



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN y DESARROLLO TECNOLÓGICO (CIDeT)

Director: Ing. Andrés Ramón Linares

Revista de Ciencia Y Tecnología

CONSEJO DE DIRECCIÓN

Director: Dr. Rogelio Santos Stampella
Área Bioquímica y Farmacia: Dr. Sergio Andrés Tonon
Área Ingeniería y Tecnología: Dra. María Cristina Area
Área Genética y Biología: Dr. Alberto Sergio Fenocchio

CONSEJO DE EDICIÓN

Área Genética y Biología:

Prof. Ing. Fernando Dulout - U.N. La Plata
Ing. Aveliano Fernández - U.N.N.E.
Dr. Juan L. Santos - U. Comp. de Madrid
Dr. Carlos M. Abatte - PROIMI. Tucumán
Dr. Marcelo Cabada - U.N. Rosario
Dr. Alfredo Recca - Sec. Rec. Nat. y D.S.
Lic. Beatriz A. de Avanza - U.N.N.E.
Dr. Edgardo Romero - U.B.A.
Dr. Claudio J. Bidau - U.N. Misiones
Dr. Mario A. Poli - CNIA-INTA. Castelar

Área Bioquímica y Farmacia:

Dra. Regina de Wikinski - U.B.A.
Dr. Ramón de Torres - U.B.A.
Dr. Eduardo Ercoli - U. N. Cuyo
Ing. Federico Emiliani - INALI. S. Fe
Dra. María M. Elías - U.N. Rosario
Dra. Clara E. López - U.N. Rosario
Dr. Alfredo Zurita - U.N.N.E.

Área Ingeniería y Tecnología:

Dra. Stella Maris Alzamora - U.B.A.
Dra. María A. Tessi - U.N. Litoral
Dr. Roberto Rossi - U.N. Córdoba
Dr. Rodolfo H. Mascheroni - U.N. La Plata
Ing. Martín J. Urbicain - PLAPIQUI. U.N. Sur. CONICET
Ing. José F. Haddad - Fac. Engenharia. SANIPLAN. R. J. Brasil
Ing. Gloria del Carmen Plaza - U.N. Salta
Ing. Roberto Melos - U. de Concepción. Chile
Dr. Jorge Bessone - U.N. Sur. CONICET
Dr. Carlos E. Schvezov - U. N. Misiones
Ing. Hugo E. Poncino - IMAE. U.N. Rosario

Esta Revista es un servicio del CIDET. Está prohibida su venta a terceros como también la reproducción total o parcial con fines comerciales. Los trabajos presentados han sido aceptados para su publicación por el Consejo de Dirección y el Consejo de Edición. La Revista no se hace responsable de las opiniones contenidas en los artículos, siendo de responsabilidad exclusiva de los autores de los mismos. La edición de la Revista cuenta con el apoyo económico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales y la Fundación Fac.Cs.Ex.Qcas. y Naturales.

Toda correspondencia relacionada a la Revista, debe ser dirigida a: Sr. Director del CIDeT / Félix de Azara 1552 / 3300 POSADAS. Misiones. Rep. Argentina / Teléfono: 54 - 3752 - 422186 - Fax: 54 - 3752 - 425414- E-mail: cidet@fceqyn.unam.edu.ar



EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

San Luis 1870 - C. P. 3300

Posadas - Misiones - Telefax (03752) 428601

Diseño: Sergio Manela

Armado de interiores y cubierta: Francisco A. Sánchez

Revisión de texto: Hedda Giraudo

Revisión de texto en inglés: Cristina E. Mayol, M. A.

Hecho el depósito de la Ley 11723

Impreso en Argentina

ISSN: 0329-8922

Revista de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE

5

AÑO 5 / Nº 5 / 2003

- 5 EDITORIAL
- 6 BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Presencia de micotoxinas en granos y raciones para cerdos / Knass, P. S.; Klein, P. A.; Marucci, R. S.
- 12 Determinación de la sensibilidad de *Streptococcus pneumoniae* a penicilina por técnica de difusión. Comparación de dos métodos / von Specht, M. H.; Grenon, S. L.
- 17 INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
Caracterización de barros industriales para su uso como fertilizante orgánico / Ruda, Ester; Ocampo, Ester; Acosta, Adriana; Mongiello, Adriana; Contini, Liliana.
- 24 Monómeros aromáticos hallados en los licores residuales y recuperados del pulpado hidroalcohólico de *Eucalyptus grandis* / Núñez, Carlos Eduardo.
- 29 Blanqueo en dos etapas de pulpas quimimecánicas industriales / Area, M. C.; Felissia, F. E.; Barboza, O.M.
- 40 Comparación del blanqueo en una y dos etapas de pulpas quimimecánicas industriales / Area, M. C.; Felissia, F. E.; Barboza, O. M.
- 48 GENÉTICA Y BIOLOGÍA
Cambios hemáticos atribuibles al *gospol* en terneros destete suplementados con semilla de algodón / Coppo, J. A.; Coppo, N. B.
- 57 Fluctuaciones fisiológicas de los niveles lipídicos en sangre de *rana catesbeiana* (Shaw, 1802) / Coppo, N. B.; Coppo, J. A.; Fioranelli, S.A.
- 67 INVESTIGACIONES EN CURSO
- 70 NORMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA PUBLICACIONES

P

PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN GRANOS Y RACIONES PARA CERDOS

^{1,2}Knass, Patricia S / ¹Klein, Patricia A. / ¹Marucci, Raúl S.

¹Laboratorio de Análisis Micológico y Micotoxinas en Alimentos (LAMMA) - Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Mariano Moreno 1375, (3300), Posadas, Misiones, Argentina. TE: 03752-427687. FAX: 03752-435118.

²Centro de Investigación en Micotoxinas (CIM) - Universidad Nacional de Luján.

Correspondencia: E-mail: patrisk@fceqyn.unam.edu.ar

MYCOTOXINS PRESENCE IN GRAINS AND SWINE FEEDS

Experiments were conducted to determine the levels of contamination of feed diets and feedstuffs for swine with Aflatoxins and Zearalenone. During a three-months period, 11 feedstuff samples and 5 samples of starter swine feed were obtained. The BF Method modified with toluene for two mycotoxins extraction was used. Determination and semi-quantification of mycotoxins was carried out by TLC, spotting samples extracts and known concentration standards in silica-gel plates, which were later observed and confirmed under UV light. In starter swine feed, a mean of 16,8 ppb of Aflatoxins and 620 ppb of Zearalenone were found. The corn grains presented the highest values in contamination with both mycotoxins. The average of Aflatoxins was calculated in the whole feedstuffs and a value of 18 ppb was obtained, while the value for Zearalenone was 527 ppb. Although the average values of both mycotoxins in the feeds are low, variations to be found in the feedstuffs should be periodically controlled, so as to reduce to the minimum the contamination of manufactured feeds.

KEY WORDS: mycotoxins, swine, feeds, feedstuffs.

