales entre identificadores taxonómicos y capacidades metabólicas fueron exploradas mediante dos herramientas del sistema PathText (Kemper et al. 2010): FACTA y KLEIO. FACTA (Tsuruoka et al. 2008) es un sistema de recuperación de información que permite reconocer asociaciones implícitas entre términos co-ocurrentes en una colección de artículos, mientras que KLEIO (Nobata et al. 2008) provee un rango de funciones para búsquedas semánticas y genera índices de conceptos para facilitar su identificación aun en casos donde existen diferencias apreciables en cuanto al uso de variantes ortográficas y acrónimos para los términos considerados.

Como referencia comparativa para los modelos utilizados en la anotación de genes para enzimas ligninolíticas se utilizó el genoma de

*Phanerochaete chrysosporium* (Martínez et al., 2004). La versión utilizada (2.0) integra la información genómica de esta especie (aproximadamente 35 millones de pares de bases) en más de 610.000 fragmentos ensamblados mediante el sistema “JAZZ assembler” (Joint Genome Institute), con 10.048 modelos de genes (BestModels v2.1) hipotéticos anotados.

A partir de 2008 se encuentra disponible en el National Center for Biotechnology Information una versión del genoma de la cepa Wisconsin 54-1255 de *P. chrysogenum* (32,2 millones de pares de bases secuenciadas) donde se han anotado los modelos génicos correspondientes a más de 12.000 secuencias codificantes para proteínas. Estos modelos fueron utilizados como base para evaluar combinaciones de procedimientos de minería de datos para contrastar las anotaciones accesibles vía FOLy para *P. chrysogenum*.

Los procedimientos de minería de datos utilizados incluyeron búsquedas por palabras clave extraídas de la anotación de secuencias genómicas de esta especie que presentaban niveles significativos de similitud (estimados mediante tBLASTn) con enzimas ligninolíticas de *P. chrysosporium*. Las proteínas hipotéticas de *P. chrysogenum* correspondientes a los modelos génicos identificados en FOLy, así como aquellas correspondientes a los modelos génicos identificados en forma *ad hoc* mediante uso de palabras clave fueron analizadas con un algoritmo de tipo “text mining” accesible vía web (<http://adios.tau.ac.il/DME/>), que permite identificar regiones de la secuencia con valor predictivo respecto a su posible funcionalidad enzimática (Weingart, Lavi y Horn, 2009).

## Resultados

Los resultados experimentales obtenidos en el marco de este proyecto (Lopretti et al. 2010) indican que las tres cepas de *Penicillium* consideradas (Figura 1) pueden expresar capacidades metabólicas ligninolíticas en condiciones ambientales extremas (alta acidez y concentración de compuestos polifenólicos), reduciendo significativamente la pigmentación de los medios analizados y produciendo modificaciones de los compuestos fenólicos modelo y diversos compuestos metoxilados ensayados.

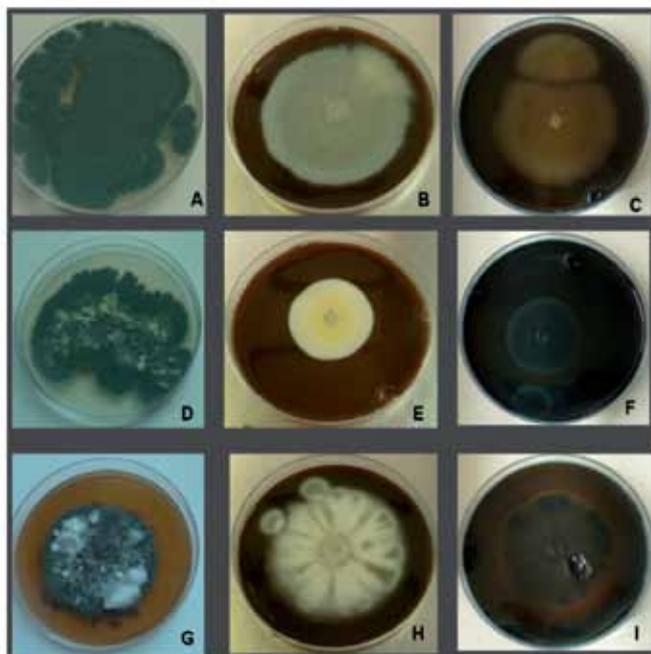


Figura 1. Crecimiento de cepas de *Penicillium* en diferentes medios: PDA (A, D, G); 100 mm glucosa + 2g/l NNaO<sub>3</sub> + 0,5% licor negro (B, E, H); 1% FeCl<sub>3</sub> + 1% K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. Las fotografías corresponden a *P. chrysogenum* (A, B, C), *P. variable* (D, E, F) y *P. citrinum* (G, H, I).

El análisis de la degradación de lignina marcada con un radiotrazador permitió determinar que la cepa de *P. chrysogenum* es capaz de metabolizar dicho polímero, incrementando las fracciones solubles 10 veces en una semana; en este caso, las fracciones derivadas de la lignina podrían ser consideradas como una fuente de carbono complementaria.

Los estudios en placa y a partir de los extractos enzimáticos producidos por estas cepas evidenciaron actividades consistentes con enzimas de tipo lacasa y peroxidasa, lo que sumado a la observación de las modificaciones realizadas por estos microorganismos en medios con lignina apoya su selección como posibles componentes de un consorcio microbiano aplicable en procesos de biorremediación.

La base de datos FOLy utilizada como referencia en este trabajo se enfoca exclusivamente en enzimas con potencial ligninolítico para las que se dispone de referencias con anotaciones validadas experimentalmente, lo que facilitó su uso como "training set" para avanzar hacia predicciones más precisas del rol funcional de nuevas secuencias candidatas que se identifiquen para este tipo de enzimas. El continuo incremento en el número de genomas secuenciados, con la consiguiente ampliación del número de categorías y subcategorías definidas por FOLy, permitiría aplicar un enfoque de minería de datos tanto para revisar los criterios de agrupamiento utilizados en la organización de las categorías (LO y LDA) como para evaluar la distribución de secuencias candidatas en las categorías definidas.

Dentro de la familia LO se reconocen tres tipos de actividades metabólicas conocidas: LO1 (lacasas), LO2 (incluye lignina-peroxidasa-LiP, manganeso-peroxidasa-MnP, cloroperoxidasas-CPO y otras peroxidosas versátiles que combinan propiedades catalíticas de LiP y MnP), y LO3 (celobiosa-deshidrogenasa). Por otra parte, la familia FDA agrupa un mayor número de actividades enzimáticas con un rol auxiliar en procesos ligninolíticos y que frecuentemente están asociadas con la producción de peróxido de hidrógeno: LDA1 (aril-alcohol-oxidasa), LDA2 (vanillil-alcohol-oxidasa), LDA3 (glioxal-oxidasa), LDA4 (piranosa-oxidasa), LDA5 (galactosa-oxidasa), LDA6 (glucosa-oxidasa) y LDA7 (benzoquinona-reductasa). Una tercera categoría (EST) incluiría las enzimas con actividad esterasa que actúan como auxiliares del proceso de degradación de lignina, cinamoil-esterasa y glucoronil-esterasa.

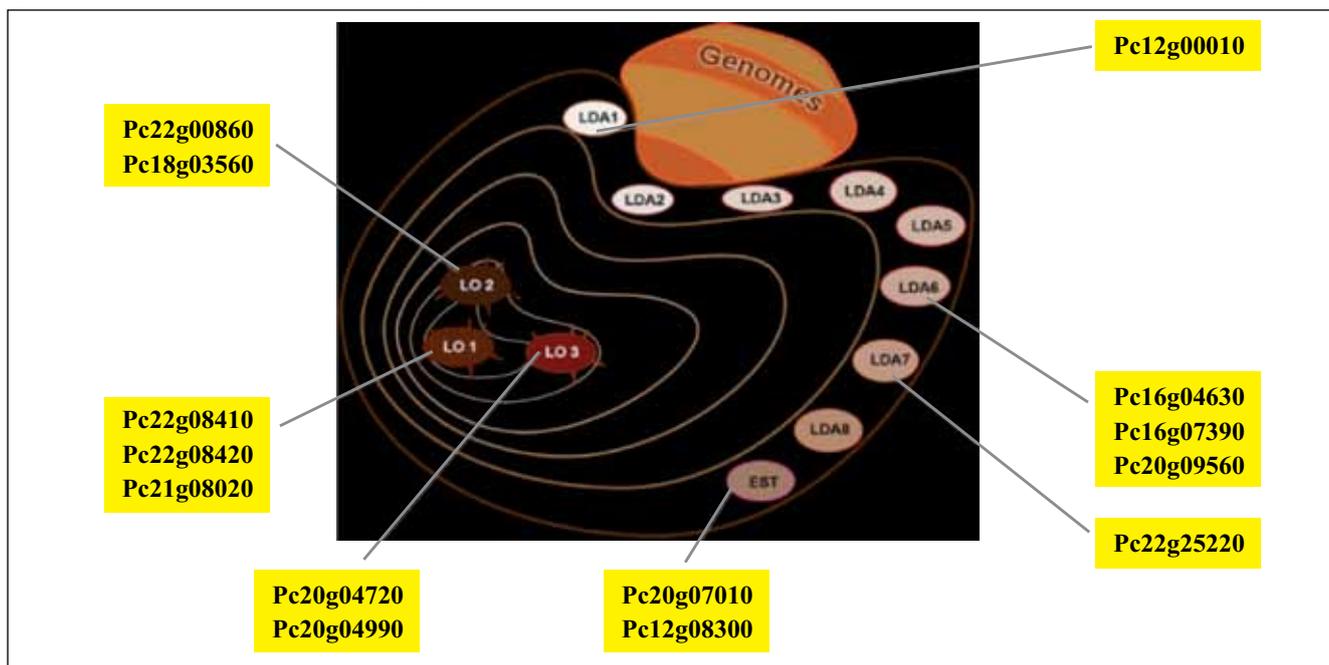


Figura 2. FOLy: distribución de modelos genéticos anotados para *P. chrysogenum*.

A partir de la información disponible en FOLy se clasificaron tres secuencias de *P. chrysogenum* dentro de la categoría LO1, dos secuencias dentro de la categoría LO2, dos secuencias dentro de la categoría LO3, una secuencia dentro de la categoría LDA1, tres secuencias dentro de la categoría LDA6, una secuencia dentro de la categoría LDA7, y dos secuencias dentro de la categoría EST (Figura 2).

Estas secuencias fueron analizadas posteriormente con un sistema de minería de datos (DME, Figura 3) para reconocimiento de péptidos específicos asociados con diversas clases de enzimas: se identificó en forma positiva dos proteínas hipotéticas categorizadas dentro de LO1 (Pc21g08020 y Pc22g08410) como enzimas con posible actividad como lacasas, y dos proteínas hipotéticas categorizadas dentro de LO2 (Pc18g03560 y Pc22g00860) como enzimas con posible actividad como peroxidosas.

Active, Metal and Binding Site Annotations based on Training Swissprot Dataset

Specific Peptide	EC	Function	Location of SP in Protein	Act Site
HPFHLHG	1.10.3.2	Laccase	417	-
RFVADNPG	1.10.3	With oxygen as acceptor.	481	-
ADNPGVW	1.10.3	With oxygen as acceptor.	484	-

```

MAIYHGILVRLTALLLWVYQAKTVNLDLNFVTWVWVNFQGLHRRVVGINGQWPLFVIEVDKGDRLIVNMGVNGLDGKETSIRHMGFQNGTDMGQPSM
VTQCVPVFGASITXHTIPQNGTYWYCHTDSYFDGGRQALIVHDDQAYFRMXYDEHLTVMSDWHDLIEDIFFIRTKNFTGALFVDSFLNDFLET
NIPVEAGHTYIAGLIGNIGAFVAGYFYIEDHTFRIVEIDGVYVDEQADTLVIAVAGRYSSILVDSGSDKSNYPVTVVADSLLDVISPQLQMGVWLEY
NSMAAFQAAKVEVSSDLVFDGMKLVPHDRGELLTEPMTIKVDVIMDLNMGAGYAFFMNI SYTRPKVPTLYSVLTSGDYATHAQYTGERTMFPVLG
HEAVVEVILMLDGGSHPFHLHGHNFLVIRTPSYGSPFQFADGDVFPFNATENPSSFFKTPAKRDITVAFPQGNFVIRFVADNPGVWLFICHIDWEM
SQGLANSFKRAPEQIQEQLSLTESDINICEAGNRSYEGMAASTDLDLDTGQKQLPWLFAGTARGIVMVTSCVSAFLGMAFIAYVIGISGIQSKET
AVVTERGL
    
```

Figura 3. DME: identificación de péptidos específicos para enzimas con actividad lacasa (EC 1.10.3.2) en la secuencia Pc21g08020.

Utilizando como referencia palabras clave extraídas de la comparación –vía tBLASTn– entre secuencias de *P. chrysosporium* y *P. chrysogenum* se identificaron 13 proteínas hipotéticas anotadas para esta última especie como “multicopper oxidase”, que podrían corresponder a enzimas con actividad como lacasas. Aplicando el procedimiento de “text mining” –instrumentado por Weingart, Lavi y Horn (2009) siguiendo el método propuesto por Kunik et al. (2007)– se reconocieron péptidos específicos (Figura 3) en las secuencias de cinco de estas proteínas hipotéticas, apoyando su identificación como posibles enzimas con actividad de tipo lacasa (EC 1.10.3.2.).

En forma comparativa es posible indicar que dos de las tres secuencias anotadas por FOLy dentro de la categoría LO1 también fueron identificadas como lacasas mediante los procedimientos de minería de datos aplicados, apoyados tanto en el reconocimiento de similitudes con secuencias de lacasas anotadas en otros hongos ligninolíticos como de péptidos específicos asociados con diferentes clases de enzimas (“EC numbers”).

## Discusión

### Bioinfo\_eXtrema I: selección de microorganismos para un consorcio aplicable en biorremediación de efluentes con alto contenido lignocelulósico.

Desde el punto de vista de los antecedentes en materia de degradación de lignina y compuestos fenólicos similares en condiciones “extremas”, Leitao (2009) revisó recientemente el potencial del género *Penicillium* para diversas aplicaciones en biorremediación, resaltando la importancia de incorporar procedimientos para caracterización funcional (a nivel bioquímico y molecular) que contribuyan a seleccionar cepas de alto potencial biotecnológico a partir de las etapas más tempranas de prospección y tamizado por adaptación a ambientes extremos. Los resultados experimentales sobre degradación de lignina obtenidos para las cepas de *Penicillium* adaptadas a condiciones ambientales extremas (acidez y presencia de contaminantes fenólicos) consideradas en este trabajo, así como la consistencia entre diversos métodos que respaldan la anotación de genes candidatos para enzimas ligninolíticas en *P. chrysogenum*, apuntan a la existencia de capacidades metabólicas valiosas para la selección de componentes de un consorcio fúngico aplicable en procesos de biorremediación.

### Bioinfo\_eXtrema II: integración de procedimientos para minería de datos en la interfase bioprospección / genómica / biotecnología.

Los resultados obtenidos en nuestro caso sugieren la conveniencia de utilizar un enfoque bioinformático apoyado por técnicas de minería de datos –en particular “text mining”– para integrar información sobre genes candidatos –establecida en las etapas realizadas o en proceso de anotación genómica para cada especie– que pueda contrastarse directamente con la determinación de actividades para enzimas específicas (lignin peroxidasas, manganeso peroxidasas y oxidasas en general) producidas por las cepas que mostraron crecimiento en los diferentes medios con lignina. Las actividades enzimáticas de tipo lacasa y peroxidasa que fueron determinadas experimentalmente para las tres cepas de *Penicillium* pueden ser interpretadas –con herramientas bioinformáticas y procedimientos de minería de datos– en términos de la posible base genómica existente en este género para metabolizar y utilizar compuestos lignocelulósicos.

La selección de microorganismos aplicables en procesos de biorremediación requiere generar, integrar y analizar múltiples fuentes de información para identificar combinaciones de capacidades metabólicas que resulten adecuadas para implementar diferentes tipos de bioprocesos conducentes a reducir y mitigar posibles daños ambientales asociados con actividades productivas. Dada la necesidad

de difundir los procedimientos evaluados y coordinar capacidades instrumentales y humanas para seleccionar cepas integrables en consorcios de biorremediación, se propone el desarrollo de un enfoque bioinformático –*Bioinfo\_eXtrema*– como base de una plataforma biotecnológica interinstitucional articulada con la industria de base biotecnológica. El propósito es facilitar la integración de información fenotípica, genómica y de bioprocesos industriales para identificar funciones metabólicas y dominios estructurales aplicables en anotación funcional de microorganismos procedentes de ambientes naturales e industriales extremos, con aplicaciones potenciales en biorremediación.

## Conclusiones

La selección de aislamientos de hongos candidatos para aplicaciones en biorremediación a partir de la biodiversidad existente en ambientes naturales e industriales extremos puede ser facilitada mediante la anotación genómica de componentes funcionales clave para diversos bioprocesos de interés productivo. Por medio de este trabajo se propone continuar avanzando en el ensamblado de una plataforma genómica-bioinformática-biotecnológica enfocada en el desarrollo productivo de microorganismos extremófilos con aplicaciones en biorremediación y biotecnología industrial. Esta iniciativa apunta a impulsar el diseño de nuevas aplicaciones biotecnológicas y bionegocios innovadores basados en la integración de múltiples fuentes de información (ambiental, genómica, bioquímica, industrial, etcétera), enfocadas en bioprocesos industriales de alto valor económico a nivel internacional, así como sostenibles en términos ambientales y de su contribución a un desarrollo productivo y social intensivo en conocimientos.