Se realizaron experiencias a fin de determinar los niveles de contaminación de alimentos balanceados y materia prima para la elaboración de raciones para cerdos con Aflatoxinas y Zearalenona. Se obtuvieron, en un período de tres meses, 11 muestras de materia prima y cinco muestras de raciones de tipo "Iniciador". Para la extracción de las dos micotoxinas, se utilizó el Método BF modificado con tolueno. La determinación y la semi-cuantificación de las micotoxinas se realizó mediante TLC, sembrando los extractos de las muestras y patrones de concentración conocida en placas de sílica-gel, que luego se observaron y confirmaron bajo luz UV. En las raciones se encontró Aflatoxinas con un valor medio de 16,8 ppb y de 620 ppb de Zearalenona. El maíz en grano presentó los valores más altos de contaminación con ambas micotoxinas. Se calcularon los promedios para Aflatoxinas en toda la materia prima y se obtuvo un valor de 18 ppb, y para la Zearalenona de 527 ppb. Si bien los valores promedios de ambas micotoxinas en las raciones son bajos, se deben controlar en forma periódica las variaciones que pueden hallarse en la materia prima, para proceder de tal manera de reducir al mínimo la contaminación de los alimentos elaborados.

PALABRAS CLAVES: micotoxinas, cerdos, alimentos balanceados, granos.

ABSTRACT

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Se estima que cada año, el 25% de las cosechas mundiales están afectadas por micotoxinas. Estas toxinas de origen fúngico son producidas principalmente por los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* [1]. Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos en respuesta a factores de estrés que actúan sobre éstos [2]. Rara vez se encuentra en forma aislada un solo tipo de hongo o micotoxina, y dos o más micotoxinas pueden ejercer un mayor efecto tóxico que cada una por separado, es decir que sus acciones se sinergizan [3, 4].

La presencia de micotoxinas en granos y raciones, cuyo tipo o estructura química depende del desarrollo de cepas fúngicas específicas, está sujeta a la influencia de factores ambientales como humedad del sustrato y temperatura ambiente, además del método de procesamiento o producción, almacenamiento y tipo de sustrato [5].

Entre las micotoxinas que más afectan a los cerdos en las regiones subtropicales, prevalecen a) Aflatoxinas, b) Zearalenona, c) Vomitoxina y d) Fumonisin. Con respecto a esta dos últimas, aún no se han realizado estudios en la región Nordeste de la Argentina.

Las Aflatoxinas, tipo B₁, B₂, G₁ y G₂ son producidas principalmente por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, que son de distribución universal y muy frecuentes en las raciones y en el maíz. Casi todas las raciones permiten un aislamiento en laboratorio de estos hongos, lo que equivale a decir que prácticamente la totalidad son susceptibles de presentar un crecimiento descontrolado de estos microorganismos, en caso de presentarse las condiciones adecuadas de humedad. La temperatura ideal para su crecimiento es de 28°C, pero son microorganismos poco exigentes en este término, y pueden desarrollarse desde los 18°C hasta los 40°C aproximadamente. Contando con una temperatura óptima y un sustrato adecuado, por ejemplo maíz, estos hongos necesitan solamente cinco a siete días para producir concentraciones altas de aflatoxinas si la humedad del producto fuera al menos del 18% [6].

Las Aflatoxinas son las micotoxinas de mayor influencia en la performance porcina. El efecto del consumo de raciones contaminadas en este aspecto depende de la edad y la salud del animal, los niveles de concentración de toxina en el alimento, y el período de ingesta del mismo. Los cerdos jóvenes son los más afectados. Bajos niveles de Aflatoxinas (20 a 200 ppb) ejercen acciones inmunosupresoras, tornando al animal más susceptible a las infecciones y reduciendo la ganancia de peso, afectando la conversión alimenticia; cuando la exposición es prolongada, puede presentarse cáncer, daño hepático e

ictericia. Altos niveles de contaminación (1.000 a 2.000 ppb) producen aflatoxicosis aguda, provocando la muerte del animal en pocas horas, con daño hepático evidente y hemorragias, (ver Tabla 1) [7]. En la leche de las cerdas se puede encontrar Aflatoxina M₁ cuando consumen raciones medianamente contaminadas, y esto puede producir disminución del desarrollo y mortandad en los lechones.

Otra toxina muy común en las raciones para cerdos es la Zearalenona producida principalmente por *Fusarium graminearum*, pero otras especies también la pueden producir: *F. sporotrichioides*, *F. roseum* y *F. culmorum*. Esta micotoxina tiene efectos similares a la hormona femenina estrógeno y puede inducir a la feminización aun cuando se encuentre en bajas concentraciones. Estas especies poseen características peculiares de exigencia en lo que respecta a la temperatura de desarrollo, necesitando de 24°C a 28°C para un crecimiento óptimo, pero de 14°C a 17°C para la síntesis de Zearalenona. Esto hace que la toxina aparezca en los alimentos susceptibles en los períodos fríos en que hay oscilación de la temperatura, como ser la fase entre otoño e invierno y cuando se presentan temperaturas más cálidas en el invierno. Cuando los índices de humedad son adecuados, el hongo crece abundantemente en la semana de calor, y en la semana siguiente, cuando disminuye la temperatura, comienza a sintetizar la toxina contaminando el alimento [6]. Altas concentraciones interfieren con la ovulación, concepción, implantación y desarrollo fetal. En los no-natos, puede aumentar el número de abortos y fetos mortinatos, los lechones nacidos pueden presentar baja probabilidad de sobrevivencia o vulva hinchada [8]. Las hembras jóvenes son las más sensibles: concentraciones bajas pueden conducir a un pseudoestro y prolapso rectal o vaginal. Cuando las hembras pre-púberes consumen raciones contaminadas con Zearalenona presentan la vulva hinchada y enrojecida, con un pico evidente luego de las seis semanas del comienzo de la ingesta, y esto causa un alto índice de prolapso vaginal. En los jóvenes reproductores puede producirse disminución de la libido y disminución del tamaño testicular, pero no hay consecuencias evidentes de intoxicación en los reproductores adultos, aun en concentraciones altas [9]. En los capones, que consumen alimento para terminación, las concentraciones altas afectan muy poco la conversión alimentaria.

Algunos países, como ser Brasil y la Unión Europea, tienen especificaciones acerca de los niveles máximos recomendados de Aflatoxinas y Zearalenona, para las materias primas destinadas a la elaboración de alimentos balanceados, y raciones completas para cerdos [10]. (Ver Tabla 1).

Tabla 1: niveles de concentración máxima de micotoxinas presentes en raciones y materia prima para ganado porcino establecidos por la Unión Europea

Niveles de Aflatoxinas y Zearalenona aceptados para materia prima destinada a la elaboración de raciones	
Aflatoxinas	50 ppb
Zearalenona	1.000 ppb
Niveles de Aflatoxinas y Zearalenona aceptados en raciones para cerdos	
Aflatoxinas	20 ppb
Zearalenona	500 ppb

El objetivo de este estudio fue determinar los niveles de contaminación por Aflatoxinas y Zearalenona, en muestras de materia prima destinada a la manufactura de alimentos balanceados para cerdos y raciones de tipo Iniciador que se elaboran y consumen en la provincia de Misiones, debido a las características climáticas que favorecen el desarrollo de los géneros fúngicos potencialmente micotoxigénicos y la producción de toxinas por los mismos en esta región de la Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La obtención de la muestra se resolvió con el método propuesto por GIPSA-USDA (Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration – United States Department of Agriculture) [11], tomando las muestras en distintos puntos de los silos, utilizándose para ello una sonda de profundidad, lográndose una muestra global de 5 kg, que por cuarteo se redujo a 500 g, que fue lo recibido en el laboratorio. Cada muestra de materia prima correspondió a un nuevo lote adquirido por la empresa fabricante de las raciones provenientes de distintos puntos del país, durante un período de tres meses; en total fueron 11: siete de maíz en grano (MG), dos de *pellets* de soja (PS), uno de afrechillo de trigo (TA) y una de soja desactivada (SD).

Las muestras de alimentos, en total cinco, correspondieron una a cada nuevo lote de raciones de tipo “Iniciador”, elaborado con la materia prima analizada.

Extracción y análisis de las micotoxinas

Se procedió a la extracción de las Aflatoxinas y Zearalenona, utilizando el método BF modificado con tolueno [12, 13]. Cada muestra recibida en el laboratorio se molió con un molino de martillos hasta alcanzar una granulometría de 20 mesh, luego se tomaron 50 g del material molido y se mezclaron, en un vaso de precipitado de 500 ml, con 250 ml de una solución metanol-agua

(55:45), 100 ml de hexano y 4 g de cloruro de sodio, sometiéndose a agitación con un agitador de paletas durante 10 minutos; una vez cumplido el tiempo, se procedió a filtrar con un embudo y papel de filtro; se separaron las dos fases, y se recogieron 25 ml de la fase acuosa, que se colocó en una ampolla de decantación donde se realizaron dos extracciones sucesivas con 25 y 12 ml de tolueno respectivamente, y se recogió la fase orgánica en un vaso de precipitado, pasando a través de un lecho de sulfato de sodio anhidro, se colocó la fase del tolueno en un balón y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a 80°C. El residuo seco se resuspendió en 200 µl de benceno-acetonitrilo (98:2) y se sembró 10 µl en una placa de sílica gel 60 con base de aluminio. También se sembraron patrones de Aflatoxina B₁ y Zearalenona de concentración conocida, y se desarrolló la Cromatografía en Placa Delgada (TLC), utilizando cloroformo-acetona (90:10) como solvente de corrida. Una vez retirada la placa de la cuba, se dejó secar y se procedió a observarla bajo una lámpara de luz UV.

Identificación de los analitos

La identificación de las micotoxinas se efectuó comparando el Rf de los patrones con las muestras bajo la luz UV. La Aflatoxina B₁ aparece con fluorescencia azul vista con UV onda larga con un Rf de 0,3, la Zearalenona aparece con fluorescencia verde vista con UV onda corta, con un Rf de 0,5. Para la confirmación, se agregó ácido sulfúrico al 30% sobre los *spot* sospechosos de Aflatoxina B₁; la fluorescencia viró del azul al amarillo. Para confirmar la Zearalenona se agregó con una pipeta, a las manchas sospechosas, una solución de cloruro de aluminio en etanol, y se examinó la placa con UV onda larga; la Zearalenona apareció con fluorescencia azul [12].

Cuantificación de los niveles de micotoxinas presentes en las muestras

Se comparó la intensidad de la fluorescencia de la muestra con los patrones y se aplicó la siguiente fórmula

la (AOAC) [12]:

$$\text{concentración toxina } (\mu\text{g} / \text{kg}) = \frac{V_s \times C_s \times V_f}{V_m \times P}$$

Vs: μl de estándar igual al desconocido.

Cs: concentración de estándar en mg / ml .

Vf: volumen en μl de la disolución final del extracto.

Vm: μl del extracto cuya fluorescencia coincide con Vs.

P: gramos de la muestra original en el extracto final.

De esta forma se obtuvieron los resultados de concentración de Aflatoxina B₁ y Zearalenona expresados en partes por billón (ppb = $\mu\text{g}/\text{kg}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación de la materia prima

Los niveles de contaminación encontrados en los distintos tipos de materia prima utilizados para la elaboración de las raciones variaron, como era de esperar, según el tipo de sustrato.

En la Figura 1 se observan los resultados obtenidos para ambas micotoxinas, expresados en partes por billón (ppb). Se puede observar que la mayor concentración de Zearalenona y Aflatoxina B₁ se presentó en las muestras de maíz en grano. Dos de las muestras de MG presentaron altas concentraciones de Zearalenona, 1.200 y 1.600 ppb, y en una tercera muestra de MG se registró una concentración de Aflatoxina B₁ de 96 ppb, también considerada elevada. No se detectaron Aflatoxinas en las muestras de *pellets* de soja, afrechillo de trigo y soja desactivada. En TA y SD tampoco se determinó la presencia de Zearalenona.

Contaminación de las raciones

Las raciones elaboradas en un período de tres meses, utilizando los lotes analizados de materia prima, exhibieron los niveles de contaminación presentados en la Figura 2 (ver Tabla 2).

Debido a que las raciones para el ganado porcino se formulan utilizando un 75% de maíz, esta es la principal materia prima que debe tenerse en cuenta para la vigilancia de los niveles de micotoxinas. Se calculó el promedio para ambas micotoxinas en las muestras de maíz en grano

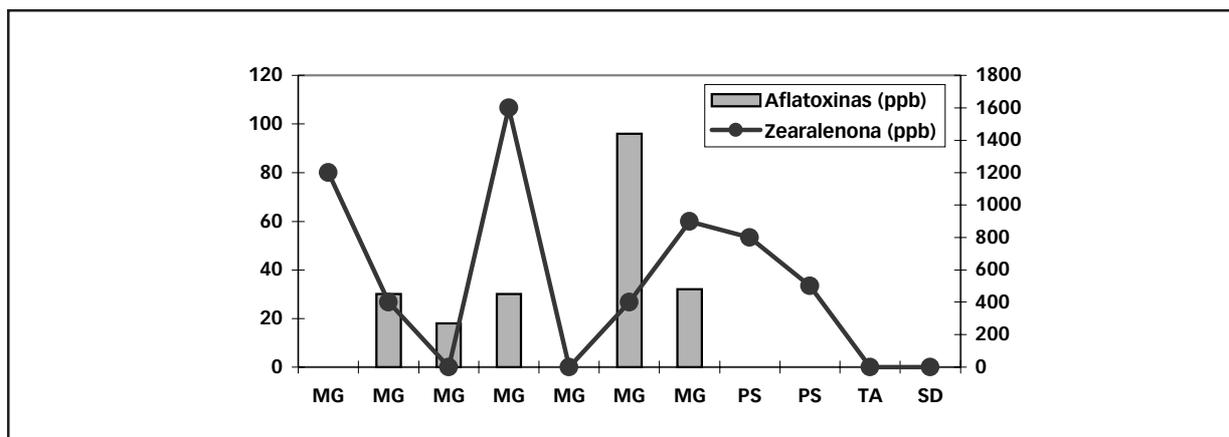


FIGURA 1: concentración de Aflatoxina B₁, (eje izquierdo) y Zearalenona (eje derecho) hallados en la materia prima.

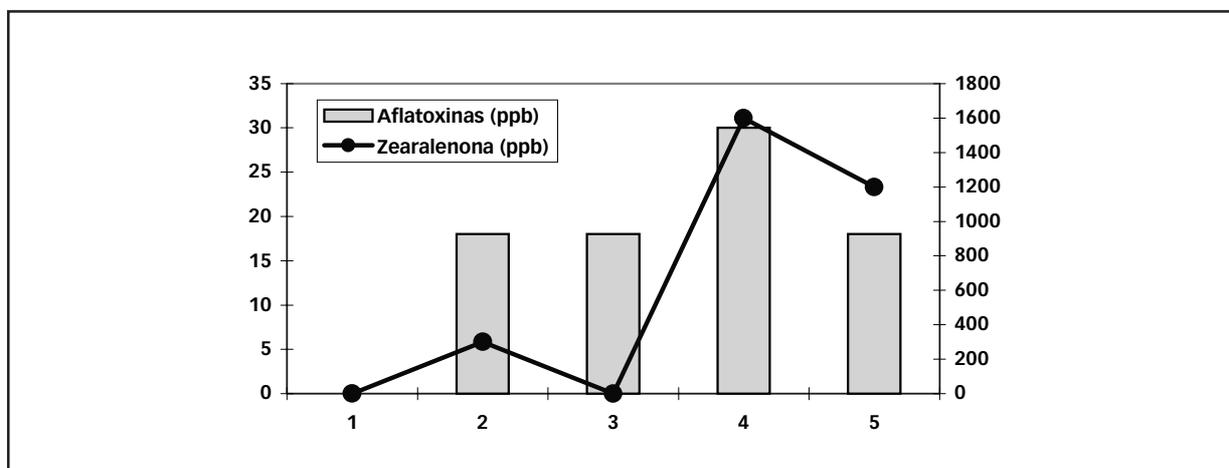


FIGURA 2: concentración Aflatoxina B₁, (eje izquierdo) y Zearalenona (eje derecho) en raciones de tipo "Iniciador".

y se obtuvo un valor de 18 ppb de Aflatoxina B₁ y 470 ppb de Zearalenona (ver Tabla 2).