## Referencias

- NATIONAL CENTRE FOR TEXT MINING; THE UNIVERSITY OF MANCHESTER. SCHOOL OF COMPUTER SCIENCE. *FACTA* + [En línea]. Versión 0.7. s.l.: National Centre for Text Mining School of Computer Science; The University of Manchester, 2009. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: [http://refine1-nactem.mc.man.ac.uk/facta\\_events/](http://refine1-nactem.mc.man.ac.uk/facta_events/)
- KEMPER, Brian; MATSUZAKI, Takuya; MATSUOKA, Yukiko; TSURUOKA, Yoshimasa; KITANO, Hiroaki; ANANIADOU, Sophia; TSUJII, Jun'ichi. PathText: a text mining integrator for biological pathway visualizations. En: *Bioinformatics*. 2010, 26(12):374-381.
- KUNIK Vered; MEROZ, Yasmine; SOLAN, Zach; SANDBANK, Ben; WEINGART, Uri; RUPPIN, Eytan; HORN, David. Functional representation of enzymes by specific peptides. En: *PLOS Comp Biol*. 2007, 3(8):1623-1632
- INRI; UNIVERSITES DE PROVENCE ET DE LA MEDITERRANEE; UMR. *FOLy Fungal Oxidative Lignin enzymes* [En línea]. Marseille: INRI; Universites de Provence et de la Mediterranee; UMR, 2010. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: <http://folly.esil.univ-mrs.fr/>
- LEITAO, Ana Lucia. Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. En: *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2009, 6(4):1393-1417
- LEVASSEUR, Anthony; PIUMI, Francois; COUTIÑO, Pedro M.; RANCUREL, Corinne; ASTHER, Michèle; DELATTRE, Michel; HENRISSAT, Bernard; PONTAROTTI, Pierre; ASTHER, Marcel; RECORD, Eric. FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds. En: *Fungal Genetics and Biology*. 2008, 45(5):638-645.
- LOPRETTI, Mary; OTTATI, Carolina; CAPDEVIELLE, Fabián; DAMBORIARENA, Agustín; SIBAJA, María. *Penicillium's* consortium: potential modifier of polyphenols for management and industrial use. En: EUROPEAN COMMISSION. *18th European Biomass Conference and Exhibition* (Lyon 3-7 de mayo de 2010). Lyon: European Commission, 2010.
- MARTINEZ, Diego; LARRONDO, Luis; PUTMAN, Nik; GELPKE, Maarten D.S.; HUANG, Katherine; CHAPMAN, Jarrod;

- HELFENBEIN, Kevin G.; RAMAIYA, Preethi; DETTER, J. Chris; LARIMER, Frank; COUTINHO, PEDRO M.; HENRISSAT, Bernard; BERKA, Randy; CULLEN, Dan; ROKHSAR, Daniel. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. En: *Nature Biotechnology*. 2004, (22):1-6.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Genomes & maps* [En línea]. Bethesda: NCBI, s.d. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genomes-maps/>
  - NOBATA, Chikashi; COTTER, Philip; OKAZAKI, Naoaki; REA, Brian; SASAKI, Yutaka; TSURUOKA, Yoshimasa; ANANIADOU, Sophia. Kleio: a knowledge-enriched information retrieval system for biology. En: MYAENG, S.H. et al. *Proceedings of the 31st Annual International ACM SIGIR Conference on Research and Development in Information Retrieval*. Singapore: ACM, 2008. pp. 787-788.
  - TSURUOKA, Yoshimasa; TSUJII, Jun'ichi; ANANIADOU, Sophia. FACTA: a text search engine for finding associated biomedical concepts. En: *Bioinformatics*. 2008, 24(21):2259-2260.
  - THE NATIONAL CENTRE FOR TEXT MINING. *KLEIO* [En línea]. Manchester: The National Centre for Text Mining, s.d. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: <http://www.nactem.ac.uk/software/kleio/>
  - WEINGART, Uri; LAVI, Yair; HORN, David. Data mining of enzymes using specific peptides. En: *BMC Bioinformatics*. 2009, (10):446-456.
  - WEINGART, Uri; LAVI, Yair; HORN, David. *Data mining of enzymes. Peptide search* [En línea]. s.l.: Uri Weingar, s.d. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: <http://adios.tau.ac.il/DME/>
  - UNIVERSITY OF CALIFORNIA. *Phanerochaete chrysosporium* [En línea]. Versión 2.0. California: University of California, s.d. [Consulta 27 de junio de 2010]. Disponible en: <http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>
  - WITTEN, Ian H.; FRANK, Eibe. *Data mining: practical machine learning tools and techniques*. San Francisco: Morgan-Kaufmann, 2005.
-

# Ensayos físico-químicos para el estudio de la degradación de bolsas de supermercado

Remersaro, J. <sup>(1)</sup>, Medina, D. <sup>(1)</sup>, Hernández, M. <sup>(1)</sup>, Latrónica, L. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Plásticos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: llatroni@latu.org.uy

Recibido: 30/06/2010 - Aprobado: 05/10/2010

## Resumen

Este trabajo describe y analiza la variación de algunas propiedades físicas y químicas que las bolsas de supermercado (polietileno) experimentan durante su degradación. Se estudian estas propiedades para las “bolsas camiseta” que contienen y para las que no contienen aditivos para acelerar su degradación. Las muestras se colocan en un equipo de simulación de radiación solar con temperatura y humedad controladas en equipo Weather-o-meter.

Durante la exposición a las diferentes condiciones ambientales se extrajeron muestras con una frecuencia de 50 horas y se realizaron ensayos de tracción, elongación, desgarro y de espectroscopía infrarroja (FTIR). Los valores indican que las bolsas que contienen aditivo oxi-biodegradable muestran pérdidas apreciables de sus propiedades físicas y químicas en la mitad del tiempo que aquellas que no contienen el aditivo.

Palabras clave: Bolsas, degradación de polietileno.

## Abstract

This paper describes and analyzes the changes that grocery bags (polyethylene) have experienced in some physical and chemical properties during their degradation. The study was made for “t-shirt bags” which contain and does not contain additives to accelerate its degradation. The samples are placed in a radiation solar simulator with controlled temperature and humidity (Weather-o-meter).

During exposure samples were extracted every 50 hours and tensile, elongation, tear and infrared spectroscopy (FTIR) assays were carried out. The values indicate that the bags containing oxy-biodegradable additive show appreciable loss of their physical and chemical properties in half the time than those not containing the additive.

Keywords: Bags, degradation of polyethylene

## Introducción

Hoy en día las bolsas camiseta son de uso masivo. El uso responsable es un desafío, dado que estas bolsas son difíciles de reciclar. Una solución a este problema es la utilización de aditivos bio-oxo degradables.

De acuerdo al artículo de Caroline Williams (2004): “Un millón de bolsas plásticas son consumidas por minuto en el mundo, y más de 500 billones anualmente. Los plásticos y particularmente las bolsas representan el residuo más polucionante de las ciudades y campos, perjudica la vida animal y estropea drenajes naturales y urbanos”.

La utilización de aditivos en la fabricación de materiales plásticos que posibiliten y aceleren la degradación del plástico es últimamente un punto clave en la fabricación de estos materiales, sobre todo en aquellos elementos que serán destinados a embalajes de uso doméstico. Existen ya en varios países leyes y/o proyectos de ley que obligan al uso de estos nuevos materiales que contienen aditivos para acelerar su degradación y tienden a mejorar la problemática de los residuos sólidos (Ariosti, s.d.; Grupo Parlamentario del Bloque Popular. Congreso de la República del Perú, s.d.). En este sentido, los organismos de contralor ambiental e industrias plásticas vinculadas con las bolsas de polietileno intentan establecer los requisitos mínimos de calidad que deben tener estas bolsas. Este trabajo pretende contribuir a este objetivo mediante el análisis de la variación de algunas propiedades fisicoquímicas de bolsas de polietileno declaradas como biooxodegradables y que están disponibles en el mercado como tales. De esta forma se irán estableciendo algunos de los requisitos que deberán cumplir las

bolsas de polietileno y que resultarán de un consenso entre todos los organismos y empresas involucradas.

El estudio presenta la evaluación de algunas propiedades fisicoquímicas de dos grupos de bolsas de polietileno que fueron fabricadas en las mismas condiciones, pero que se diferencian en que uno de ellos contiene aditivos que aceleran el proceso de oxidación del polietileno. Es importante mencionar que existen diferentes tipos de materiales degradables, que se diferencian entre sí por el mecanismo que involucra su degradación y por las condiciones en las que este proceso se lleva a cabo. Los grandes grupos son denominados oxo-degradables, foto-degradables, biodegradables (UNE-EN 13432:2001/AC:2005).

Un material plástico considerado degradable puede cumplir con las condiciones definidas en uno o varios de estos grupos.

Se entiende por biodegradables aquellos plásticos que por acción de microorganismos, bacterias, hongos o algas son degradados aerobio o anaeróticamente a compuestos más sencillos que los poliméricos y que en última instancia lo hacen a dióxido de carbono, agua y metano, según el caso. Existe normativa que establece los requisitos cualitativos y cuantitativos para calificar a un plástico como biodegradable y que evalúa además la toxicidad de los productos del proceso, así como el tiempo en el cual se considera que el material ha sido biodegradado (Plastivida, 2007). En este grupo están los biopolímeros obtenidos de productos renovables como el almidón, la celulosa, etcétera; y bioplásticos donde la polimerización ocurre directamente por la acción enzimática de bacterias.

Por naturaleza, los plásticos convencionales utilizados en envasado son fotodegradables y la inclusión de aditivos que aceleren este

proceso provoca prematuramente la disminución del peso molecular del polímero y en los mejores casos dejan productos susceptibles para la biodegradación. En los oxo-degradables la activación de la degradación puede ser luz, tensión mecánica o calor, pero también se recurre a la disminución del peso molecular del polímero.

En este trabajo no se evalúa la biodegradabilidad del material, sino que se estudia la degradabilidad del mismo por la pérdida de algunas de sus propiedades mecánicas y químicas, comparándolo con un material no degradable fabricado en las mismas condiciones. La evaluación de la propiedad de biodegradable puede ser objeto de próximos trabajos orientados a cumplir con objetivos más amplios.

Los métodos utilizados en este trabajo para la evaluación de la pérdida de propiedades físicas son tomados de la normativa utilizada en general para la evaluación de propiedades físicas de films plásticos, ASTM D882-09 y ASTM D1922-09. La elección de estas metodologías es en acuerdo a normas actuales para la identificación de materiales plásticos degradables, precisamente con la norma ASTM D5208-09 que define la forma de monitoreo para la degradabilidad de estos materiales luego de ser expuestos a lámparas capaces de emitir radiación ultravioleta.

### Materiales y Métodos

Dos grupos diferentes de bolsas de polietileno fueron suministradas por un productor del mercado local que las obtiene por termoformado de “pellets” de polietileno. Un grupo de bolsas contiene aditivo para acelerar su degradación y el otro no. La denominación de cada grupo fue: letra **D** para las bolsas degradables y **C** para las “comunes”. Se le realizaron a ambos grupos ensayos físicos típicos para caracterización de films plásticos. El seguimiento y análisis de la degradación se efectuó disponiendo los grupos de bolsas en una cámara donde las condiciones ambientales simulan ser las propias de una exposición solar. Este procedimiento suele denominarse envejecimiento artificial.

Los ensayos físicos realizados sobre las muestras fueron tracción-elongación y desgarro Elmendorf. En ambos casos, la metodología y equipos utilizados estuvieron de acuerdo a las normas ASTM D882-09 y ASTM D1922-09. Un seguimiento en la estructura química durante el envejecimiento se realizó con espectroscopía infrarroja FTIR. Los equipos utilizados para tales ensayos fueron un dinamómetro Shimadzu AG2000-A para las tracciones de los films, un péndulo Lorentzen & Wettre para el desgarro de los mismos y los espectros infrarrojos se obtuvieron en un equipo Shimadzu FTIR-8101.

Estos ensayos se sucedieron cada 50 horas luego de comenzada la exposición de ambos grupos de bolsas a la radiación solar simulada. La radiación es lograda en un equipo Weather-o-meter marca Suga que dispone de una cámara en cuyo centro una lámpara de xenón provoca emisiones de luz de intensidad y longitud de onda similares a las solares. El rango de longitudes de onda y potencia irradiada es brindado por el fabricante y las muestras se disponen en una especie de “tambor giratorio” que rodea la lámpara (Figura 1 y Gráfico 1).

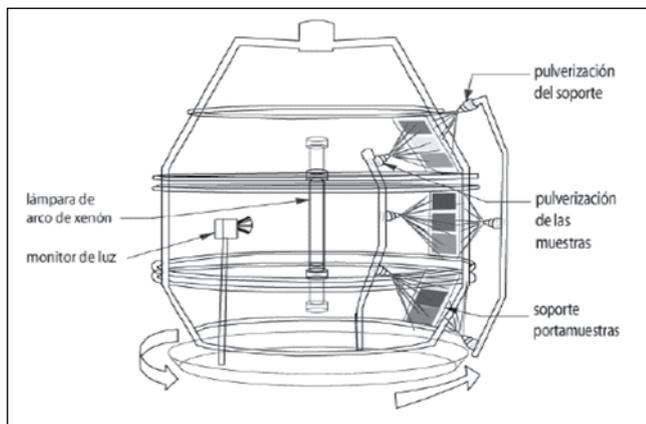


Figura 1. Equipo utilizado para irradiar la muestras.

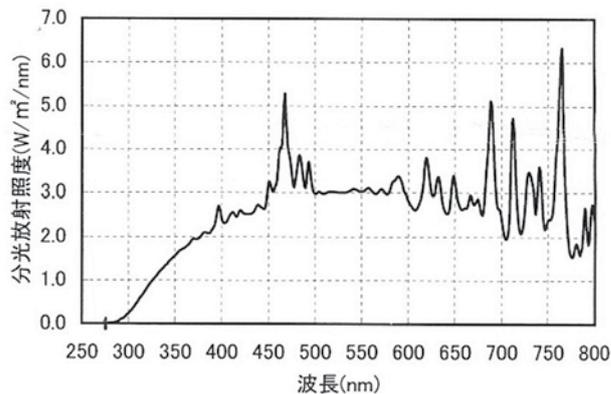


Gráfico 1. Potencia por unidad de superficie en función de la longitud de onda.

### Resultados

Se presentan en las Tablas 1 y 2 los valores correspondientes a la tracción y elongación de los films de polietileno constituyentes de los dos tipos de bolsas ensayadas, C y D, obtenidos de cinco probetas cortadas de las bolsas acondicionadas a 23 °C y 50% de humedad. Estos valores fueron tomados como punto cero del envejecimiento. Se registraron valores de tensión máxima y elongación a la rotura en el sentido de fabricación de la bolsa, dirección de máquina y sentido perpendicular a éste. Los valores aparecen en las Tablas 1 y 2 como sentido transversal y longitudinal.

Bolsas C				
Espesor medio (mm) 0.023				
Probeta	Tracción longitudinal		Tracción transversal	
	Máximo (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)	Máximo (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)
1	3,23	348	2,49	437
2	3,7	360	2,33	398
3	4,19	335	2,62	464
4	4,12	398	2,61	460
5	3,84	327	2,44	469
<b>Promedios</b>	<b>3,816</b>	<b>353,6</b>	<b>2,498</b>	<b>445,6</b>

Tabla 1. Valores de resistencia a la tracción, máximo y elongación a la rotura para bolsas tipo C.

Bolsas D				
Espesor medio (mm) 0.023				
Probeta	Tracción longitudinal		Tracción transversal	
	Máximo (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)	Máximo (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)
1	2,51	322	1,9	428
2	2,82	335	1,45	423
3	2,64	280	1,56	430
4	2,52	258	1,54	347
5	2,58	303	1,5	449
<b>Promedios</b>	<b>2,614</b>	<b>299,6</b>	<b>1,59</b>	<b>415,4</b>

Tabla 2. Valores de resistencia a la tracción, máximo y elongación a la rotura para bolsas tipo D.

De acuerdo a los valores obtenidos para las propiedades mecánicas medidas, son mayores los presentados por las bolsas no degradables o comunes, C, que para las bolsas degradables, D.

En la forma descrita anteriormente fueron determinados los valores para las mismas propiedades con una frecuencia de 50 horas

de envejecimiento hasta llegar a las 200 horas. En la Tabla 3 se expresan estos valores promedio, asignando el número 1 a los obtenidos a las primeras 50 horas, y 2, 3 y 4 para el resto de los puntos de evaluación.

Punto	Horas	Bolsas C				Bolsas D			
		Sentido longitudinal		Sentido transversal		Sentido longitudinal		Sentido transversal	
		Máxima tensión (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)	Máxima tensión (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)	Máxima tensión (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)	Máxima tensión (Kgf/mm <sup>2</sup> )	Elongación (%)
0	0	3,8	354	2,5	446	2,6	354	2,5	446
1	50	2,9	289	1,8	364	2,5	157	1,9	412
2	100	2,5	223	2,2	424	1,7	5	1,3	5
3	150	2,6	226	2,1	441	1,1	3	1,2	4
4	200	2,6	127	1,6	236	0,3	2	0,8	2

Tabla 3. Valores de tracción y elongación máxima para ambos grupos de bolsas cada 50 horas de envejecimiento.

En ambos tipos de bolsas, los máximos presentados inicialmente de tracción y elongación se reducen al ser expuestas a la radiación solar simulada. Las bolsas designadas como degradables lo hacen con mayor velocidad, y a 100 horas de exposición podría afirmarse que han perdido la capacidad de elongación. Los Gráficos 2 y 3 muestran estas disminuciones para el sentido longitudinal de la bolsa, sentido que puede asociarse directamente con la carga que ésta soportaría.

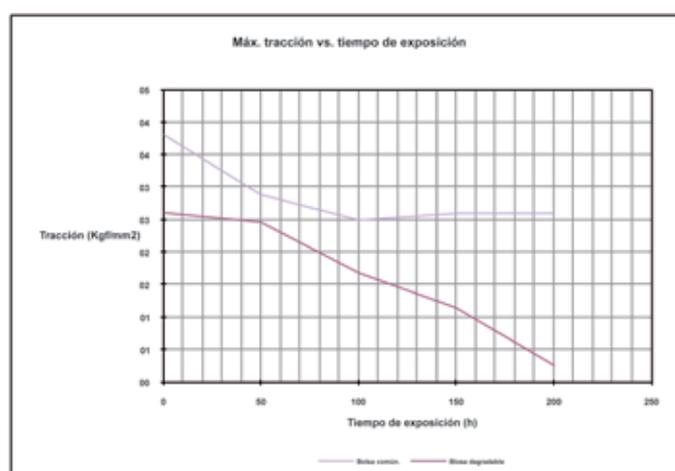


Gráfico 2. Tracción máxima en función de las horas de exposición de las bolsas.