Se puede observar que solamente en uno de los lotes analizados de las raciones no se detectó contaminación con las micotoxinas analizadas. Una de las muestras presentó niveles considerables de Aflatoxina B₁ (30 ppb) y Zearalenona (1.600 ppb), y otra exhibió un nivel elevado de Zearalenona solamente.

CONCLUSIONES

Los niveles de contaminación hallados en general, demostraron que la ocurrencia varía de lote a lote, tanto de materias primas como de las raciones completas; además son valores que se encuentran por debajo de los máximos permitidos excepto en unos pocos casos, si se los considera en forma individual, y si tenemos en cuenta los valores medios, para los dos casos, estos se consideran

aceptables para ambas micotoxinas, tanto en el maíz como en las raciones completas (ver Tablas 1 y 2).

No podemos, por lo expresado anteriormente, dejar de considerar la importancia de haber encontrado micotoxinas en las muestras analizadas, por lo que se sugiere lo siguiente.

-Examinar en forma periódica las variaciones de los niveles de micotoxinas que pueden hallarse en la materia prima, para proceder de tal manera de reducir al mínimo la contaminación de los alimentos elaborados.

-Controlar las raciones, para disminuir las pérdidas económicas por los efectos de las micotoxinas en la producción porcina, debido a que la contaminación con múltiples toxinas produce efectos sinérgicos, aumentando así el riesgo productivo.

-Un adecuado manejo de materia prima y raciones, para evitar un aumento en las concentraciones de micotoxinas en silos y comederos.

Tabla 2: resultados de los análisis de las muestras de materias primas y raciones iniciador

Materia Prima		
Muestra	Aflatoxina B1 (ppb)	Zearalenona (ppb)
1. MG	0	0
2. MG	30	400
3. MG	18	0
4. MG	30	<u>1600</u>
5. MG	0	0
6. MG	<u>96</u>	400
7. MG	32	900
Promedio contaminación Maíz	18	470
8. PS	0	800
9. PS	0	500
10. TA	0	0
11. SD	0	0
Raciones "Iniciador"		
Muestra	Aflatoxina B1 (ppb)	Zearalenona (ppb)
1	0	0
2	18	300
3	18	0
4	<u>30</u>	<u>1600</u>
5	18	<u>1200</u>
Promedio contaminación raciones	16,8	620

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de trabajo del “Laboratorio Central” de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones: Ing. Nicolás Kolb, Ing. Darío Ferreyra, Ing. José Luis Herrera por su valiosa colaboración y préstamo de sus instalaciones para la realización de este trabajo. ●

REFERENCIAS

1. **Devegowda, G.; Radu, M. V. L. N.; Nazar, A.; Swamy, H. V. L. M.** *Mycotoxin Picture Worldwide: Novel Solutions for their Counteraction* En *Proceedings of Alltech's 14th Annual Symposium*. Biotechnology in the Feed Industry. Passport of the Year 2000. Nottingham University Press, U.K. p: 241-255, 1998.
2. **Osweiler, G. D.** *Mycotoxins* En *Diseases of Swine*. 7th Edition, Wolfe Publishing, London. p: 735-743, 1992.
3. **Pasteiner, S.** *Coping with Mycotoxin Contaminated Feedstuffs*. *Feed Int.* Mayo 1997: p. 12-16.
4. **Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.** *Mycotoxins in Pigs Feeds 1: Source of Toxins, Prevention and Management of Mycotoxicosis*. *Irish Vet. J. Ireland Vol 54 (3)*: p. 117-120, Marzo 2001.
5. **Santurio, J. M.** *Micotoxinas e Adsorventes em Suínos*. Trábalhos Técnicos Exclusivos Porkworld. www.porkworld.com.br.
6. **Fiorentin, L.** *As micotoxinas e a produção de suínos*. *Suinocultura dinámica*. EMBRAPA-CNPSA. Año II – N° 10. Octubre 1993.
7. **Diekman, M. A.; Coffey, M. T.; Purkhiser, E. D.; Reeves, D. E.; Young, L. G.** *Mycotoxins and Swine Performance*. PIH-129, Nutrition. Purdue University. Cooperative Extension Service. West Lafayette, Indiana, USA. 1992.
8. **Vanyi, A.; Bata, A.; Glavits, R.; Kovacs, F.** *Perinatal Oestrogen Syndrome in Swine*. *Acta Vet. Hungarica* 42:433-416. 1994.
9. **Lawlor, P. G.; Lynch, P. B.** *Mycotoxins in Pigs Feeds 2: Clinical Aspects*. *Irish Vet. J. Ireland Vol 54 (4)*: p. 172-176, Abril 2001.
10. **Fao Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995–A. Compendium**. Food and Nutrition Paper, No. 64, Roma, 1997.
11. **USDA**. Grain Fungal Diseases & Mycotoxins References: Sampling. GIPSA, Technical Services Division. Internet on-line. Kansas City, USA. p. 24-29. 1999.
12. **AOCS-AOAC 970.45 BF Method**. Official Methods of Analysis of the AOAC. 16th Edition. Section 49.2.09 (AOAC Method 970.45) 1991.
13. **Chulze, S.; Bertinetti, C.; Dalcero, A.; Etcheverry, M.; Farnochi, C.; Torres, A.; Rizzo, I.; Varsavsky, E.** *Incidence of Aflatoxin, Zearalenone and Deoxynivalenol on Corn in Argentina*. *Mycotoxin Research*, vol 5: p 9-12. 1989.



DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* A PENICILINA POR TÉCNICA DE DIFUSIÓN. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS

von Specht, M. H. / Grenon, S. L.

Especialidad en Microbiología Clínica. Cátedra de Práctica Hospitalaria y Deontología. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (Universidad Nacional de Misiones). Hospital Provincial de Pediatría de Misiones. marthatovs@yahoo.com.ar

Streptococcus pneumoniae PENICILLIN SUSCEPTIBILITY BY DIFUSION TECHNIQUE. COMPARISON OF TWO METHODS

Pneumococcal Infections caused by drug-resistant strains are an increasing problem requiring the adoption of control strategies and campaigns to promote judicious use of antibiotics.

To screen for pneumococcal penicillin resistance using the Kirby-Bauer disc technique with oxacillin impregnated discs, the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommends Mueller Hinton Agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood (MHSO).

Since that supplement is not accessible for many laboratories, routine antibiotic sensitivity tests are not performed in many hospitals, and thus empirical therapy could be inappropriate.

The aim of this research is to compare two in vitro disk diffusion techniques to determine *Streptococcus pneumoniae* penicillin susceptibility.

Seventy four strains were used in this study. The technique and the interpretative breakpoint were in accordance with NCCLS criteria for both methods run in parallel, except for the use of 5% serologically typed human blood as supplement to MH agar in the alternative method (MHSB).

The results were adjusted to a straight line, and they were significant ($p < 10^{-4}$). Confidence limits at 95% are 0.959 and 0.167 including value 1. If the breakpoint suggested by NCCLS (20 mm) is changed to 22 mm for MHSB technique, the probability of wrongly considering a strain penicillin resistant, decreases in a 2.4% (2.5 to 0.1%).

Even though a confirmation by the reference technique is required, low complexity laboratories could adopt this accessible screening method.

KEY WORDS: *Streptococcus pneumoniae* - oxacillin - difussion.

ABSTRACT

RESUMEN

Las infecciones por neumococos resistentes constituyen un problema creciente que exige medidas de control, y campañas para promover el uso racional de los antibióticos.

Para establecer la sensibilidad a penicilina (PEN) por difusión, según Kirby Bauer, el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda la utilización de Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero al 5% (MHSO). Como este suple-

mento no resulta fácilmente accesible, muchos laboratorios no efectúan esta determinación y se recurre a terapias empíricas a veces inadecuadas.

El objetivo del trabajo fue realizar una comparación entre dos medios de cultivo aplicados al método de difusión para la determinación de la sensibilidad a penicilina de *S. Pneumoniae*, utilizando discos de oxacilina.

Se efectuó el estudio en paralelo a 74 cepas. Se siguieron las normas del NCCLS para el desarrollo de la técnica e interpretación de los halos obtenidos, siendo la única variable el suplemento con sangre humana (serológicamente controlada) al 5% como método propuesto (MHSB).

Los resultados se ajustaron a una línea recta, siendo el mismo significativo con $p < 10^{-4}$. Los límites de confianza al 95% son 0,959 y 0,167 que incluyen al valor 1. Con una corrección en el valor de corte recomendado por NCCLS de 20 mm para interpretar como sensible a una cepa, a 22 mm para el método alternativo propuesto (MHSB), se logró reducir en un 2,4% (de 2,5 a 0,1%) la probabilidad de considerar susceptible en forma errónea a una cepa penicilino-resistente.

Si bien ambos métodos requerirían confirmación por métodos de dilución (CIM), sería factible su uso como técnica de tamizaje, tomando como valor de corte 22 mm, pudiendo ser desarrollado en laboratorios de baja complejidad de nuestra provincia.

PALABRAS CLAVES: *Streptococcus pneumoniae* - oxacilina - difusión.

INTRODUCCIÓN

Streptococcus pneumoniae es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Es agente etiológico de meningitis, bacteriemia con o sin endocarditis, sinusitis y otitis media aguda siendo el más frecuente en neumonía extrahospitalaria [1, 2, 3].

El *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* describe al género como una bacteria Gram-positiva, catalasa-negativa, facultativamente anaeróbica de forma esférica u ovoide de unas 2 μm de diámetro [4].

Los neumococos pueden presentar cápsula o estar desprovistos de ella. Su forma más característica es lanceolada, pueden formar cadenas cortas o estar aislados. En medio líquido, la mayor parte de las cepas capsuladas presenta un crecimiento difuso, mientras que las no capsuladas muestran un crecimiento granular.

Son nutricionalmente fastidiosos, requieren un medio enriquecido para crecer, y atmósfera de CO_2 . Su desarrollo se favorece por la presencia de sangre en el medio. En agar sangre, crecen presentando alfa hemólisis, y colonias con depresión en el centro.

La sensibilidad a optoquina y la solubilidad en bilis de buey, permiten diferenciarlo de otros estreptococos alfa-hemolíticos [5, 4].

Desde su introducción, la penicilina (PEN) y sus derivados han constituido el tratamiento empírico de elección de las infecciones neumocócicas, debido a su excelente actividad bactericida y a las bajas concentraciones del antibiótico requeridas para inhibir la mayoría de las cepas.

Sin embargo, la incidencia mundial de patologías causadas por *S. pneumoniae* con distintos grados de re-

sistencia a penicilina (PEN-R) y a otros agentes antimicrobianos, ha aumentado significativamente a partir de 1970 y en particular en las últimas décadas [6].

Esto ha hecho difícil la elección de la terapia empírica para las infecciones invasivas [7].

En nuestro país, la resistencia global a penicilina es de alrededor de 20%, con variaciones según la zona geográfica considerada [8].

El mecanismo de resistencia de *S. pneumoniae* a los antibióticos beta-lactámicos es cromosómico y se expresa con múltiples cambios en las proteínas ligadoras de penicilina (PLP), permaneciendo como uno de los pocos patógenos a los que nunca se ha descrito producción de beta-lactamasas [1, 2, 8].

Para realizar una correcta terapia antibiótica, se requiere el aislamiento, identificación y la determinación de la sensibilidad del agente etiológico en el laboratorio. *S. pneumoniae* aislados de sangre, LCR, y otros sitios normalmente estériles del organismo deben ser examinados en forma rutinaria para la sensibilidad a la penicilina, como también las cepas provenientes de tratamientos fallidos.

Si bien el método patrón para estos estudios es la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM, de dilución), el método de difusión (más sencillo en su realización) permite determinar la sensibilidad a PEN y a otras drogas [9].

Para llevar a cabo esta técnica, el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) recomienda –para predecir la sensibilidad a penicilina– la utilización de agar Mueller Hinton suplementado con sangre de oveja al 5%, discos de oxacilina e incubación en atmósfera de CO_2 .

Halos de 20 mm o mayores son considerados sensibles, halos menores o iguales a 19 mm son considerados resistentes, debiendo confirmarse mediante métodos de dilución el grado de tal perfil [9, 10].

El éxito de una terapia depende del nivel de resistencia y del sitio de la infección [5].

La participación del laboratorio de microbiología en la detección de las cepas resistentes, resulta de crucial importancia para el tratamiento correcto de las infecciones por neumococos.

Debido al costo implicado en la ejecución de la técnica oficialmente recomendada, la mayoría de las veces está fuera del alcance de algunos laboratorios. La falta de estas determinaciones lleva a terapias empíricas con drogas de mayor espectro y costo. Muchas veces innecesarios, estos tratamientos podrían facilitar la aparición de mayor número de cepas resistentes.

Con el fin de brindar un apoyo a los laboratorios de bajos recursos de la provincia, mediante la sugerencia de un método de *screening* alternativo, y contribuir a un uso racional de los antibióticos, se ha encarado el presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 74 cepas consecutivas y no relacionadas, aisladas de líquido cefalorraquídeo (LCR), líquidos pleurales (LPP), hemocultivos (HEMO), líquido ascítico (LA), y otros líquidos de punción de pacientes pediátricos (>1 mes y < de 14 años) que fueron internados por diferentes patologías en el Hospital Provincial de Pediatría de Misiones, en el período comprendido entre el 1/6/1998 al 30/6/2000.

Las muestras se inocularon en placas de agar sangre (AS), agar chocolate (Ach), caldo tioglicolato, caldo sangre. La incubación se efectuó en atmósfera de CO₂ al 5% a 35 – 37°C durante 24 – 48 horas.

Los microorganismos aislados se caracterizaron por morfología directa (coloración de Gram), y de las colonias, hemólisis alfa, reacción catalasa (portaobjetos) y sensibilidad al disco de optoquina [1, 6, 11].