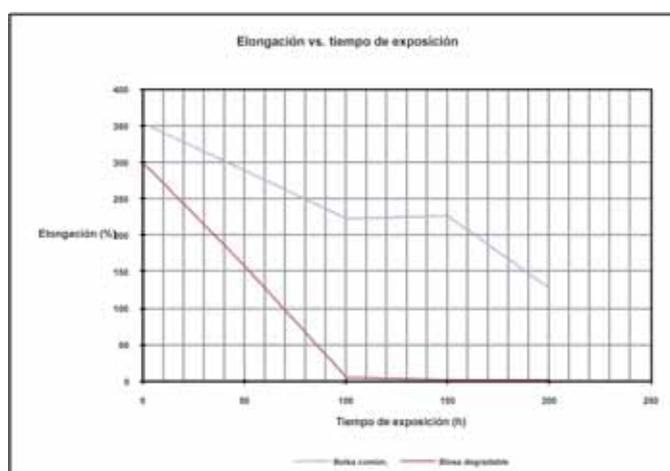


Gráfico 3. Elongación máxima en función de las horas de exposición de las bolsas.

Conjuntamente con la evaluación de las propiedades físicas, se realizaron espectros FTIR cada 50 horas de exposición, con el fin de identificar picos característicos de los productos de oxidación del polietileno. Estos productos son identificados en los espectros infrarrojos por picos que aparecen en valores de número de onda en el entorno de 1750  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros obtenidos para los diferentes puntos del análisis del envejecimiento muestran la formación de productos de oxidación a las 100 horas de exposición. Esto es coincidente con la apreciable pérdida de las propiedades mecánicas al alcanzar estas horas de envejecimiento.

A continuación se presentan los espectros obtenidos para las bolsas antes del envejecimiento y a las 100 horas de comenzado. Es esperable la coincidencia en los espectros para ambos grupos de bolsas que no fueron radiadas; éstos son asignables en ambos casos a espectros de polietileno, debido a la presencia de sus bandas características. Se observa la ausencia de la banda característica del grupo carbonilo en el espectro correspondiente a las 100 horas de las bolsas comunes y la aparición del mismo en las degradables, entre 1740  $\text{cm}^{-1}$  y 1750  $\text{cm}^{-1}$ .

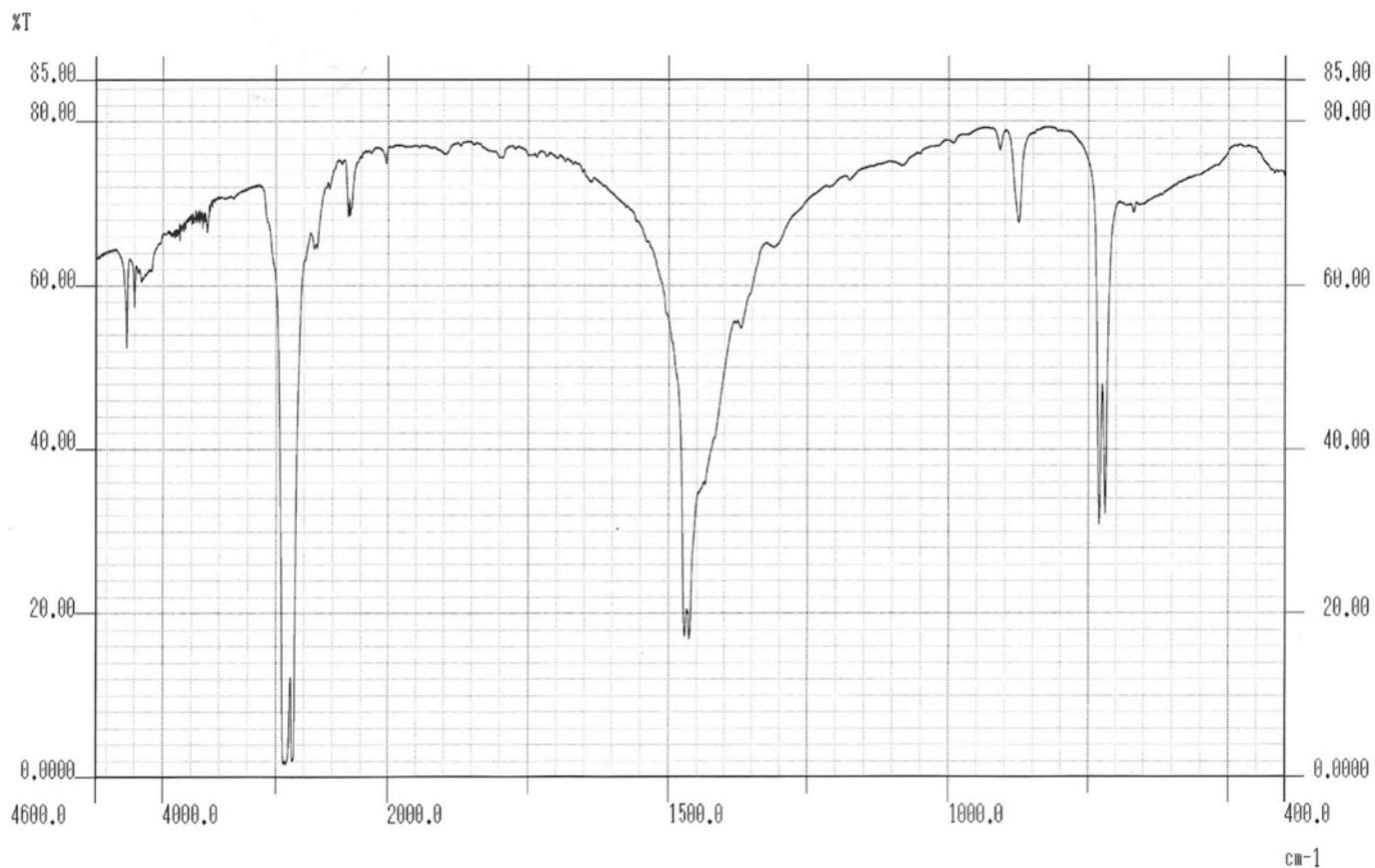


Figura 2. Espectro FTIR de las bolsas de polietileno comunes C.

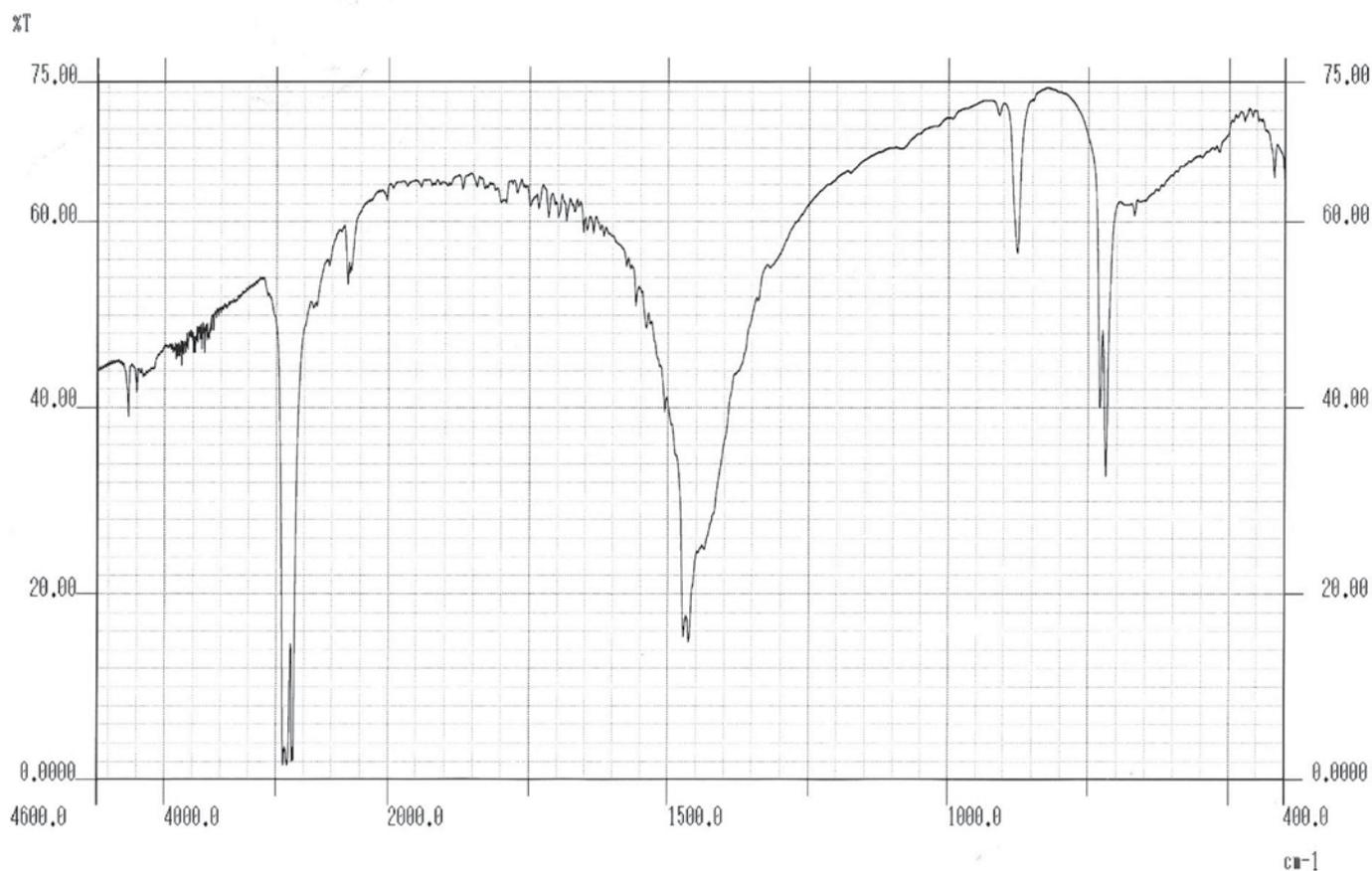


Figura 3. Espectro FTIR de las bolsas de polietileno comunes D.

PLÁSTICOS

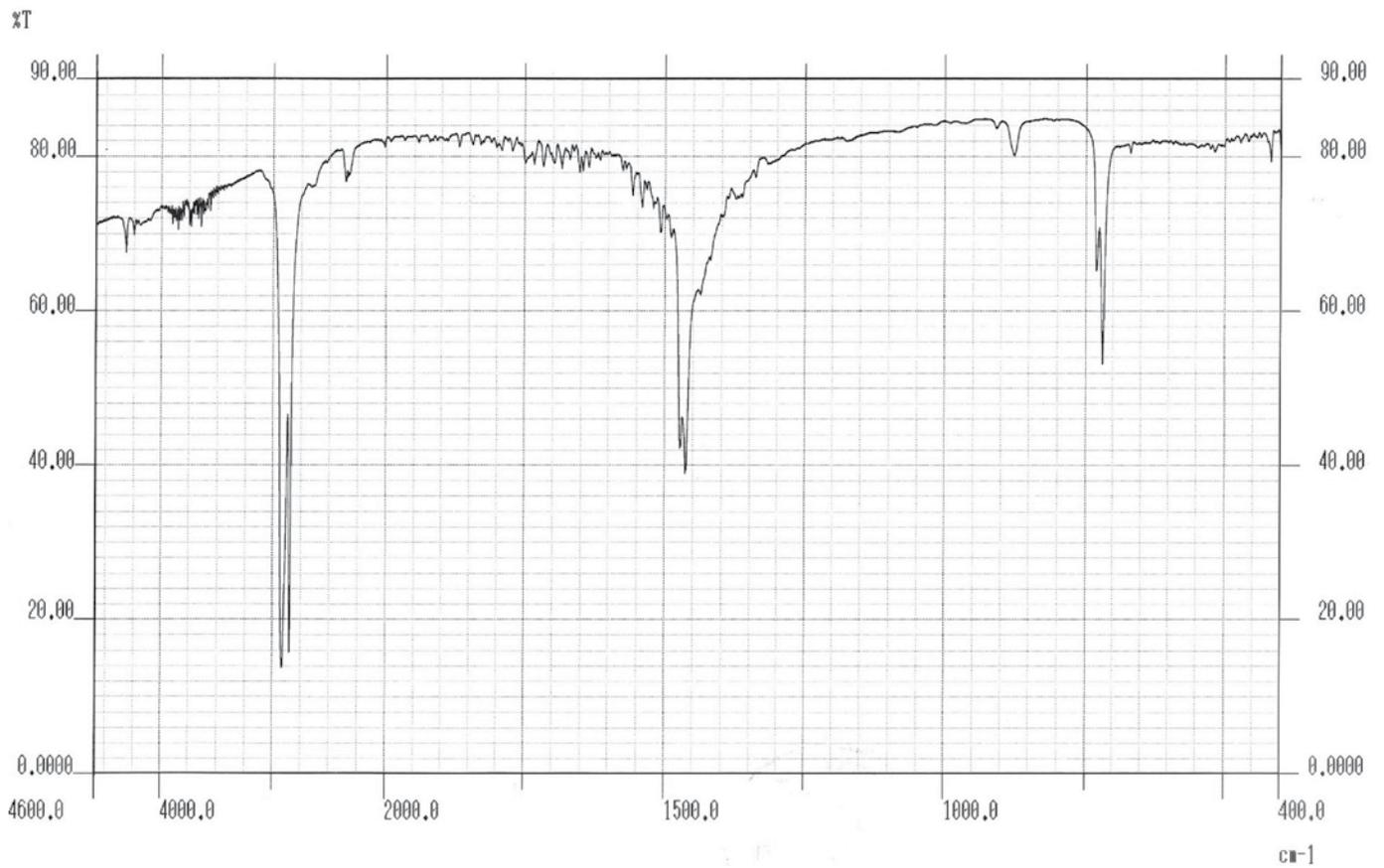


Figura 4. Espectro FTIR de las bolsas de polietileno comunes C con 100 horas de envejecimiento.

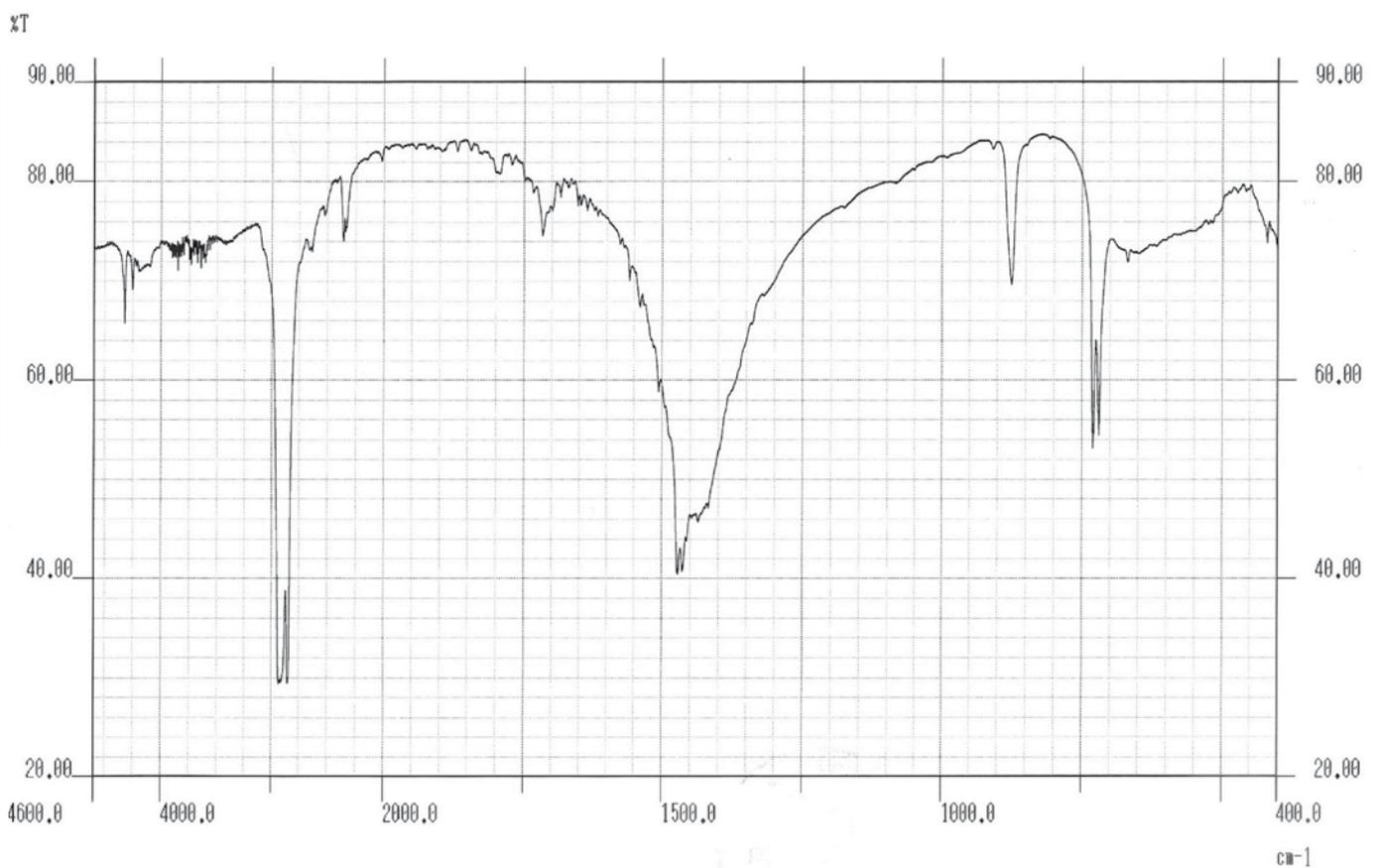


Figura 5. Espectro FTIR de las bolsas de polietileno comunes D con 100 horas de envejecimiento.

Los resultados obtenidos para el desgarro Elmendorf no mostraron una gran variación a las 100 horas de envejecimiento como sí lo hicieron los ensayos desarrollados anteriormente. La Tabla 4 muestra estos resultados. Si bien existe una mayor disminución en los valores obtenidos para las bolsas degradables, no se obtienen grandes diferencias con respecto a los valores correspondientes a los films sin envejecimiento.

Punto	Horas	Bolsas C		Bolsas D	
		Sentido longitudinal	Sentido transversal	Sentido longitudinal	Sentido transversal
		Fuerza (N)	Fuerza (N)	Fuerza (N)	Fuerza (N)
0	0	0,132	1,392	0,172	1,712
1	50	0,124	1,190	0,152	1,316
2	100	0,127	1,288	0,152	1,184

Tabla 4. Valores correspondientes al desgarro Elmendorf para ambos grupos de bolsas ensayadas.

## Conclusiones

Los resultados de los ensayos muestran que el proceso de degradabilidad avanzó a mayor velocidad en las bolsas del grupo **D** que perdieron las propiedades mecánicas a las 100 horas del envejecimiento. En el grupo que no contiene aditivos para acelerar este proceso se encontraron indicios fisicoquímicos del envejecimiento posteriores a las 100 horas. Los ensayos realizados sirven para diferenciar bolsas degradables de aquellas no degradables que fueron fabricadas y envejecidas en las mismas condiciones.

## Referencias

- ARIOSTI, Alejandro; GIMENEZ, Ricardo. *Posición INTI sobre bolsas de plástico* [En línea]. s.l.: s.n., s.d. [Consulta: 01 de setiembre de 2010]. Disponible en: <http://blog.ccoo.es/gallery/17/posicion-inti-sobre-bolsas-de-plastico.pdf>
- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (España). UNE-EN 13432: *Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje*. Madrid: AENOR, 2001.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D882: *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. Conshohocken: ASTM, 2009.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D1922: *Standard test method for propagation tear resistance of plastic film and thin sheeting by pendulum method*. Conshohocken: ASTM, 2009.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D5208: *Standard practice for fluorescent ultraviolet (UV) exposure of photodegradable plastics*. Conshohocken: ASTM, 2009.
- GRUPO PARLAMENTARIO DEL BLOQUE POPULAR. CONGRESO DE LA REPÚBLICA DEL PERÚ. *Proyecto de Ley que prohíbe envases no biodegradables* [En línea]. s.l.: s.n., s.d. [Consulta: 01 de setiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.copecoh.com/UserFiles/File/03828%20-%20Proyecto%20Ley%20Prohibe%20Envases%20No%20Biodegradables.pdf>
- PLASTIVIDA. *Degradación de los materiales plásticos*. [En línea]. Buenos Aires: Centro de información Técnica, 2007. (Boletín Técnico Informativo N° 21). [Consulta abril 2009]. Disponible en: <http://www.plastivida.com.ar/pdf/21.pdf>
- WILLIAMS, Caroline. Battle of the bag. En: *New Scientist*. 2004, (2464).

# Elaboración de bebida energizante a partir de suero de quesería

Cuellas, A. <sup>(1)</sup>, Wagner, J. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: acuellas@unq.edu.ar

Recibido: 20/05/2010 - Aprobado: 15/09/2010

## Resumen

Se estudió la factibilidad para elaborar diferentes productos a partir de suero de queso. Los resultados mostraron que el desarrollo de una bebida energizante representa un proceso simple para obtener productos de alto valor agregado y utiliza todos los componentes del suero lácteo. Experimentalmente, se hidrolizó la lactosa presente al 80% y se formularon bebidas frutales. Éstas fueron evaluadas mediante pruebas sensoriales descriptivas, mostrando mejores características organolépticas para la bebida sabor naranja. Los análisis microbiológicos realizados en la bebida láctea se ajustaron a los valores solicitados por el Código Alimentario Argentino para leches UAT. Se concluye que la elaboración del producto no presenta dificultades tecnológicas, reduce la contaminación ambiental y aprovecha el valor nutricional del efluente.

Palabras clave: Efluente, industria láctea, hidrólisis, lactosa.

## Abstract

The feasibility to elaborate different products from whey of cheese was studied. The results showed that the development of an energy drink represents a simple process to obtain products of high added value and uses all serum components. Experimentally, the lactose was hydrolyzed to 80% and fruit drinks were made. These were evaluated by descriptive sensory tests, showing better organoleptic characteristics for orange-flavored drink. The microbiological analyses carried out in the milk drink were consistent with the values requested by the Argentine Food Code for milk UHT milk. We conclude that the development of the product has not technological difficulties, reduce environmental pollution and takes advantage of the nutritional value of the effluent.

Keywords: Effluent, dairy, hydrolysis, lactose.

## Introducción

La industria quesera produce grandes volúmenes de suero lácteo, único subproducto remanente en el proceso de elaboración. Por cada kg de queso, se producen aproximadamente 9 litros de efluente, desechado casi en su totalidad, incrementando los niveles de contaminación (Cuellas, 2008; Miranda, 2007; González-Martínez et al., 2002). Por otro lado, el suero lácteo posee un alto valor nutritivo, contiene más del 50% de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas (Atra et al., 2005; Smithers, 2008). El poder contaminante del suero lácteo y su atractivo valor nutricional han impulsado investigaciones que permitan su empleo en el desarrollo de ingredientes y productos alimenticios. Sin embargo, el pequeño y mediano productor quesero no dispone de recursos ni de equipos industriales para el tratamiento del efluente (Monsalve y González, 2005).

El lactosuero está constituido principalmente por lactosa, un azúcar relativamente insoluble, de bajo poder edulcorante, que no siempre puede ser absorbida por el sistema digestivo humano. De esta forma la hidrólisis de la lactosa es de vital importancia para el empleo del efluente en la industria alimenticia, ya que produce glucosa y galactosa, una mezcla que presenta mayor solubilidad, mayor poder edulcorante y es de fácil absorción por la mucosa digestiva (Zadow, 1984; Barnes, 1994; Cuellas, 2005).

Las características y composición del efluente permiten diseñar un abanico de opciones para el desarrollo de productos alimenticios. El criterio de selección para la elaboración de algunos de estos productos debe adecuarse a las necesidades y posibilidades de los establecimientos queseros y considerar aspectos fundamentales, como el costo del proceso, el tiempo de producción y la posibilidad de ingresar el producto obtenido en el mercado.

Este trabajo incluye un estudio de factibilidad para la elaboración de distintos productos en base a suero de quesería y una segunda etapa experimental en la que se desarrolla la formulación del producto seleccionado.

## Materiales y Métodos

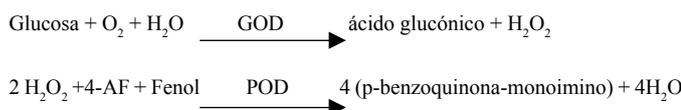
### 1. Estudio de pre-factibilidad para la elaboración de productos a partir del suero

En el estudio de factibilidad se incluye el análisis de aspectos considerados fundamentales para la elaboración de productos alimenticios a partir del suero, como: nivel de aprovechamiento, tiempo y costo de producción, reducción de contaminación y aceptación para distintos productos (Ricotta, Concentrado proteico, quesos tipo Mysost y bebidas).

## 2. Desarrollo del producto

**Obtención de jarabes de lactosa con distintos grados de hidrólisis:** La bebida se formuló en base a suero de queso en polvo sin desmineralizar (Lácteos Vidal S.A), reconstituido al 5% p/v de lactosa, tal como se encuentra naturalmente en el efluente. La hidrólisis enzimática de lactosa se realizó en Batch por acción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa (Lactozym 3000 l Novo Nordisk) a 37 °C, pH 6.8-7 y se frenó con la adición de ácido cítrico, hasta alcanzar pH 4. Dependiendo del tiempo de contacto de la enzima con el suero lácteo, se obtuvieron hidrolizados de lactosa de 20%, 50% y 80%. El grado de hidrólisis se determinó midiendo la concentración de glucosa liberada por dosaje enzimático mediante un kit de glucemia (Wiener Lab.), midiendo la absorbancia a 505 nm y comparando con un estándar.

La reacción calorimétrica sigue el siguiente esquema:



Donde: GOD/POD: Solución de glucosa-oxida (1000 U/ml) y peroxidasa (120 U/ml)

Reactivo 4-AF: Solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l en buffer TRIS 0,92 mol/l.

**Formulación de la bebida:** Luego de determinar que el suero hidrolizado al 80% presenta mejores aptitudes para la elaboración del producto, se formularon bebidas en base a este jarabe, adicionando benzoato de sodio, sacarosa y mezclas aditivas (saborizante y colorante) de naranja (formulación I), pomelo (formulación II) y frutilla (formulación III).

**Evaluación de las características organolépticas a partir de panel sensorial:** La evaluación de la magnitud de los atributos sensoriales (aroma, color, sabor y consistencia) de las bebidas formuladas se realizó mediante pruebas sensoriales descriptivas, empleando una escala estructurada de tres puntos (Débil-Medio-Buena). Para tal fin se entrenó un panel de 20 jueces, conformado por estudiantes y docentes de la Universidad Nacional de Quilmes.

**Análisis microbiológicos:** La bebida formulada se somete a los siguientes controles microbiológicos: Recuento de Coliformes totales a 30 °C - NMP (ICMSF, 2000). Recuento de Coliformes Fecales y *E. Coli*. Recuento de Mesófilos Totales (ICMSF, 1983). Recuento de *S. Aureus* (Met. 975.55 AOAC 1995). Estos controles se realizan al finalizar el proceso de elaboración a escala laboratorio, se almacena el producto a 4-5 °C y se repiten los análisis en los días 15 y 30. Todos los ensayos microbiológicos se realizaron por triplicado.

## Resultados y Discusión

### 1. Estudio de pre-factibilidad para la elaboración de productos a partir del suero de quesería:

De acuerdo a las características de las opciones analizadas (Tabla 1), se ha determinado que el producto que presenta mayores ventajas y mayor oportunidad de aceptación es la bebida en base a suero lácteo. Productos similares como bebidas isotónicas y energizantes responden a la nueva tendencia de consumo de alimentos naturales y funcionales, constituyendo un mercado en expansión. Por otro lado, el proceso de

elaboración de la bebida utiliza de forma integral los recursos, emplea una tecnología sencilla de implementar y reduce casi en su totalidad el impacto ambiental generado por este efluente (Inda Cunningham, 2000).

Producto	Nivel de aprovechamiento	Tiempo y costo de producción	Reducción de contaminación	Aceptabilidad del producto
Ricotta	Medio - bajo	Mediano	Bajo	Mediana
Concentrado proteico	Medio - bajo	Alto	Bajo	Alta
Queso tipo Mysot	Alto	Mediano	Alta	Baja
Bebida Isotónica	Alto	Bajo	Alta	Alta

Tabla 1. Análisis de pre-factibilidad de productos elaborados en base a suero de quesería.

### 2. Desarrollo del producto

**Determinación del grado de hidrólisis:** La elección del jarabe que se utilizó como base en la formulación se relacionó con la cantidad necesaria de sacarosa que se debe adicionar al producto final para conferirle un sabor dulce. Las bebidas formuladas con sueros hidrolizados al 80%, 50% y 20% de conversión de la lactosa tendrán composición constante en todos los ingredientes menos en sacarosa, que requerirá una adición baja, media y alta, respectivamente. Teniendo en cuenta la solubilidad, el poder edulcorante y la digestibilidad de los azúcares, a mayor grado de hidrólisis la bebida presentará ventajas nutricionales y tecnológicas, por contener una mayor proporción de monosacáridos y menor sacarosa y lactosa (lo que favorece la rápida absorción y una menor respuesta insulínica) y un menor costo de producción.

#### Evaluación sensorial

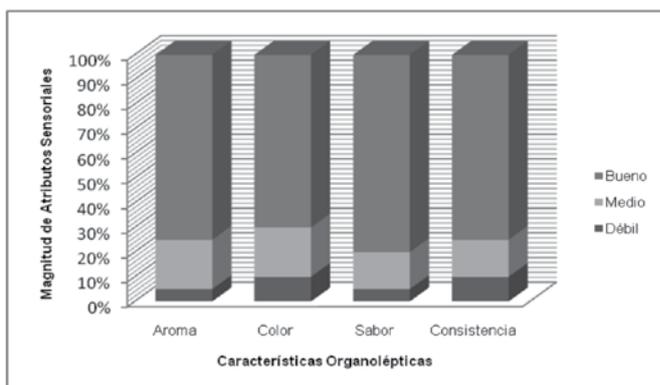


Gráfico 1. Evaluación sensorial descriptiva de bebida láctea sabor naranja formulada a partir de suero hidrolizado al 80%.

En los Gráficos 1, 2 y 3 se muestran los resultados del estudio organoléptico descriptivo sobre las características sensoriales de las tres bebidas formuladas (naranja, pomelo, frutilla) a partir de lactosuero hidrolizado al 80%. Estos ensayos, además de caracterizar los atributos sensoriales, describen la intensidad de los mismos, mostrando una evaluación favorable de las propiedades sensoriales de los sabores cítricos (naranja y pomelo) en bebidas isotónicas. Por su parte, el panel describió mejores características referentes al color y al aroma en la bebida de naranja, por lo que se decidió incorporar este sabor en la formulación final del producto.

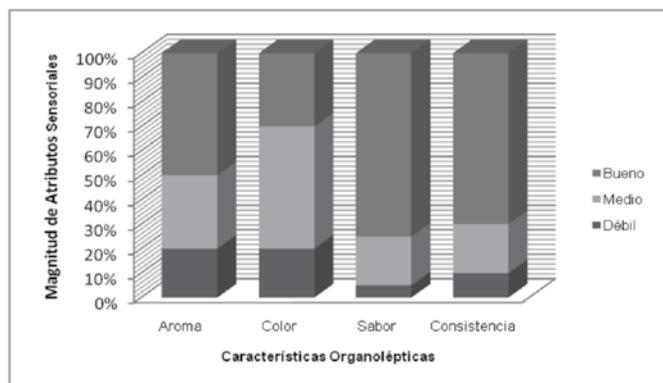


Gráfico 2. Evaluación sensorial descriptiva de bebida láctea sabor pomelo formulada a partir de suero hidrolizado al 80%.

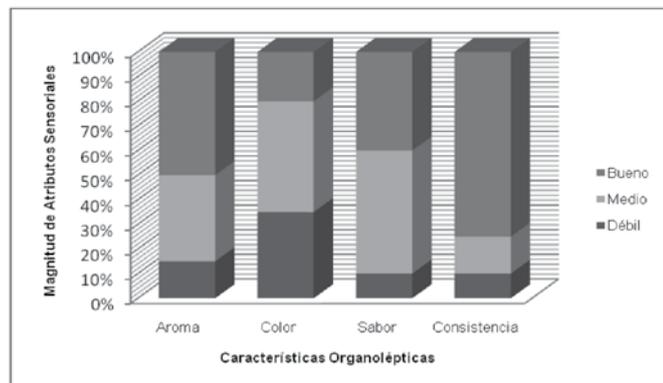


Gráfico 3. Evaluación sensorial descriptiva de bebida láctea sabor frutilla formulada a partir de suero hidrolizado al 80%.

#### Formulación final y características del producto obtenido:

Los estudios realizados conducen a la formulación de una bebida láctea hidrolizada sabor naranja de pH ácido, que posee un proceso de elaboración sencillo (Gráfico 4). La composición nutricional cada 100 ml de producto incluye 13 g de hidratos de carbonos, 1 g de proteínas, 54 mg de sodio y 1.5 mg de otros minerales, representando un aporte de 56 kcal. Por su contenido de sales e hidratos de carbono se clasifica como bebida isotónica.

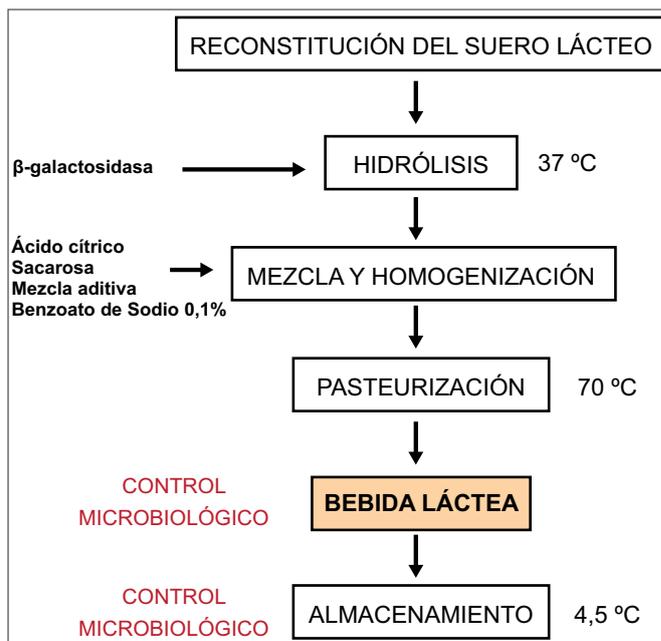


Gráfico 4. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de bebida láctea en base a suero lácteo en escala laboratorio.

**Resultados microbiológicos:** Coniformes Totales: NMP < 3 / Coliformes Fecales: Ausencia / *E. Coli*: Ausencia / Recuento de Mesófilos Totales < 10 UFC/ml / *S. Aureus*: Ausencia (para todas las muestras analizadas), estos valores se ajustan a los solicitados por el Código Alimentario Argentino para leches UAT.

## Conclusiones

En las formulaciones realizadas se obtuvo una bebida isotónica altamente aceptada por un panel sensorial, de buenas características organolépticas y amplias posibilidades de inserción en el mercado. El proceso de elaboración no presenta dificultades tecnológicas, requiere instalaciones de uso común en la industria láctea y permite que los productores de queso reduzcan el impacto ambiental que ocasiona la mala disposición del suero. Considerando que en el desarrollo industrial de los países de la región es fundamental implementar sistemas de gestión que conjuguen el aprovechamiento integral de los recursos y minimicen la contaminación del ambiente, se concluye que la elaboración de este producto posibilita llevar a cabo procesos más eficientes, tecnologías más limpias y mayor rentabilidad.