Las cepas fueron enviadas al Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI - ANLIS) Dr. Carlos G. Malbrán, para su confirmación de especie y determinación del serotipo y factor.

Se determinó la sensibilidad a PEN mediante el método de macrodilución en caldo recomendado por el NCCLS [9], y mediante técnica de difusión en la que se ensayaron monodiscos de oxacilina (OXA, 1ug- Britania, Argentina), y dos medios de cultivo en paralelo y bajo idénticas condiciones de trabajo:

A) Método de difusión efectuado siguiendo las recomendaciones del *National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*: MHSO (Agar Mueller Hinton suplementado con sangre ovina al 5% - Laboratorios Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina).

B) Método alternativo: MSHH (Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%).

La única variable propuesta a tal efecto es la utilización de sangre humana anticoagulada serológicamente apta obtenida de donantes voluntarios, como suplemento agregado a base MH (Merck, Alemania). Se respetaron todas las demás exigencias establecidas en el documento abajo citado.

Los valores de corte, junto a la metodología empleada, se tomaron de las tablas 2G – M100 – S9: Zone Diameter Interpretative Standards and Equivalent Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* de NCCLS 2000 [9, 10].

Se consideraron errores “*minor*” a los que el método propuesto (MSHH) produjo valores diferentes al tomado como referencia en relaciones:

Sensibilidad vs Sensibilidad Intermedia,

Sensibilidad Intermedia vs Sensibilidad,

Resistencia vs Sensibilidad Intermedia, o

Sensibilidad Intermedia vs Resistencia respectivamente,

Errores *major* resultaron de considerar resistente a un aislamiento sensible con MHSO,

Errores *very major* a los que resultaron de considerar sensibles a aislamientos resistentes en MHSO.

El control de calidad se realizó utilizando la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 49619, tal como lo sugiere el NCCLS [9].

La conservación de los microorganismos se realizó mediante hisopo seco y técnica en leche descremada al 10%, a –20°C.

El programa EPI INFO versión 6 fue utilizado para la recolección y proceso de los datos, como así también de los resultados obtenidos en el laboratorio; para el análisis de estos se utilizó además el programa EXCEL. Se aplicó para la evaluación regresión lineal simple y chi cuadrada. Un valor P < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Se efectuó CIM a penicilina a 74 cepas, el 65% de estas fue sensible (CIM = o < 0.06 ug/ml), 17% presentó Sensibilidad Intermedia (CIM entre 0.12 – 1ug/ml) y 18% Resistencia (CIM= o > 2 ug/ml).

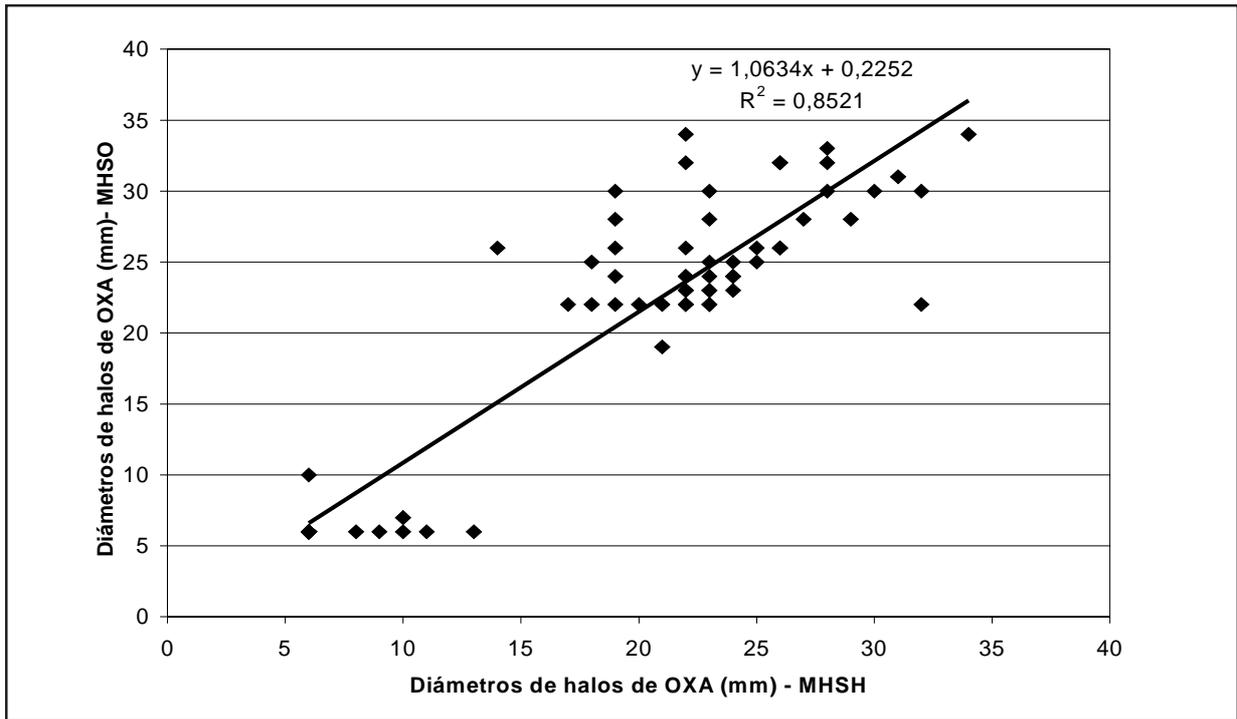


FIGURA 1: *Streptococcus pneumoniae*. Regresión lineal simple: Sensibilidad a Oxacilina por métodos de difusión en placas (MHSO eje Y, MSHH en eje X).

Todas las cepas que presentaron halo de OXA igual o mayores a 20 mm con el método de difusión recomendado fueron inhibidas por concentraciones de PEN iguales o menores a 0,06 µg/ml.

Se ensayó en paralelo la prueba de difusión para OXA utilizando MHSO y MSHH a todas las cepas.

La asociación entre ambos métodos se aprecia en la Figura 1. El diagrama de dispersión se realizó junto a la curva de regresión, siendo la pendiente $b = 1,0634$ y el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,8521$). El intervalo de confianza para 95% fue de 0,959 y 0,167.

A fin de evaluar la posibilidad del uso de MSHH con discos de oxacilina como técnica de tamizaje para definir sensibilidad por difusión a penicilina, se clasificó a

las cepas como sensibles (S) o resistentes (R) utilizando un punto de corte igual al propuesto por el NCCLS (≥ 20 mm). Con estos resultados se construyó la Tabla 1.

Para mejorar el valor predictivo de la prueba y disminuir errores *very major*, se estructuró un nuevo cuadro tomando como valor de corte para definir sensibilidad en MSHH un halo ≥ 22 mm. Con estos valores se construyó la Tabla 2.

DISCUSIÓN

La dispersión entre los resultados obtenidos por métodos de difusión para medir sensibilidad a penicilina, utilizando discos de OXA en MSHH y MHSO, permite

Tabla 1: *S. pneumoniae*. Interpretación de perfiles de sensibilidad. Comparación de métodos MSHH – MHSO con valor de corte para MSHH de 20 mm.

		MHSO		
		R	S	Total
MSHH	R	25 a	9 b EM	34
	S	1 c EVM	39 d	40
	Total	26	48	74

Referencias: MHSO: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de ovejas al 5%. MSHH: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%. Error very major: EVM. Error mayor: EM.

Tabla 2: *S. pneumoniae*. Interpretación de perfiles de sensibilidad. Comparación de métodos MSHH – MHSO con valor de corte de 22 mm para MSHH.