## Referencias

- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis International*. 16th. ed. Gaithersburg: AOAC, 1995. Official Method 975.55.
- ARGENTINA. MINISTERIO DE SALUD. *Código alimentario argentino*. Cap. VIII. Buenos Aires: ANMAT, 2006.
- ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra-and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. En: *Journal of Food Engineering*. 2005, 67(3):325-332.
- BARNES, Lewis. *Manual en nutrición en pediatría*. 3a. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1994.
- CUELLAS, Anahí. Aprovechamiento industrial del suero de

- quesería. Obtención de una bebida energizante a partir del efluente. En: *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 2008, (49):56-58.
- CUELLAS, Anahí. Estudio de un reactor con enzimas inmovilizadas para el procesamiento de suero de quesería. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral, 2005. (Tesis de Maestría).
  - GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, J.M.; CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. En: *Trends in Food Science & Technology*. 2002, 13(9-10):334-240.
  - INDA CUNNINGHAM, Arturo Enrique. Optimización del rendimiento y aprovechamiento en la industria de quesería. Cap. 4. México: OEA, 2000. pp. 63-93.
  - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL, SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganismos en los alimentos, 1: su significado y los métodos de enumeración*. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000.
  - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL, SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganismos de los alimentos 1: técnicas de análisis microbiológico*. Zaragoza: Acribia, 1983.
  - MIRANDA, Oscar. Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso. Características distintivas y control de calidad. En: *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*. 2007, 17(2):103-108.
  - MONSALVE, Jorge; GONZÁLEZ, Danelis. Elaboración de un queso tipo Ricotta a partir de suero lácteo y leche fluida. En: *Revista Científica*. 2005, XV(6):543-550.
  - SMITHERS, Geoffrey W. Whey and whey proteins. From 'gutter-to-gold'. En: *International Dairy Journal*. 2008, 18(7):695-704.
  - ZADOW, J. Lactose: properties and uses. En: *Journal of Dairy Science*. 1984, 67(11):2655-2679.
-

# Estabilidad de espumas formuladas con proteínas de soja tratadas a pH ácido

Abirached, C. <sup>(1)</sup>, Medrano, C. A. <sup>(1)</sup>, Panizzolo, L. A. <sup>(1)</sup>, Moyna, P. <sup>(1)</sup>, Añón, M. C. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

<sup>(2)</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Contacto: abirached@fq.edu.uy

Recibido: 07/04/2010 - Aprobado: 04/11/2010

## Resumen

Se estudió la influencia del tratamiento a pH ácido de aislados proteicos de soja sobre las propiedades espumantes mediante el análisis de las constantes cinéticas de desproporción y drenado y el relacionamiento de éstas con los parámetros de reología interfacial. Los aislados proteicos de soja fueron obtenidos a partir de harina desgrasada. Una porción se llevó a pH 8,0 y otra porción se trató a pH 2,0. De la porción a pH 2,0 una parte se dejó a este pH y otra parte se neutralizó a pH 8,0. Todas las porciones se liofilizaron. Para la identificación y caracterización estructural de las muestras se realizaron análisis de electroforesis desnaturalizante, calorimetría diferencial de barrido, solubilidad e hidrofobicidad superficial. Se obtuvieron espumas por el método de burbujeo de gas. Se determinó la velocidad inicial de pasaje de líquido a la espuma y el volumen máximo de líquido incorporado a la espuma. El proceso de desestabilización de las espumas formadas se analizó ajustando los datos obtenidos a una cinética de segundo orden bifásica. Se realizaron estudios de reología interfacial con un tensiómetro de gota. El tratamiento a pH ácido mejoró tanto la espumabilidad como la estabilidad de las espumas. La proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior al volumen drenado debido a la desproporción. El tratamiento a pH 2,0 redujo la desestabilización por desproporción de Ostwald, lo que sugiere la formación en la interfase de una película más cohesiva, que se confirma con los parámetros de reología interfacial.

Palabras clave: Drenado, desproporción de Ostwald.

## Abstract

In this work the influence of the acid pH treatment of soy protein isolate on the foaming properties by analysis of the kinetic constants of disproportion and drainage and their relation with the interfacial rheology parameters was studied. Soy protein isolates were obtained from defatted flour. A portion was brought to pH 8.0, another portion was treated at pH 2.0. From the portion treated at pH 2.0 a portion was left at this pH and another was neutralized to pH 8.0. All portions were lyophilized. For the identification and structural characterization of the samples were performed denaturing electrophoresis analysis, differential scanning calorimetry, solubility and surface hydrophobicity. Foams were obtained by the method of gas bubbling. The initial rate of passage of liquid to foam and the maximum volume of fluid incorporated to the foam were determined. The process of destabilization of foams formed was analyzed by fitting the data to a biphasic second-order kinetics. Studies were performed with an interfacial rheology drop tensiometer. Acid pH treatment improved both the foam and foam stability. The proportion of liquid drained by gravity was significantly higher than the drained volume because of the disproportion. Treatment at pH 2.0 reduced the Ostwald disproportion destabilization, suggesting the formation at the interface of a more cohesive film, which is confirmed by the interfacial rheology parameters.

Keywords: Drainage, Ostwald ripening.

## Introducción

En el presente, las proteínas de soja se usan cada vez más en la elaboración de productos alimenticios fabricados como emulsificantes, agentes espumantes, espesantes y agentes de absorción y retención de agua. Sin embargo, el óptimo uso de la proteína de soja en, por ejemplo, emulsiones y productos alimenticios tipo espuma requiere un conocimiento de sus propiedades de superficie bajo varias condiciones mucho mayor del que está actualmente disponible (Utsumi et al., 1997; Martin et al., 2002). Para estudiar las propiedades de superficie se analizan los parámetros viscoelásticos, módulo dilatacional superficial,  $E$ , y sus componentes elástica,  $E_d$ , y viscosa,  $E_v$ .

Las espumas son dispersiones de burbujas de aire en un medio

líquido que contiene un agente activo de superficie, también llamado agente espumante. Este agente activo de superficie tiende a situarse en la superficie, protegiendo del colapso de las burbujas. La composición y las propiedades de la capa adsorbida determinan la estabilidad y propiedades físicas resultantes de la espuma (Maldonado-Valderrama et al., 2007). El proceso de desestabilización de una espuma consiste en la tendencia de la fase gaseosa discontinua a formar una fase continua por aproximación y fusión de las burbujas, a fin de alcanzar un área superficial mínima (mínima energía libre). A este proceso se opone la película proteica superficial, que como barrera mecánica es más efectiva cuanto mayor son su viscoelasticidad y su rigidez. Los mecanismos de desestabilización de una espuma son: drenaje de líquido por efecto de la gravedad, desproporción o maduración

de Ostwald, por el que las burbujas grandes crecen a expensas de las pequeñas por difusión de gas a través de la lamela, y colapso de la espuma por ruptura de las lamelas. Todos estos mecanismos ocurren simultánea y sinérgicamente (Wagner, 2000). Se han realizado varios estudios de la cinética de desestabilización de espumas. Panizzolo (2005) plantea que existen dos procesos diferenciados de drenado de líquido de la espuma, uno debido al drenado de líquido propiamente dicho y otro a la desproporción de Ostwald. En base a ello planteó un modelo de segundo orden bifásico donde se determinan las constantes de velocidad y los volúmenes máximos drenados debido al drenado gravitacional y a la desproporción.

La viscosidad dilatacional de superficie es crucial para la capacidad de un sistema tensioactivo para formar una espuma estable. La viscosidad superficial disminuye las distorsiones mecánicas que de otro modo podrían causar una ruptura de las lamelas de las espumas (Koelsch y Motschmann, 2005). Por su parte, Georgieva et al. (2009) plantearon que la ruptura de la película es controlada por elasticidad dilatacional superficial y que la maduración de Ostwald es principalmente afectada por el espesor de la película entre las burbujas y la solubilidad del gas en el agua.

Después de la disolución en agua o a un pH ligeramente alcalino, las proteínas de soja pueden separarse en varias fracciones por cromatografía permeable de gel, electroforesis, ultracentrífuga, etcétera. Cuando se utiliza esta última técnica se separan cuatro fracciones cuyos coeficientes de sedimentación  $S_{20,w}$  (unidades Svedberg, a 20 °C, en el agua) son respectivamente iguales a 2, 7, 11 y 15. Las globulinas glicinina (11S) y  $\beta$ -conglucina (7S) representan por sí solas más del 70% de las proteínas del grano de soja. La  $\beta$ -conglucina es una glicoproteína que contiene en torno de 5% de glúcidos (mannosa y N-acetil-glucosamina). Está constituida por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ , de carácter ácido (Cheftel, 1989). La glicinina es una proteína globular y se presenta como un hexámero. Las seis subunidades monoméricas tienen la estructura general AB, donde A representa un polipéptido ácido y B un polipéptido básico. Las cadenas A y B están unidas por un puente disulfuro. Dependiendo de la solubilidad, pH y fuerza iónica la glicinina (11S) se disocia en la forma 7S ((AB)<sub>3</sub>) y/o en la forma 3S (AB). A pH 6,7 la glicinina está presente en las formas 3S, 7S y 11S en 0, 3 y 57%, respectivamente y a pH 3,0 en 70, 27 y 0%, respectivamente. Esto significa que a pH 3,0 una mezcla de las formas 3S y 7S está presente y a pH 6,7 está presente principalmente la forma 11S. Aunque tanto las formas 3S como 11S son capaces de formar una red en la interfase aire-agua, la red de 11S es menos rígida (fuerte). La diferencia en la rigidez reside en la estructura más compacta de la forma 11S y la ocurrencia de otros tipos de interacciones dentro de las moléculas. La forma 3S es más flexible debido a la alta repulsión electrostática dentro de la molécula. Por lo tanto, será más fácil de desplegar durante la adsorción en la interfase y tendrá más posibilidades de formar enlaces físicos y covalentes intermoleculares (Martin et al., 2002).

Cualquier cambio de pH, fuerza iónica, temperatura, composición del solvente, etcétera, en el entorno de una proteína nativa, obligará a la molécula a asumir una nueva estructura de equilibrio. Los cambios significativos en las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria sin ruptura de los enlaces peptídicos de la cadena son considerados como "desnaturalización". En algunos casos la desnaturalización de las proteínas es deseable. Las proteínas parcialmente desnaturalizadas son más digeribles y tienen mejores propiedades de formación de espuma y emulsión que las proteínas nativas (Damoradan, 2008).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del tratamiento a pH ácido de aislados proteicos de soja sobre las propiedades espumantes, mediante el estudio de las constantes

cinéticas de desproporción y drenado y el relacionamiento de éstas con estudios de reología interfacial.

## Materiales y Métodos

### Obtención y tratamiento con pH de las proteínas de soja

El aislado proteico de soja en estado nativo (APSn) se obtuvo por solubilización acuosa de harina de soja desengrasada en medio alcalino (pH 8,0) y posterior precipitación a pH 4,5, dispersión del precipitado en medio alcalino (pH 8,0) y secado por liofilización (Petruccioli y Añón, 1994). Con las proteínas nativas se preparó una dispersión de 15 mg/ml, se la llevó a pH 2,0 con HCl 6,0 N durante 1 hora y se liofilizó (APSt2). Con estas proteínas tratadas con pH ácido, se preparó una dispersión de 15 mg/ml, se la llevó a pH 8,0 con NaOH 5,0 N durante una hora y se liofilizó (APSt2-8).

Se determinó contenido de proteína por método de Lowry (Lowry et al., 1951) en cada etapa.

### Identificación de las fracciones por electroforesis

Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo BIO-RAD MINI PROTEIN II CELL. Se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante con SDS en gradiente 7–15% de arcilamida, según lo descrito por Petruccioli y Añón (1994). La corrida fue hecha a un voltaje constante de 90 V para dos geles de 1,0 mm de espesor. Se utilizó una unidad de electroforesis SE 640 Hoefer Scientific instruments. El peso molecular de las proteínas fue estimado mediante un patrón de pesos moleculares LMW Pharmacia consistente en seis proteínas de peso molecular 14,4, 20,1, 30,0, 45,0, 66,0 y 97,0 kDa.

### Solubilidad

Se determinó la solubilidad de las diferentes muestras dispersándolas en solución de fosfato de sodio 10 mM pH 8,0 al 0,1% p/v durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 10.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951).

### Hidrofobicidad superficial

Los valores de hidrofobicidad aromática superficial ( $H_0$ ) de cada muestra fueron determinados por medio de la sonda fluorescente ANS (ácido 8-anilino 1 naftalen-sulfónico) de acuerdo al método de Hayakawa y Nakai (1985). La hidrofobicidad superficial se determinó como la pendiente inicial de la curva de intensidad de fluorescencia relativa porcentual versus la concentración de proteína según Kato y Nakai (1980).

### Estabilidad térmica y grado de conformación nativa mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se determinó la temperatura, entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ), utilizando un Calorímetro de Barrido Diferencial - DSC Serie Q100 TA Instruments con software Universal Analysis 2000. Las muestras analizadas fueron dispersiones de APSn, APSt2, APSt2-8 previamente descriptos. Se utilizaron cápsulas de aluminio herméticas en las que se colocaron aproximadamente 20 mg de muestra. Como referencia se

utilizó una cápsula con muestra, previamente sometida al ensayo. Las condiciones del ensayo fueron un calentamiento a una velocidad de 10 °C/min en un intervalo de temperatura entre 20 y 120 °C.

## Análisis de la capacidad para formar y estabilizar espumas

El estudio de formación y estabilidad de espuma se realizó mediante el método conductimétrico desarrollado por Loisel et al. (1993), con pequeñas modificaciones. La espuma fue generada por burbujeo de aire a través de una placa de vidrio sinterizado tipo G2. El ensayo se realizó con dispersiones de APSn y APSt2 en una concentración de proteína de 1 mg/ml en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 8,0, fuerza iónica 0,28 y a pH 2,5 con fuerza iónica ajustada con NaCl a 0,28. Cada medición se realizó al menos por triplicado.

Se determinó la velocidad inicial de pasaje de líquido a la espuma ( $V_0$ ), mediante la pendiente inicial de la curva  $V_{LE}$  vs  $t$  según Wagner et al. (1996) y el volumen máximo de líquido incorporado a la espuma ( $V_{LE,max}$ ).

La cinética de desestabilización de la espuma se estudia con la ecuación planteada por Panizzolo (2005):

$$V(t) = \frac{V_g^2 k_g t}{(V_g k_g t + 1)} + \frac{V_d^2 k_d t}{(V_d k_d t + 1)}$$

Donde:  $V(t)$ : volumen de líquido drenado a tiempo  $t$ ;  $V_g$ : volumen máximo de líquido debido al proceso de drenado gravitacional;  $V_d$ : volumen máximo de líquido drenado por la difusión de gas;  $K_g$ : constante de velocidad correspondiente al proceso de drenado gravitatorio;  $K_d$ : constante de velocidad correspondiente al proceso de difusión de gas o desproporción.

## Reología interfacial

Las mediciones de las propiedades reológicas superficiales de las películas adsorbidas sobre la interfase (agua/aire) de todas las muestras se llevaron a cabo en un tensiómetro dinámico de gota (Tracker, IT-Concept, Saint-Clementtes Places, France).

Las propiedades dilatacionales de superficie,  $E$  (módulo dilatacional),  $E_d$  (elasticidad dilatacional) y  $E_v$  (elasticidad dilatacional de superficie), se midieron en función del tiempo. La amplitud y la frecuencia angular se mantuvieron constantes en 10% y 200 mHz, respectivamente. Los experimentos se realizaron a  $20 \pm 1$  °C. El pH y la fuerza iónica se mantuvieron constantes en 8,0 o 2,5 y 0,28, respectivamente, utilizando un buffer fosfato de sodio 0,1 M. La solución de proteína de concentración 1 mg/ml se coloca en la cubeta. A continuación, una gota de aire se agrega desde la jeringa y se deja reposar durante 120 min a 20 °C para lograr la absorción de proteínas en la interfase aire-agua. Después de este tiempo se comenzó con la oscilación sinusoidal durante 60 minutos. Cada medición se hizo al menos por triplicado.

## Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó en todos los casos mediante análisis de la varianza (ANOVA) con  $\alpha = 0,05$  y la comparación de medias por la prueba de mínimas diferencias significativas (LSD) con  $\alpha = 0,05$ , utilizando el programa Statgraphics plus 7.0.

## Resultados y Discusión

La solubilidad disminuyó con el tratamiento ácido:  $93 \pm 8\%$  para APSn y  $90 \pm 5\%$  para APSt2 expresada como gramos de proteína soluble en 100 g de proteína; probablemente esto se deba a la formación de agregados insolubles luego del tratamiento ácido.

La hidrofobicidad superficial aumentó con el tratamiento a pH 2,0 del aislado proteico de soja, ya que al desnaturizarse las proteínas exponen sus grupos hidrofóbicos:  $27.4 \pm 0.3$  para APSn y  $31.3 \pm 0.7$  para APSt2.

Se pudieron identificar por electroforesis las bandas de las proteínas 11S (glicinina) y 7S ( $\beta$ -conglucina) constituyentes del aislado proteico de soja.

En el análisis de DSC el APSn presentó dos picos endotérmicos, uno a  $86 \pm 10$  °C y otro a  $105 \pm 2$  °C. El primero de ellos corresponde a la  $\beta$ -conglucina y representa el  $27 \pm 4\%$  y el otro es la glicinina, que representa el  $73 \pm 4\%$  de aislado proteico de soja. En el termograma de APSt2 no se encuentra el pico de la 11S y el de la 7S está a temperaturas más bajas y tiene una menor entalpía de desnaturización ( $\Delta H_d$ ) en comparación con APSn. En el termograma de APSt2-8, sólo aparece el pico de la 7S con un  $\Delta H_d$  mayor y a temperaturas más altas que para APSt2 (Gráfico 1 a y b). Estas diferencias podrían deberse a que se forma una estructura diferente a la nativa (evidenciado por diferencia en  $\Delta H$ ) o la recuperación de un porcentaje de la estructura nativa. Por lo tanto, la  $\beta$ -conglucina es más resistente a la desnaturización por pH y presenta recuperación de la conformación nativa (renaturalización) a diferencia de la glicinina (Puppo, 1997).

En general, se observó por los parámetros  $V_{LE,max}$  y  $V_0$  que la espumabilidad del aislado mejoró con el tratamiento a pH 2,0 (Tabla 1). Al comparar  $V_{LE,max}$  y  $V_0$  no se hallan diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ) entre las espumas formadas con APSt2 dispersas en un medio a pH 2,5 y a pH 8,0. La mayor hidrofobicidad superficial de APSt2 contribuiría a la mejor espumabilidad.

Las espumas preparadas con APSn dispersa en solución acuosa a pH 8,0 presentaron mayores valores de las constantes de desestabilización  $k_g$  y  $k_d$  en comparación a las preparadas con APSt2 tanto a pH 8,0 como a pH 2,5. Por lo tanto, el aislado proteico de soja mejora su estabilidad con el tratamiento ácido. Las espumas preparadas con APSt2 en medio a pH 2,5 y pH 8,0 no presentan diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ) en los valores de  $k_g$  y  $k_d$ , por lo que en el comportamiento del aislado no se representa el fenómeno de recuperación de parte de la estructura nativa de la  $\beta$ -conglucina, probablemente por encontrarse ésta en una menor proporción (Tabla 1).

Los mecanismos de desestabilización también ocurren durante la formación de la espuma, por consiguiente, para que haya una buena formación de espuma, las proteínas deben ser capaces de contrarrestar estos mecanismos de desestabilización. Es lógico pensar que aquellas proteínas que proporcionen a las soluciones buenas características de espumabilidad tengan cualidades que les permitan contrarrestar los mecanismos de desestabilización. Esto concuerda con los resultados, ya que APSt2 presenta mejor espumabilidad y estabilidad que APSn.

Con el fin de estudiar en qué medida contribuyen los mecanismos de drenado gravitacional y desproporción de Ostwald al total de volumen de líquido drenado, se determinaron las proporciones de volumen de líquido drenado mediante escurrido gravitatorio ( $V_g$ ) y de volumen drenado debido a la desproporción ( $V_d$ ). En todos los casos ensayados la proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior (nunca menor de 80%) al volumen drenado debido a la desproporción (Tabla 1). Para el cálculo de  $V_g$  y  $V_d$  se estableció la suposición de que todo el líquido drenó (tiempo infinito). Entonces, las espumas que incorporaron más líquido drenan

más líquido, por lo que el  $V_g$  de las proteínas nativas tiene un valor menor que el de las tratadas con pH ácido. En cuanto a las proporciones de contribución de cada mecanismo, las espumas formadas con APSt2 tanto a pH 8,0 y pH 2,5 tienen una mayor proporción de drenado gravitacional y menor desproporción de Ostwald por tener tal vez una película más cohesiva. Esto se confirmará con los estudios de reología interfacial.

En cuanto al módulo dilatacional ( $E$ ), no existen diferencias significativas entre APSn y APSt2 a pH 8,0: éstos son menores que para APSt2 a pH 2,5, lo que indicaría que en este caso se produce una película más resistente (Tabla 2). El componente dilatacional viscoso a pH 8,0 es mayor para APSt2 que para APSn, y esto podría explicar la mayor estabilidad de las espumas preparadas con APSt2 en relación a las preparadas con APSn a pH 8,0, ya que la viscosidad superficial disminuye las distorsiones mecánicas que pueden causar la ruptura de las lamelas de las espumas. Para APSt2 a pH 2,5 se observa un aumento de casi el doble del componente elástico con respecto a las correspondientes a APSn y APSt2 a pH 8,0, lo cual no se ve

reflejado en  $K_g$  y  $K_d$ , pero sí en los valores de  $V_g$  y  $V_d$ . APSt2 a pH 8,0 cuenta con un menor valor de  $V_d$  que APSt2 a pH 2,5 debido a que APSt2 a pH 8,0 presenta una mayor viscosidad dilatacional. La mayor viscosidad dilatacional evita la ruptura de la película y, por lo tanto, explica la menor proporción de drenado por desproporción de Ostwald ( $V_d$ ) de las espumas formadas con APSt2 a pH 8,0. En cambio, para APSt2 a pH 2,5 la responsable de la estabilización de la película es la componente elástica. Una película estable requiere superficies elásticas para amortiguar las perturbaciones externas y, por ende, evitar la ruptura de la película (Stubenrauch y Miller, 2004). Esto puede deberse a que a pH 8,0 la glicinina se encuentra como hexámero (11S) y a pH 2,5 como dímero (3S). La estructura más compacta de la forma 11S y la ocurrencia de otros tipos de interacciones dentro de las moléculas hace que forme películas menos fuertes que la forma 3S, que es más flexible dada la alta repulsión electrostática dentro de la molécula. Al ser de mayor tamaño, la forma 11S favorece la componente viscosa.

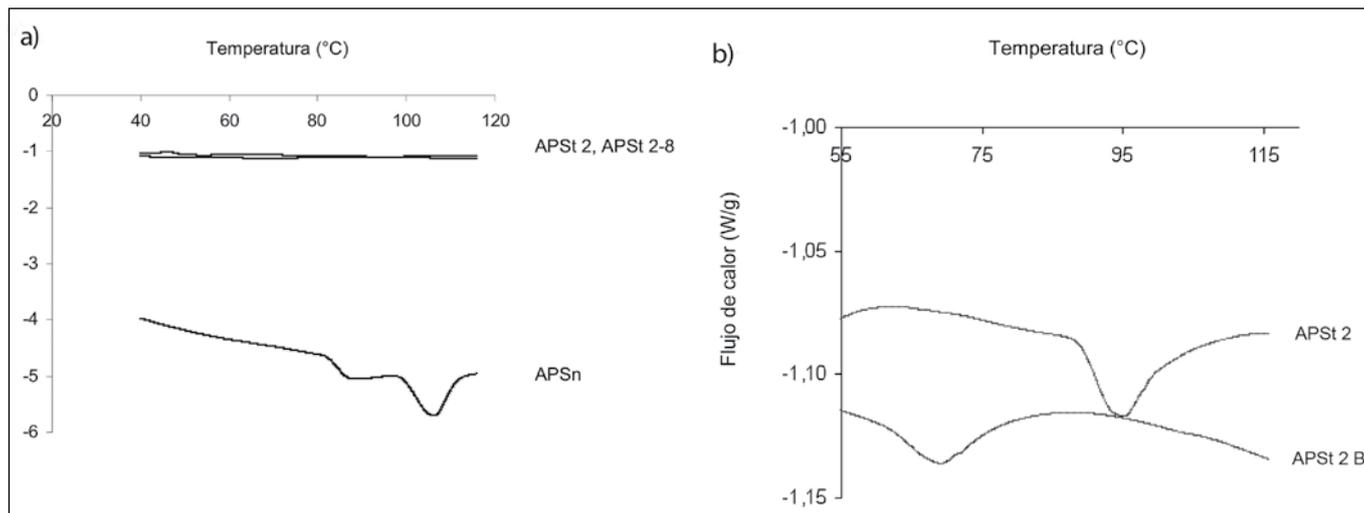


Gráfico 1. a) Termograma de APSn, APSt2 y APSt2-8. b) Termograma de APSt2 y APSt2-8.

	VLE max (ml)	$V_o$ (ml/s)	$K_g \times 10^3$ (ml <sup>1</sup> /s <sup>1</sup> )	$K_d \times 10^4$ (ml <sup>1</sup> /s <sup>1</sup> )	$V_g$ (%)	$V_d$ (%)
APSn pH 8,0	3,5±0,3 a	0,15±0,01 a	12,8±1,2 a	13±5 a	88±5	12±5
APSt2 pH 8,0	7,0±0,3 b	0,30±0,03 b	3,3±0,7 b	5±1 b	92±8	8±8
APSt2 pH 2,5	8,4±0,2 c	0,32±0,04 c	3,4±0,4 b	5±2 b	80±3	20±3

Tabla 1.  $k_g$ ,  $k_d$ ,  $VLE_{max}$ ,  $V_o$  y contribución de los mecanismos de drenado gravitacional y desproporción de Ostwald al total de volumen de líquido drenado para las distintas muestras en distinto pH del medio. Los valores que se encuentran en la misma columna con la misma letra no tienen diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ).

	$E$ (mN/m)	$E_d$ (mN/m)	$E_v$ (mN/m)
APSn pH 8,0	27±3 a	27±4 a	4,3±3,5 a
APSt2 pH 8,0	24±1 a	23±1 a	7,4±0,8 b
APSt2 pH 2,5	41±2 b	40±2 b	4,3±0,4 a

Tabla 2.  $E$ ,  $E_d$ ,  $E_v$  para las distintas muestras con diferentes condiciones de pH. Los valores que se encuentran en la misma columna con la misma letra no tienen diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ).

## Conclusiones

El tratamiento con pH ácido mejora la capacidad espumante y la estabilidad de las espumas del aislado como efecto de desnaturalización de las proteínas y consecuente aumento en la hidrofobicidad superficial. La proporción de líquido drenado por escurrido gravitatorio fue significativamente superior al volumen drenado debido a la desproporción. El tratamiento ácido redujo la desestabilización por desproporción de Ostwald, lo cual sugiere la formación en la interfase de una película más resistente. APSt2 a pH 8,0 forma una película con un mayor componente viscoso, mientras que a pH 2,5 forma una película más elástica. Ambas condiciones favorecen la resistencia de la película a las deformaciones.

## Reconocimientos

Los autores agradecen a LATU la beca otorgada por medio del convenio LATU-Facultad de Química, el soporte financiero del Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT) del Ministerio de Educación y Cultura y el Plan de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay.

## Referencias

- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Proteínas alimentarias; bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Zaragoza: Acribia, 1989.
- DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. En: FENNEMA, O. R. *Química de los alimentos*. 3ª ed. Zaragoza: Acribia, 2008.
- GEORGIEVA, D.; CAGNA, A.; LANGEVIN, D. Link between surface elasticity and foam stability. En: *Soft Matter*. 2009, 5(10):2063-2071.
- HAYAKAWA, S.; NAKAI, S. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. En: *Journal of Food Science*. 1985, 50(2):486-491.
- KATO, A.; NAKAI, S. Hydrophobicity determined by fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. En: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1980, 624(1):13-20.
- KOELSCH, P.; MOTSCHMANN, H. Relating foam lamella stability and surface dilational rheology. En: *Langmuir*. 2005, 21(14):6265-6269.
- LOISEL, W.; GUÉGUEN, J.; POPINEAU, Y. A new apparatus for analyzing foaming properties of proteins. En: SCHWENKE, K. D.; MOTHES, R. VCH. *Food proteins, structure and functionality*. Germany: Weinheim, 1993. pp. 320-323.
- LOWRY, Oliver H.; ROSEBROUGH, Nira. J.; FARR Lewis. A.; RANDALL, Rose J. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry*. 1951, 193(1):265-275.
- MALDONADO-VALDERRAMA, J.; MARTÍN-MOLINA, A.; MARTÍN-RODRIGUEZ, A.; CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. A.; GÁLVEZ-RUIZ, M. J.; LANGEVIN, D. Surface properties and foam stability of protein/surfactant mixtures: theory and experiment. En: *Journal of Physical Chemistry C*. 2007, 111(6):2715-2723.
- MARTIN, A. H.; BOS, M. A.; VAN VLIET, T. Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface. En: *Food Hydrocolloids*. 2002, 16(1):63-71.
- PANIZZOLO, L. A. *Modificación de proteínas por vía enzimática. Análisis de la relación estructura-funcionalidad de los productos*

*de hidrólisis*. Montevideo: UDELAR. Facultad de Química, 2005. (Tesis de Doctorado).

- PETRUCCELLI, S.; AÑÓN, M. C. The relationship between the method of preparation and the structural and functional properties of soy protein isolates. Part I: Structural and hydration properties. En: *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1994, 42:2161-2169.
- PUPPO, M. C. *Propiedades gelificantes de las proteínas de soja a pH ácido*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas, 1997. (Tesis Doctoral).
- STUBENRAUCH, C.; MILLER, R. Stability of foam films and surface rheology: an oscillating bubble study at low frequencies. En: *Journal of Physical Chemistry B*. 2004, 108(20):6412-6421.
- UTSUMI, S.; MATSAMURA, Y.; MORI, T. Structure-function relationships of soy proteins. En: DAMORADAN, S.; PARAF, A. *Food proteins and their applications*. New York: Dekker, 1997.
- WAGNER, J. R.; SORGENTINI, D. A.; AÑÓN, M. C. Thermal and electrophoretic behavior, hydrophobicity and some functional properties of acid-treated soy isolates. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, 44:1881-1889.
- WAGNER, J. R. Propiedades superficiales. En: BARTHOLOMAI, W.; PILOSOFF, A. M. R. eds. *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Buenos Aires: EUDEBA, 2000.

# Capacidad emulsionante de sueros de soja

Sobral, P. A. <sup>(1)</sup>, Wagner, J. R. <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos. Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONI-CET), La Plata, Buenos Aires, Argentina - <sup>(2)</sup> Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina.

Contacto: jwagner@unq.edu.ar

Recibido: 29/06/2010 - Aprobado: 19/10/2010

## Resumen

El objetivo fue analizar la capacidad emulsionante de diferentes sueros de soja como productos integrales. Se ensayaron: suero de soja liofilizado (SSL), suero de soja liofilizado y calentado (SSLC), suero de tofu liofilizado (STL) y suero de tofu secado térmicamente (STST). Las emulsiones fueron realizadas a igual nivel de proteína bruta (0,1–1,0% p/v, buffer fosfato 10 mm,  $\Phi_{w}=0,33$ , Ultraturax T-25). La estabilidad de las emulsiones (medida a través del aceite separado) decreció en el orden: SSLC > STST > STL > SSL. Estos resultados se correlacionan con el índice de actividad emulsificante con y sin SDS. Por medidas de BackScattering y difracción láser se observó una reducción del tamaño de partícula en las emulsiones preparadas con sueros calentados (SSLC respecto a SSL y STST respecto a STL). Se observaron diferencias en la capacidad emulsionante de SSLC y STST, atribuidas a las condiciones de calentamiento. Las reacciones de desnaturalización y de formación de agregados glicosilados en el suero de soja liofilizado y calentado reducirían la formación de flóculos en la emulsión, principal mecanismo de desestabilización en estas emulsiones.

Palabras clave: Residuales líquidos, subproductos industriales de la soja, agente emulsificante.

## Abstract

The objective was to analyze the emulsifying capacity of different soybean wheys as integral products. The following samples were tested: lyophilized soybean whey (LSW), heated LSW (HLSW), lyophilized tofu whey (LTW) and heat-dried tofu whey (HDTW). The emulsions were carried out at same level of total protein (0.1–1.0% w/v, phosphate buffer 10 mm,  $\Phi_w=0.33$ , Ultraturax T-25). Emulsion stability (measured by the separated oil) decreased in the order: HLSW > HDTW > LTW > LSW. These results are correlated with emulsifying activity index (EAI) with and without SDS. Assays of backscattering and laser diffraction showed a reduction of particle size in emulsions prepared with heated whey (HLSW and HDTW in comparison with LSW and LTW, respectively). The differences between HLSW and TDTW can be attributed to the glycosylated products generated during thermal treatment under anhydrous conditions, factors which prevent the flock formation postulated as the main mechanism to destabilize these emulsions.

Keywords: Liquid residual, soy products industries, emulsifying agent.

## Introducción

Tanto la obtención de aislados de manera tradicional como la industria del tofu conducen a la formación de importantes cantidades de sueros de soja (SS) y de tofu (ST). Ambos sueros contienen sales e hidratos de carbono solubles de la soja (mayoritariamente sacarosa, estaquiosa y rafinosa), enzimas ( $\beta$ -amilasa, lipooxigenasa y ureasa) y factores antinutricionales como la lectina y los factores antitripticos de Kunitz (FAK) y de Bowman-Birk (FABB) con propiedades anticancerígenas (Kennedy, 1993). Se ha demostrado en ST niveles importantes de isoflavonas (genistina, daidzeína), fitoestrógenos de reconocidos efectos beneficiosos para la salud (Espinosa-Martos et al., 2006; Ben Ounis et al., 2008). SS y ST representan un problema ambiental para su descarte directo. El objetivo del trabajo fue analizar en forma comparativa el poder emulsificante de estos sueros como productos integrales, para su posible utilización en la industria alimentaria.

## Materiales y Métodos

### Obtención del aislado y de los sueros

El suero de soja (SS) es el sobrenadante isoeléctrico de la preparación de aislados (Sorgentini y Wagner, 1999) a partir de harina

de soja (Prosam™ R; Brasil). El suero de tofu (ST) fue obtenido de la industria (Soyana S.H.). SS y ST se liofilizaron dando SSL y STL. El SSL se calentó a 5 °C/min hasta 150 °C en cápsula cerrada de acero inoxidable, se enfrió (hielo, 30 min), recuperando la muestra SSLC con el FAK totalmente inactivado (Sobral y Wagner, 2007). ST se concentró con rotavapor Büchi R-124 (50 °C, 50 min) hasta  $21,2 \pm 0,3$  g/l (pH= 5,8), se secó en estufa de vacío (50 °C; 10 mm Hg; 4 hs), se molió y deshidrató a HR=0 ( $P_2O_5$ , 5 días), dando la muestra STST. En todas las muestras se determinó el contenido (% p/p) de: cenizas (por calcinación 550 °C), calcio (a partir de cenizas por absorción atómica, Shimadzu AA-6650), glúcidos totales (colorimetría con fenol-sulfúrico) y proteínas (Kjeldahl, Nx6,25) para preparar emulsiones con igual nivel de proteína.