		MHSO		
		R	S	Total
MSHH	R	26 a	11 b EM	37
	S	0 c EVM	37 d	37
	Total	26	48	74

Referencias: MHSO: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de ovejas al 5%. MSHH: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre humana al 5%. Error very major: EVM. Error mayor: EM.

evaluar el grado de relación entre ambas variables. Los resultados se ajustaron a una línea recta, siendo el mismo significativo con $p < 10^{-4}$ (Figura 1).

Los límites de confianza al 95% son 0,959 y 0,167 que incluyen al valor 1, por lo tanto se puede decir que con ambos métodos se obtiene el mismo valor.

Analizando las Tablas 1 y 2 se puede comprobar que hay un 97,5% de probabilidad de informar como sensible una cepa PEN-S cuando el halo de inhibición utilizando MHSB es igual o mayor a 20 mm (VPN = 97,5%).

El valor predictivo negativo asciende a 99,9% al considerar el valor de corte para MHSB en 22 mm. Teniendo en cuenta esta corrección, se eliminan los errores *very major*, detectados utilizando el punto de corte anterior. Se reduce así de un 2,5% a un 0,1% la probabilidad de interpretar en forma incorrecta como sensible una cepa PEN R.

CONCLUSIONES

Si bien se requeriría la confirmación por el método de referencia (CIM) establecido en las normas NCCLS, el alto valor predictivo obtenido en los ensayos de difusión utilizando MHSB permitiría su uso como técnica alternativa para predecir sensibilidad a penicilina. La accesibilidad a la sangre humana reemplazando a la de oveja, abre una posibilidad a laboratorios de menor complejidad que, cumpliendo estrictos controles de calidad, puedan desarrollar esta importante herramienta.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo Salvi, Ramón Castillo y Élica Horodeski por su colaboración en el aislamiento original de las cepas. Al Dr. Gustavo Silva y al Ing. Miguel E. Schmalko por su aporte en la evaluación estadística. A la división Bacteriología Clínica del INEI ANLIS Malbrán por la confirmación de especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liñares, J.; Tubau, F. *Meningitis neumocócica y cephalosporinas de tercera generación*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Vol 14 (1 – 6) 1996.
2. Liñares, L.; Gracia, D.; Alonso, T. *Streptococcus pneumoniae*: Desarrollo de resistencia a los antibióticos en España. Infect. & Microbiol. Clin. Vol 1, N° 2 Jun 53 – 58. 1989.
3. López, J.; Eres, N.; Fernández, X.; Buri, M. Celulitis por *Streptococcus pneumoniae* asociada a espondilodiscitis tras cuadro de otitis media supurativa. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Vol 15 N° 3 (171– 172). 1997.
4. Ruoff, K. L.; Whiley, R. A.; Beighton, D. *Streptococcus*. En Manual of Clinical Microbiology Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. 7ª Ed. American Society for Microbiology. 1999.
5. Lopardo, H.; Hernández, C. M.; Morales, G. *Infecciones de las vías respiratorias superiores*. Módulo N° 10 Curso a distancia en Microbiología Clínica- Asociación Argentina de Microbiología Clínica – Colegio de Bioquímicos de E. Ríos. 1997.
6. Nagel, A.; Ahumada, C. A.; Mollerach, A.; Mendez, E. *Streptococcus pneumoniae: Detección de cepas resistentes a penicilina y comparación con otros antimicrobianos*. Infect. & Microbiol. Clin. Vol 8, N° 4 95 – 97. 1996.
7. Deeks, S. L.; Palacio, R.; Ruvinski, R.; Kertesz, D. A.; Hortal, M.; Rossi, A.; Spika, J. S.; Di Fabio, J. L.; and the *S. pneumoniae working group*. Risk Factors and Course of Illness among children with invasive penicilin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Pediatrics Vol 103 No 2 (409 - 413)-1999.
8. Casellas, J. M. *Neumococo penicilino resistente*. Microbiología, epidemiología, diagnóstico y tratamiento. En Stamboulian. Infectología para la práctica diaria. Ed. FUNCEI. P.73 – 93.1996.
9. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement.– Vol 19 N° 1. NCCLS. 1999.
10. Rossi, A. *Antimicrobianos*. Módulo No 4. Curso a distancia en Microbiología Clínica - Asociación Argentina de Microbiología - Colegio de Bioquímicos de E. Ríos. 1997.
11. Mandel, G. L.; Douglas, G.; Bennett, J. *Enfermedades Infecciosas. Principios y prácticas*. Tomo II. 3ª Ed. Edit. Méd. Panamericana. 1990.



CARACTERIZACIÓN DE BARROS INDUSTRIALES PARA SU USO COMO FERTILIZANTE ORGÁNICO

Ruda, Ester/ Ocampo, Ester/ Acosta, Adriana/ Mongiello, Adriana/ Contini, Liliana
Departamento de Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829. CP: 3000. Santa Fe

CHARACTERIZATION OF INDUSTRIAL SLUDGES TO BE USED AS ORGANIC FERTILIZER

ABSTRACT

The incorporation of organic fertilizers to the soil turns its structure granular and/or crumbly, thus favouring both water retention and distribution and root and microorganism breathing, and adding not only organic carbon but also other macronutrients. Industrial sludge samples -aerobically treated effluents- from a jelly factory were used. The objective of this work is to characterize those sludges with the necessary precision to allow a feasibility analysis of their use as organic fertilizers under the prevailing laws. Two spray-dried samples a week –taken at random- were analyzed during a month. Analyses (in quintuplicate) were as follows: Apparent Density, Actual Density, pH, Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Calcium and Potassium. Statistical analyses for each variable (Mann-Whitney Test, Kolmogorov-Smirnov Test, Levene Statistic and Anova) were performed in two temporal senses: a transverse (every week) one and a longitudinal (along four weeks) one. Each variable was found not to depend on the sampling place or time, sludges chemical composition being considered stable.

KEY WORDS: industrial sludges, organic fertilizer.

RESUMEN

La incorporación de fertilizantes orgánicos al suelo hace que la estructura se vuelva granular y/o migajosa, lo cual favorece la retención y distribución del agua y la respiración de raíces y microorganismos. Además, no solo se agrega carbono orgánico al suelo, sino también otros macronutrientes. Se utilizaron muestras de barros industriales provenientes del tratamiento aeróbico de efluentes de una fábrica de gelatina. El objetivo de este trabajo es caracterizar dichos barros con la precisión necesaria para posibilitar el análisis de factibilidad de su uso como fertilizante orgánico en el marco de la legislación vigente. Se analizaron dos muestras al azar por semana (provisas secas en forma *spray*), durante un mes seguido. Los análisis (quintuplicado para cada muestra) fueron: Densidad Apparente, Densidad Real, pH, Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Calcio y Potasio. El análisis estadístico de las determinaciones de cada variable se realizó en dos sentidos temporales, uno transversal (en cada semana) y otro longitudinal (a lo largo de las cuatro semanas). Los tratamientos estadísticos que se usaron fueron: Prueba de Mann-Whitney, Test de Kolmogorov-Smirnov, Estadístico Levene y Análisis de las Variancias. Se encontró que las mediciones obtenidas de cada variable no dependen ni del lugar de muestreo ni del momento en el tiempo en el que se tomó dicha muestra, considerándose que los barros se producen con una composición química estable.

PALABRAS CLAVES: barros industriales, fertilizantes orgánicos.