### Preparación, caracterización y estudio de emulsiones

Las emulsiones o/w se prepararon homogeneizando 10 g de dispersión (1, 5 y 10 mg proteína/ml buffer fosfato 10 mm H 7) con 5 g de aceite refinado de girasol a 20.000 rpm (Ultraturax T-25, rotor S25N-10G, 1 min,  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ). La microestructura de las emulsiones se analizó midiendo el diámetro de partícula  $D_{1,0}$  y  $D_{4,3}$  con un Malvern Mastersizer 2000E, con y sin SDS (0.1%) y determinando por turbidimetría el índice de actividad emulsificante, IAE (Pearce y

Kinsella, 1978). La cinética de separación gravitacional (cremado) de las emulsiones se estudió con un analizador óptico vertical (Quick Scan, Beckman), registrando los perfiles de backscattering (BS %) y transmitancia (T %) en función de la altura de la emulsión (cada minuto durante 1 hora) y midiendo los valores promedio de BS y T en la base del tubo (7-9 mm). La constante cinética de separación gravitacional se calculó como:  $K = [10^3 / (BS_{0, \text{prom}} \times t_{1/2})]$  donde  $BS_{0, \text{prom}}$  es BS inicial promedio y  $t_{1/2}$  el tiempo para el cual  $BS_{\text{prom}} = 0,5 \times BS_{0, \text{prom}}$ . El aceite separado (%AS) en las emulsiones al ser sometidas a centrifugación se determinó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Palanuwech et al. (2003) con leves modificaciones (Palazolo y Wagner, 2007).

Las determinaciones de DTP fueron realizadas por triplicado y IAE al menos por quintuplicado (por la alta dispersión del método). La cinética de separación gravitacional y el aceite separado se midieron al menos por duplicado para los ensayos a 5 y 10 mg/ml y por triplicado para el ensayo a 1 mg/ml.

## Resultados y Discusión

Para SSL, el contenido de proteínas, carbohidratos, cenizas y calcio fue de  $16,3 \pm 0,1$ ;  $68,0 \pm 2,8$ ;  $16,1 \pm 0,9$  y  $0,19 \pm 0,01\%$ , respectivamente. En tanto que para STL las mismas determinaciones resultaron:  $15,3 \pm 0,2$ ;  $38,2 \pm 1,5$ ;  $22,6 \pm 0,1$  y  $3,39 \pm 0,01\%$ , respectivamente. Estas composiciones fueron comparables en las muestras calentadas (SSLC y STST). Las emulsiones con SSL y SSLC se prepararon con concentraciones de proteína equivalentes a las STL y STST pero, debido a la diferente composición de los sueros, los contenidos en carbohidratos y sales fueron diferentes. Los valores de K muestran que en todo el rango de concentraciones analizadas la desestabilización por cremado crece siguiendo el orden:  $STL > STST > SSLC > SSL$  (Tabla 1).

Excepto en las emulsiones con SSL, en los demás sueros el incremento de la concentración se traduce en una mayor estabilización por cremado. En SSL, a alta concentración habría un efecto desestabilizante de los otros componentes del suero. Las cinéticas de desestabilización (no mostradas) y los valores de T % (Tabla 1) indican que aun a concentraciones medias y altas las emulsiones con SSL presentan una mayor clarificación, mientras que la que menos se clarifica a alta concentración es la STST. Todas las muestras tienen  $D_{1,0}$  similares (entre 0,62 y 0,66 con y sin SDS); los valores IAE indican que el área creada durante la homogeneización decrece siguiendo el orden:  $STL > STST \approx SSLC > SSL$  (con y sin SDS). Por tratarse de emulsiones multimodales, los  $D_{4,3}$  (Tabla 1) dan cuenta de la contribución de gotas grandes de fase dispersa. En presencia de SDS el tamaño de gota crece siguiendo el orden:  $STL > STST > SSLC > SSL$ . Las diferencias entre IAE y  $D_{4,3}$  con y sin SDS revelan que las emulsiones con STL y SSLC son menos floculadas que las de SSL y STST.

Muestra	mg/ml	K	T% (1h)	BS <sub>0</sub> (%)	SDS (0,1%)	IAE (m <sup>2</sup> /g)	D <sub>4,3</sub> (µm)
STL	1	10,96	7,11	55,3±3,4	-	24,6	35,41
	5	3,34	7,11	60,2±2,0	+	33,1	31,99
	10	1,98	4,25	62,1±0,8	-	23,0	52,97
STST	1	17,68	6,64	51,5±2,9	+	31,6	34,07
	5	5,49	0,17	60,1±1,7	-	16,7	70,58
	10	2,15	0,03	60,2±0,9	+	18,5	45,54
SSL	1	20,00	14,01	38,2±3,1	-	24,5	40,03
	5	32,49	28,56	48,5±1,9	+	30,4	35,54
	10	57,12	27,07	53,4±1,1	-	24,5	40,03
SSLC	1	19,71	12,36	51,4±4,5	+	30,4	35,54
	5	9,72	4,73	56,4±2,1	-	24,5	40,03
	10	8,77	2,12	56,2±0,9	+	30,4	35,54

Tabla 1. Parámetros de estabilidad y microestructura de emulsiones con diferente concentración de proteína en fase acuosa. K: constante cinética de separación gravitacional; T %: Transmitancia en la zona inferior de la emulsión a 1 h; BS<sub>0</sub>: Backscattering inicial; IAE: Índice de actividad emulsificante. D<sub>4,3</sub>: diámetro medio de Sauter. Los valores BS<sub>0</sub> son promedios de al menos dos determinaciones independientes expresados con sus correspondientes desvíos estándar.

Los valores de Backscattering inicial (BS<sub>0</sub>) para un  $\Phi_{\text{máscico}}$  dado (Tabla 1) son proporcionales a la cantidad de gotas y al área creada; para una misma muestra un incremento en la cantidad usada se traduce en un incremento en el BS<sub>0</sub> como consecuencia de una mayor cantidad de gotas de un menor tamaño. Si comparamos los sueros entre sí, se encuentra que para las tres concentraciones ensayadas el mejor agente emulsificante es el STL (lo que se corresponde con la menor floculación y menor tamaño de partícula), seguido del STST y SSLC. Además, se observó que las emulsiones STL forman cremas muy hidratadas (dato no mostrado). En cuanto a su estabilidad a la centrifugación, todas las emulsiones liberan menos aceite (<AS %) a medida que aumenta la concentración de proteínas (Gráfico 1). Las muestras sometidas a calentamiento (STST y SSLC) reducen notablemente la liberación de aceite; en el caso de SSLC, a todas las concentraciones.

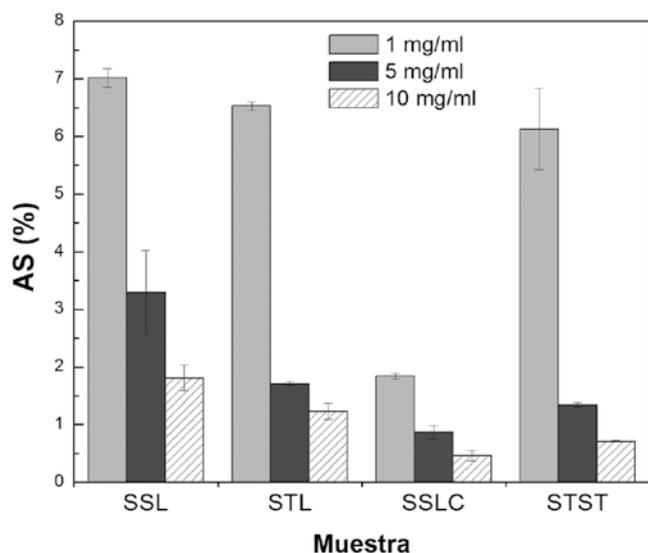


Gráfico 1. Aceite separado en las emulsiones en función del tipo de muestra y de la concentración de proteína en la fase acuosa. Las barras de error son desvíos estándar de duplicados reales, salvo para los ensayos a 1 mg/ml que se realizaron por triplicado debido a la mayor dispersión en estas determinaciones.

## Conclusiones

Un análisis global de los resultados permite concluir que STL (suero con proteínas desnaturalizadas y baja actividad antitriptica, Sobral y Wagner, 2009), incluso con altos niveles de calcio, es un mejor emulsificante que el suero de soja nativo (SSL). Sin embargo, los mejores resultados se obtienen con sueros de soja tratados térmicamente (SSLC y STST), debido a la formación de productos glicosilados. En la muestra SSLC, la desnaturalización y glicosilación proteica en condiciones anhidras además de mejorar las propiedades emulsionantes permite inactivar los factores antitripticos, lo cual es requisito para el uso en alimentos.

## Referencias

- BEN OUNIS, W.; CHAMPAGNE, C.P.; MAKHLOUF, J.; BAZINET, L. Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17, En: *Desalination*. 2008, 229(1-3):192-203.
- ESPINOSA-MARTOS, I.; PRÉSTAMO, G.; RUPÉREZ, P. Composición y propiedades del suero de soja, un subproducto de la elaboración del tofu. En: *Alimentaria*. 2006, (371):72-73.
- KENNEDY, A.R. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. En: TROLL, W.; KENNEDY, A. R. *Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents*. New York: Plenum Press, 1993. pp. 9-64.
- PALANUWECH, J.; POTINENI, R.; ROBERTS, R.F.; COUPLAND, J.N. A method to determine free fat in emulsions. En: *Food Hydrocolloids*. 2003, 17(1):55-62.
- PALAZOLO, G.G.; WAGNER J.R. Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 33-56.
- PEARCE, N. K.; KINSELLA, J. E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1978, 26(3):716-723.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Thermal properties of soybean whey and its protein. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 57-76.
- SOBRAL, P.A.; WAGNER, J.R. Relación entre la composición y la actividad antitriptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas aisladas. En: *Información Tecnológica*. 2009, 20(5):65-73.

- SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins En: *Journal of Food Biochemistry*. 1999 23(5): 489-507.

# Estabilidad a la congelación-descongelación de emulsiones o/w preparadas con aislados de soja nativos y desnaturalizados con diferente solubilidad

Palazolo, G. G. <sup>(1)</sup>, Wagner, J. R. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Propiedades Funcionales de Alimentos, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina – CONICET.

Contacto: gpalazolo@unq.edu.ar

Recibido: 25/06/2010 - Aprobado: 06/12/2010

## Resumen

En este trabajo se evaluó la estabilidad a la congelación de emulsiones modelo aceite en agua (o/w) preparadas con cuatro aislados de soja: dos nativos (ASN-1 y ASN-2, de similar composición pero diferente solubilidad, >90% y ~75%, respectivamente) y dos desnaturalizados (ASD-1 y ASD-2), resultantes de calentar los respectivos aislados nativos (90 °C, 5 minutos). Las emulsiones preparadas con dispersiones acuosas al 2% p/v de ASN o ASD y aceite de girasol refinado ( $\Phi = 0,25$ ), se congelaron a -20 °C por 24 horas y luego se descongelaron a 20 °C. La estabilidad se evaluó a partir de medidas de distribución de tamaño de partícula (difracción láser) y aceite liberado (AL, método de dilución del colorante). Las emulsiones preparadas con ASN-2 y ASD-2 resultaron muy inestables después de ser congeladas y descongeladas, resultado que se evidenció por el aumento del tamaño de partícula y un  $AL > 25\%$ . Al usar el aislado ASN-1 de mayor solubilidad, las emulsiones fueron más estables y se observó un marcado incremento de la estabilidad cuando sus proteínas eran desnaturalizadas (ASD-1), no observándose prácticamente coalescencia ni aceite separado. En conclusión, la solubilidad y la desnaturalización proteica de los aislados de soja son factores decisivos en la estabilidad de emulsiones frente a la congelación-descongelación.

Palabras clave: Aceite liberado, almacenamiento congelado, desestabilización.

## Abstract

The aim of this work was to evaluate the freeze-thaw stability of model o/w emulsions prepared with four soy isolates: two native (NSI-1 and NSI-2, with similar composition but different protein solubility, >90% and ~75%, respectively), and two denatured (DSI-1 and DSI-2), resulting from heating the respective native ones (90 °C, 5 min). Emulsions prepared with NSI or DSI aqueous dispersions (2% w/v) and refined sunflower oil ( $\Phi = 0.25$ ) were frozen at -20 °C for 24 h and subsequently thawed at 20 °C. Freeze-thaw stability was evaluated by particle size distribution (laser diffraction) and free oil (FO, dye-dilution technique) measurements. Emulsions prepared with NSI-2 and DSI-2 were highly destabilized after freeze-thawing process, as was demonstrated by the increase of particle size and  $FO > 25\%$ . More stable emulsions were obtained with the high soluble sample NSI-1, and a noticeable increase in stability was observed with denaturation of their proteins (DSI-1). The coalescence and oiling off was almost completely inhibited in DSI-1 emulsions. In summary, solubility and denaturation degree of soy protein isolates have a decisive influence on freeze-thaw stability of protein-stabilized emulsions.

Keywords: Oiling off, frozen storage, destabilization.

## Introducción

Los aislados proteicos de soja contienen aproximadamente 90% de proteínas, constituidas mayoritariamente por las glogulinas de reserva 7S ( $\beta$ -conglucina) y 11S (glicina). La capacidad de los aislados de soja para formar y estabilizar emulsiones o/w se estudió extensamente en trabajos previos (Mitidieri y Wagner, 2002; Palazolo et al., 2004; Palazolo y Wagner, 2007). La conservación por refrigeración de emulsiones o/w con proteínas como único o principal agente emulsificante es posible, dado que son sistemas estables aun cuando la fase lipídica cristalice. Sin embargo, el almacenamiento congelado

de estas emulsiones es un tratamiento altamente desestabilizante (McClements, 2004). En ausencia de crioprotectores, la formación de hielo produce la deshidratación del film interfacial, la criocentración de componentes en la fase acuosa y un mayor contacto entre gotas, mecanismos que en conjunto promueven la floculación. Si el film interfacial es incapaz de resistir el estrés inducido por la formación del hielo, se produce además coalescencia y posterior separación de aceite luego de la descongelación (McClements, 2004; Ghosh y Coupland, 2006). Se informaron grados variables de desestabilización frente a la congelación/descongelación en emulsiones o/w preparadas con distintas proteínas (soja, lactosuero, caseinato) (Ghosh et al.,

2008), pero en ningún caso se evaluó el efecto del envejecimiento ("aging") de la muestra. El objetivo del trabajo fue justamente evaluar la influencia del envejecimiento o almacenamiento de aislados de soja sobre la estabilidad de emulsiones modelo o/w frente a la congelación.

## Materiales y Métodos

### Preparación de los aislados de soja y las dispersiones acuosas:

A partir de harina de soja desgrasada y activa (Solae Latin America, SP, Brasil) se preparó un aislado de soja nativo (ASN-1, 90,2% N×6,25) por solubilización acuosa, precipitación a pH 4,5, solubilización del precipitado a pH 7,5 y posterior liofilización. Por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se corroboró el estado nativo de 7S y 11S (Sorgentini y Wagner, 1999). La muestra ASN-1 se almacenó un año a 4 °C y resultó en la muestra ASN-2, la cual tiene el mismo contenido proteico que la NSI-1 pero un mayor grado de agregación proteica. Se prepararon dispersiones de ASN-1 y ASN-2 al 2% p/v en buffer fosfato de sodio 10 mm pH 7,0 (agitación magnética, dos horas), se calentaron (90 °C, 5 minutos) y se enfriaron en agua-hielo, obteniéndose las muestras totalmente desnaturizadas ASD-1 y ASD-2. En todas las muestras se determinó la solubilidad proteica como el porcentaje de proteína en el sobrenadante (centrifugación 15000 g, 30 minutos de dispersiones 2% p/v) respecto de la dispersión inicial (Mitidieri y Wagner, 2002).

### Preparación de las emulsiones y tratamiento de congelación/descongelación:

Las emulsiones se prepararon por homogeneización de dispersiones acuosas (2% p/v) y aceite refinado de girasol ( $\varphi=0,25$ ) en dos etapas: 1) obtención de pre-emulsión con un homogeneizador rotor/estator (Ultraturrax T25, 20000 rpm, 1 minuto, IKA Labor Technik, Alemania) y 2) circulación de la pre-emulsión en un homogeneizador a válvula de alta presión (400 Bar, Panda 2K, Niro Soavi, Parma, Italia). Las emulsiones (20 ml en frascos plásticos) se congelaron en un freezer a  $-20 \pm 1$  °C durante 24 horas y se descongelaron posteriormente a 20 °C. Las curvas de enfriamiento de la parte media de las emulsiones (termocupla tipo K, registrador Lufft Opus CE 10, Alemania) mostraron que el inicio de la congelación ocurrió a los 50 minutos, llegando a los  $-20$  °C a las cuatro horas.

**Caracterización de las emulsiones:** se determinó el diámetro D43 por dispersión estática de luz (Malvern Mastersizer 2000E, Malvern Instruments, Reino Unido) acoplado a una unidad de dispersión (Hydro 2000MU). Antes de la medida, las emulsiones se diluyeron (1:1 v/v) con buffer 10 mm fosfato de sodio (pH 7,0) en ausencia y en presencia de 1% p/v de SDS (Anton, 2002), lo cual asegura la disociación de flóculos. Las condiciones de medida fueron: velocidad de dispersión 2000 rpm, índices de refracción 1,33 y 1,47 para las fases dispersante y dispersa, respectivamente; coeficiente de absorción 0,01. El grado de floculación (GF %) de las emulsiones iniciales y el índice de coalescencia (IC %) inducido por la congelación se calcularon como:  $GF (\%) = [D_{4,3+SDS \text{ in}} - D_{4,3-SDS \text{ in}} / D_{4,3+SDS \text{ in}}] \times 100$ ,  $IC (\%) = [D_{4,3+SDS \text{ c-d}} - D_{4,3+SDS \text{ in}} / D_{4,3+SDS \text{ in}}] \times 100$ , donde los subíndices -SDS, +SDS, in y c-d indican valores obtenidos sin y con SDS, antes y después de la congelación/descongelación, respectivamente (Palazolo y Wagner, 2007). El aceite liberado (AL %) se determinó con el método espectrofotométrico de dilución del colorante liposoluble Sudan III, descripto por Palanuwech et al. (2003) y modificado por Palazolo y Wagner (2007).

## Resultados y Discusión

La solubilidad proteica (SP) de la muestra ASN-1 ( $93,2 \pm 1,4\%$ ) disminuyó significativamente por efecto del almacenamiento refrigerado (ASN-2,  $SP = 74,8 \pm 1,2\%$ ), lo que se atribuye principalmente a la agregación de la globulina 11S (Palazolo et al., 2004). Este envejecimiento también se vio reflejado en las muestras desnaturizadas:  $SP = 96,1 \pm 1,3\%$  y  $87,5 \pm 1,4\%$  para ASD-1 y ASD-2, respectivamente. Al tratar térmicamente una dispersión acuosa de aislado de soja a baja concentración, las globulinas 7S y 11S se desnaturizan, disocian y forman agregados solubles, en tanto que los agregados insolubles preexistentes se disocian parcialmente, lo cual incrementa la solubilidad, especialmente evidente en la muestra almacenada ASN-2. El efecto del almacenamiento también se observó en las características de las emulsiones iniciales. La concentración proteica usada (2% p/v) fue suficiente para cubrir el área creada durante la homogeneización, con más del 20% de proteína no adsorbida en la fase acuosa (Palazolo y Wagner, 2007). Sin embargo, las emulsiones preparadas con las muestras almacenadas dieron valores  $D_{4,3}$  levemente superiores y un notable incremento en el grado de floculación (GF %) respecto a las de las muestras frescas (Gráfico 1). Estos flóculos se forman por un mecanismo de puenteo, ya que fueron estables en las condiciones de medida del tamaño de partícula. En el caso de las muestras almacenadas, la floculación se atribuiría a una más lenta adsorción de proteína en la interfase por la presencia de agregados y a una menor cantidad de proteína soluble disponible (McClements, 2004). Aunque la desnaturización térmica induce la formación de agregados solubles, el incremento de la hidrofobicidad superficial de las proteínas favorece la formación de emulsiones con menor GF % (emulsión ASD-2 respecto a ASN-2, Gráfico 1).

En las emulsiones preparadas con las muestras frescas ASN-1 y ASD-1 se observó una inhibición casi completa de liberación de aceite luego de la descongelación y en particular en la emulsión ADS-1 una mayor estabilidad frente a la coalescencia (Tabla 1). El incremento de la concentración efectiva de proteína en la interfase en al menos un orden de magnitud, sumado a la alta tendencia de la globulina 11S nativa a la agregación a bajas temperaturas, hace altamente probable que se agregue en la interfase por efecto de la congelación y perturbe la integridad del film interfacial, induciendo a la coalescencia (Palazolo y Wagner, 2007). Este efecto no es observado cuando la 11S está desnaturizada térmicamente (ASD-1), acorde a la notable disminución de IC % (Tabla 1). En cambio, las emulsiones preparadas con ASN-2 y ASD-2 mostraron un marcado grado de desestabilización luego del almacenamiento congelado. Al descongelarse se observó separación gravitacional, una fase crema coagulada con formación de agregados proteicos y una capa de aceite en la parte superior de la emulsión, acorde con los altos valores de IC % ( $> 10^4$ ) y AL % (Tabla 1).

En estas emulsiones preparadas con muestras envejecidas, el efecto positivo de la desnaturización térmica se ve enmascarado (Tabla 1). Cuando la emulsión inicial tiene un mayor grado de floculación, los flóculos tienen menor capacidad de acomodarse en el volumen reducido de la fase acuosa no congelada, desestabilizándose rápidamente por coalescencia. Por la misma razón, la presencia de gotas individuales de mayor tamaño también puede tener una influencia negativa en la estabilidad posterior de la emulsión frente a la congelación.

El efecto del envejecimiento de proteínas sobre la estabilidad frente a la congelación de emulsiones o/w es un factor que no debe subestimarse. Aunque la estabilización total de la emulsión requiere la adición de crioprotectores, es fundamental contar con una emulsión de partida de reducido tamaño de gotas y un bajo grado de floculación, lo

cual se logra con una adecuada solubilidad y actividad superficial del emulsionante. Este efecto podría ser particularmente importante en la preparación de emulsiones con aislados de soja comerciales, que en la mayoría de los casos tienen una solubilidad significativamente inferior a la de aquellos preparados en el laboratorio

- GHOSH, S.; CRAMP, G.; COUPLAND, J.N. Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006, 272(1-2):82-88.
- SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. En: *Journal of Food Biochemistry*. 1999, 23(5):489-507.

Muestras	IC (%)	AL (%)
ASN-1	>10 <sup>4</sup>	1,7 ± 0,3
ASD-1	85 ± 1	1,6 ± 0,4
ASN-2	>10 <sup>4</sup>	31,2 ± 3,0
ASD-2	>10 <sup>4</sup>	33,7 ± 0,7

Tabla 1. Parámetros de desestabilización de emulsiones o/w preparadas con aislados nativos y desnaturalizados de soja (ASN y ASD, respectivamente) y sometidas a congelación-descongelación.

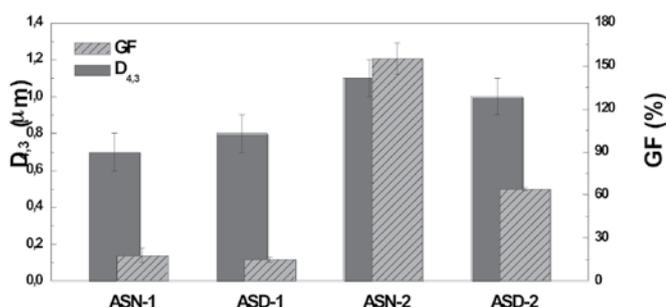


Gráfico 1. Diámetros promedio D<sub>4,3</sub> de gotas individuales y grado de floculación (GF %) de emulsiones o/w preparadas con aislados nativos (ASN) y desnaturalizados (ASD) de soja. Los valores D<sub>4,3</sub> se obtuvieron a partir de la distribución de tamaño de partícula en presencia de SDS.

## Referencias

- ANTON, M.; BEAUMAL, V.; BROSSARD, C.; LLAMAS, G.; LE DENMAT, M. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: ANTON, M. *Food emulsions and dispersion*. Trivandrum: Research Sinpost, 2002. pp. 15-28.
- McCLEMENTS, D.J. Protein-stabilized emulsions. En: *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 2004, (9):305-313.
- MITIDIERI, F.E.; WAGNER, J.R. Coalescence of o/w emulsions stabilised by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. En: *Food Research International*. 2002, 35(6):547-557.
- PALANUWECH, J.; PONITENI, R.; ROBERTS, R.F.; COUPLAND, J.N. A method to determine free fat in emulsions. En: *Food Hydrocolloids*. 2003, 17(1):55-62.
- PALAZOLO, G.G.; WAGNER, J.R. Effect of freezing on stability of soy protein and sodium caseinate oil-in-water emulsions. En: LUPANO, C.E. *Functional properties of food components*. Kerala: Research Signpost, 2007. pp. 33-56.
- PALAZOLO, G.G.; SORGENTINI, D.A.; WAGNER, J.R. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of o/w emulsions. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2004, 81(7):625-632.
- GHOSH, S.; COUPLAND, J.N. Factors affecting the freeze-thaw stability of emulsions. En: *Food Hydrocolloids*. 2008, 22(1):105-111.

## ÍNDICE DE AUTORES

Abirached, Cecilia; 58  
Aizpún, Agustina; 3  
Añón, María Cristina; 58  
Boccardi, Lucía; 11  
Bouvier, María Elena; 3  
Cabrerá, Shirley; 23  
Capdevielle, Fabián; 43  
Carnikián, Agustín; 3  
Carrara, María Victoria; 3  
Cartmell, Elise; 3  
Clemente, Juan; 11, 39  
Cuellas, Anahí; 54  
Dabezies, María; 11  
Ferrari, Graciela; 11  
Hernández, Marina; 48  
Irigaray, Ricardo; 23  
Keel, Karen; 3, 29, 34  
Laíz, Justo; 29  
Latrónica, Luis; 48  
Lopretti, Mary; 39, 43  
Medina, Daniel; 48  
Medrano, Claudia Alejandra; 58  
Míguez, Diana; 3, 11, 23, 34  
Moyna, Patrick; 58  
Ottati, Carolina; 43  
Palazolo, Gonzalo G.; 66  
Panizzolo, Luis Alberto; 58  
Parodi, Adriana; 34  
Remersaro, Jorge; 48  
Rey, Fabiana; 39  
Saizar, Carlos; 11  
Seoane, Ignacio; 3  
Soares, Ana; 34  
Sobral, Pablo A.; 63  
Tana, Jukka; 11  
Teixeira de Mello, Franco; 11  
Tosar, Juan Pablo; 29  
Vázquez, Silvia; 39  
Wagner, Jorge R.; 54, 63, 66  
Zunino, Pablo; 39

# ÍNDICE TEMÁTICO

---

- A**  
Acidificación; 39, 40  
Ácidos orgánicos; 39, 40  
Ácidos resínicos; 12, 14, 15, 19 - 21  
Actividad antibacteriana; 39 - 42  
Aditivos; 48, 53  
Agentes luteotróficos; 29  
Agua; 3 - 5, 9, 11 - 15, 19, 20, 23, 24, 30, 31, 35, 37, 48, 58 - 60, 66, 67  
**Aguas; 3 - 28**  
Aislados proteicos; 58, 59, 66  
Anchoa de Río; 16  
Antibióticos; 39, 40, 42  
Anticuerpos; 29 - 31, 33  
Apareiodon Affinis; 16  
Arsénico; 19
- B**  
Bacillariophyceae; 15  
Bagarito; 16  
Bagre amarillo; 16  
Bagre trompudo; 11, 13, 16, 19, 20  
Bebidas; 54 - 56  
Bilis; 12, 13, 19 - 21  
Biodisponibilidad; 3, 4, 9  
Biodiversidad; 3, 43, 46  
Bioensayos; 3 - 5, 7, 8  
Bioinformática; 46  
Biomasa; 16, 20, 39 - 42  
Biomoléculas; 29, 30  
Bioprocesos; 39, 43, 46  
**Bioquímica analítica; 29 - 33**  
Biorremediación; 43, 45, 46  
Biosensor; 29 - 33, 35  
Biosensor amperométrico; 29, 33  
**Bioteología; 34 - 47**  
Bioteología industrial; 43, 46  
Bolsas de polietileno; 48, 49, 51, 52  
Burbujas; 58, 59
- C**  
Cadmio; 8, 19  
Caenidae; 16  
Calcio; 63 - 65  
Calidad de agua; 12, 13  
Capacidad emulsionante; 63  
Carbohidratos; 64  
Celulosa; 3, 4, 11, 12, 20, 21, 35, 37, 48  
Cenizas; 63, 64  
Cepas; 9, 39, 40, 42 - 46  
Ceratopogonidae; 16  
Ceriodaphnia Dubia; 3, 4  
Characidae; 16  
Chironomidae; 16  
Chlorophyceae; 15  
Cianobacterias; 15, 19, 20  
Cinc; 19  
Cladóceros; 15, 19  
Clorofenoles; 3, 4, 11, 12, 15, 20  
Cobre; 8, 19, 36  
Compuestos metoxilados; 44  
Comunidades biológicas; 11, 12, 22  
Contaminantes; 3, 4, 8, 9, 11, 20, 21, 34, 46  
Copépodos; 15  
Corvina de Río; 16  
Cromo; 19  
Cryptophyceae; 15  
Cyanophyceae; 15
- D**  
Degradación; 12, 43 - 46, 48, 49, 53  
Desproporción de Ostwald; 58 - 62  
Dicloxacilina; 39 - 41  
Difracción láser; 5, 6, 23 - 27, 63, 66  
Dinophyceae; 15  
Dioxinas; 8, 11 - 15, 19 - 21, 34  
Dispersión de luz; 24  
Disruptores endócrinos; 34
- E**  
EDC; 34  
Efluentes; 3, 4, 11, 12, 20, 34, 35, 43, 46  
Elmidae; 16  
Emphidae; 16  
Emulsiones; 58, 63 - 68  
Enzima; 29, 30, 35, 43 - 46, 55, 57, 63  
Ephemerae; 16  
Esperma; 34  
Espuma; 19, 58 - 61  
Estrógenos; 8, 34, 35  
Euglenophyceae; 15  
Extremófilos; 43, 44, 46
- F**  
Fenoles Clorados; 12, 19  
Fertilidad; 34  
Fitoesteroides; 12, 19 - 21  
Fitoestrógenos; 34, 63  
Fitoplancton; 12, 15, 19 - 22  
FOly; 43 - 46  
Fósforo; 5, 6, 9, 11, 14, 19, 20  
Fray Bentos; 3, 4, 6, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 18, 19, 21, 22  
Furanos; 11, 12, 14, 15, 19, 20, 21, 34
- G**  
Glúcidos; 59, 63  
Gomphidae; 16  
Granulometría; 11, 12, 23, 24
- H**  
Hidrólisis enzimática; 55  
Homogeneización; 64, 67

Hongos; 43, 44, 46, 48  
*Hyalella Curvispina*; 3, 4

## I

*Iheringichthys Labrosus*; 11, 16, 20  
Industria alimentaria; 62  
Industria láctea; 38, 42, 54, 56  
Inmunosensores; 30  
Insecta; 16  
Isoflavonas; 62

## L

Lacasas; 45, 46  
*Lactobacillus Paracasei*; 39, 40, 42  
Las Cañas; 3 - 8, 11, 12, 15, 16, 18, 20 - 22  
Leptoceridae; 16  
Levadura; 34 - 37  
Ligninas; 44  
*Limnoperna Fortunei*; 15, 16, 19, 21, 22  
*Loricariichthys Melanocheilius*; 16  
*Lycengraulis Grossidens*; 16

## M

Macrozoobentos; 12, 16, 22  
Malformaciones; 3, 7, 8  
Materia orgánica; 4, 6, 11, 12, 16, 20  
Mecanismos antiluteolíticos; 29  
Mercurio; 19  
Metal; 3, 4, 7 - 9, 11, 19  
Metales pesados tóxicos; 19  
*Microcystis Aeruginosa*; 19, 20  
Microorganismos; 20, 38, 43 - 46, 48, 57  
Mojaras; 16  
Moluscos; 16  
Mytilidae; 16, 21, 22

## N

Níquel; 19  
Nitrógeno Kjeldahl; 5  
Nuevo Berlín; 3, 4, 6 - 8, 11, 12, 15, 16, 18 - 22

## O

Ostwald; 58 - 62  
Oxígeno; 5, 14, 19, 31

## P

*Pachyurus Bonariensis*; 16  
*Paraloricaria Vetul*; 16  
*Parapimelodus Valenciensis*; 16  
Partícula; 3 - 6, 8, 9, 23 - 26, 28, 30, 63, 64, 66, 67  
Peces; 4, 8, 11 - 13, 17 - 21, 34  
Penicilina; 39 - 41  
*Penicillium*; 43, 44, 46  
*Penicillium Chrysogenum* Thom.; 44  
*Penicillium Citrinum* Thom.; 44  
*Penicillium Variabile* Sopp.; 44  
Peroxidasas; 45, 46  
PH; 5, 30, 31, 35, 39, 40, 55, 56, 58 - 62, 67

*Phanerochaete Chrysosporium*; 44, 47  
*Photobacterium Leiognathi*; 3, 4  
*Pimelodus Maculatus*; 44  
*Pimephales Promelas*; 3, 4, 9, 10, 37, 38  
Planta de celulosa; 3, 4, 11, 12, 21  
Plástico; 34, 48, 49, 53, 67

## Plásticos; 48 - 53

Plomo; 8, 19  
Polymitrarcidae; 16  
Preñez bovina; 29, 33  
Probióticos; 38, 39, 42  
Productos alimenticios; 20, 54, 58  
Productos biotecnológicos; 44  
Proteína B; 28, 29  
PSPB; 29 - 33  
Pulpa de celulosa; 4, 11, 35, 37

## Q

Quinona; 29 - 32

## R

Residuos lignocelulósicos; 43, 44  
Río Uruguay; 3, 4, 6, 9, 11, 12, 15, 19 - 22  
Rotíferos; 15, 19, 20

## S

*Saccharomyces Cerevisiae*; 34, 35  
*Salmonella* Sp.; 39 - 42  
Sedimentos; 3 - 6, 8, 9, 12, 16, 19, 20, 23  
Soja; 3, 58 - 60, 62, 63, 65 - 68  
SSL; 63, 64, 65  
SSLC; 63, 64, 65  
STL; 63, 64, 65  
STST; 63, 64, 65  
Suero de queso; 54, 55, 57  
Suero de soja; 63, 65  
Suero de tofu; 63  
Suero lácteo; 54 - 57

## T

Tamizado; 23 - 27, 46  
Taxa; 15, 19

## Tecnología alimentaria; 54 - 68

Toxicidad; 3, 4, 7 - 9, 11, 12, 19, 20, 48

## V

Vieja; 16  
Virolito; 16  
Voltamperometría cíclica; 20, 29 - 32

## Y

Yeast Estrogen Screen; 34, 35, 37, 38

## Z

Zooplancton; 12, 15, 19 - 22

$\beta$ -estradiol; 34, 36, 37

$\beta$ -galactosidasa; 35 - 37, 55

**INN**  **TEC**



ISO 9001:2008  
NRO. 15367



ISO 9001:2008  
NRO. 15367



LATU. Centro de Información Técnica  
Avda. Italia 6201, entrepiso, Montevideo - Uruguay  
Tel. +(598) 2901 3734 ext. 1364  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
[www.latu.org.uy](http://www.latu.org.uy)  
[www.facebook.com/citein.latu](https://www.facebook.com/citein.latu)  
[citein.blogspot.com](http://citein.blogspot.com)