INTRODUCCIÓN

Los fertilizantes orgánicos tienen una proporción baja de elementos nutritivos con relación a los fertilizantes minerales, pero el aporte se hace importante por el considerable volumen aplicado. Al usar estos se debe considerar que su liberación a la solución del suelo y su incorporación a los procesos físicoquímicos del sistema suelo-planta no es inmediato, porque exige la previa mineralización de la materia orgánica. Los fertilizantes orgánicos agregados al suelo activan los procesos microbiológicos, la estructura del suelo se vuelve granular o migajosa lo que favorece la retención y distribución del agua y respiración de raíces y microorganismos [1]. También se aumenta la capacidad amortiguadora y reguladora de la temperatura del suelo [2]. La liberación lenta y progresiva es una garantía de que los elementos móviles permanezcan retenidos en el suelo, de modo que no sean lavados fácilmente [3].

La dinámica de la materia orgánica de los barros sigue pautas similares a las observadas para otros residuos orgánicos, encontrándose sujeta a diferentes factores tales como: tipo de suelo, nivel de materia orgánica original del suelo, cultivos, temperatura, humedad, pH y aireación del suelo [4].

Por otro lado conviene destacar que los barros podrían representar una fuente de micronutrientes como hierro, molibdeno y otros, que son también esenciales para los cultivos y no son aportados por los fertilizantes sintéticos al ser estos cada día más puros y de mayor concentración en macronutrientes.

Los barros obtenidos a partir del tratamiento de efluentes en un sistema aeróbico contienen una importante fracción orgánica semejante a los estiércoles animales y un nivel nada despreciable de nutrientes, por lo que se los podría emplear con fines agrícolas para compensar la pérdida de materia orgánica y de nutrientes del suelo. De este modo se conseguiría por un lado, restaurar la fertilidad de los suelos, y por otro darle salida a estos, evitando así los posibles problemas de contaminación ambiental que su acumulación plantea.

El empleo de barros aeróbicos en agricultura es de uso corriente tanto en Europa como en EE.UU. resultando su uso en un aumento de rendimiento en los cultivos. En nuestro país no se conocen antecedentes de su uso como mejorador de la fertilidad química del suelo, por lo que es necesario hacer su caracterización química precisa y determinar si los elementos químicos analizados en él están acordes con los valores límites permitidos para materiales de esta naturaleza por las normativas vigentes. El objetivo del presente estudio es la caracterización y

cuantificación de elementos químicos en barros aeróbicos provenientes de una fábrica de gelatina (a partir de cuero vacuno), generados en el tratamiento de efluentes.

Con la investigación propuesta se dispondrá en el mercado de un material que podrá ser utilizado como fertilizante orgánico (complemento de fertilizantes minerales) en un sistema convencional, o en un sistema alternativo de producción agropecuaria en franca expansión en el país: la "agricultura orgánica", como así también en la recuperación de suelos degradados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de barros aeróbicos de una planta de tratamiento de efluentes de una fábrica de gelatina. Se tomaron dos muestras al azar por semana (provisita seca en forma *spray*) durante un mes. Los análisis (quintuplicado para cada muestra) fueron: Densidad Aparente (Método de la Probeta), Densidad Real (Método del Picnómetro), Porosidad = (Densidad Real- Densidad Aparente/ Densidad Real) 100, pH 1:2,5 (Método Electrométrico), % Carbono (Método Walkley y Black), % Materia Orgánica (% Carbono x 1,72), Nitrógeno (Método Kjeldahl), Fósforo (Método colorimétrico del Azul de Molibdeno, analizando la solución clorhídrica de cenizas del barro), % Calcio (Método de precipitación con oxalato de amonio, analizando la solución clorhídrica de cenizas del barro), y % Potasio (Fotometría de llama, analizando la solución clorhídrica de cenizas del barro).

El análisis estadístico de las determinaciones de cada variable se realizó en dos sentidos temporales, uno transversal (en cada semana) y otro longitudinal (a lo largo de las cuatro semanas). Los tratamientos estadísticos que se usaron fueron: Prueba de Mann-Whitney y Test de Kolmogorov-Smirnov [5, 6], Estadístico Levene [7] y (ANOVA) Análisis de las Variancias [8]. Se adoptó un nivel de significancia de 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Tablas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados de los análisis de las muestras de barro aeróbico sólido, secado por *spray*.

El análisis transversal se hizo en primer término con el fin de determinar si las muestras de cada semana pueden considerarse estadísticamente iguales, es decir, se investigó si las mismas dependen del lugar de muestreo. Para esto se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Tabla 9), encontrándose que, en general, las muestras pueden considerarse como provenientes de la

Tabla 1: densidad aparente (gr/cm³)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
0,50	0,52	0,49	0,50	0,54	0,50	0,54	0,50
0,51	0,51	0,51	0,53	0,59	0,50	0,53	0,50
0,50	0,55	0,51	0,52	0,50	0,53	0,53	0,52
0,53	0,53	0,52	0,52	0,53	0,51	0,55	0,53
0,51	0,50	0,55	0,51	0,51	0,49	0,52	0,49

Tabla 2: densidad real (gr/cm³)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
0,88	0,90	0,88	0,90	0,89	0,88	0,88	0,89
0,90	0,88	0,89	0,90	0,88	0,91	0,88	0,89
0,91	0,90	0,91	0,91	0,90	0,87	0,89	0,90
0,87	0,88	0,91	0,91	0,88	0,91	0,90	0,88
0,91	0,91	0,88	0,92	0,92	0,89	0,89	0,91

Tabla 3: análisis de Carbono (%)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
29,15	32,15	32,33	31,42	32,28	33,10	32,75	32,27
33,08	29,25	33,05	32,75	30,03	33,08	29,16	33,10
29,70	30,50	29,83	31,20	33,08	29,84	33,08	29,43
31,04	31,42	29,95	33,04	31,14	31,50	29,25	32,03
32,75	33,01	29,10	29,91	29,10	32,75	31,42	31,09

Tabla 4: determinación de pH

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
6,90	7,00	6,90	6,90	6,90	7,00	7,00	7,00
7,00	6,90	6,90	6,90	7,00	6,90	7,00	6,90
7,00	6,90	7,00	7,00	7,00	6,90	6,90	7,00
7,00	7,00	7,00	6,90	7,00	7,00	6,90	6,90
7,00	7,00	7,00	7,00	6,90	7,00	6,90	7,00

Tabla 5: determinación de Nitrógeno (%)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
7,15	7,12	7,11	7,20	7,12	7,00	7,20	7,17
7,11	7,00	7,11	7,00	7,20	7,15	7,00	7,18
7,20	7,20	7,12	7,12	7,20	7,11	7,00	7,11
7,18	7,19	7,17	7,18	7,13	7,12	7,18	7,15
7,05	7,16	7,01	7,03	7,19	7,20	7,18	7,02

Tabla 6: determinación de Fósforo (%)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
1,00	0,95	0,96	0,95	1,00	0,99	0,96	0,97
0,95	1,00	0,95	0,99	0,97	1,00	0,96	0,95
0,96	1,00	0,99	1,00	0,98	0,97	1,00	0,99
0,99	0,96	0,99	0,97	0,97	0,98	0,99	0,99
0,97	0,99	0,97	1,00	0,98	0,95	0,98	0,98

Tabla 7: determinación de Potasio (%)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
0,37	0,36	0,37	0,37	0,35	0,35	0,35	0,38
0,37	0,35	0,36	0,37	0,36	0,37	0,36	0,37
0,36	0,36	0,37	0,36	0,35	0,36	0,36	0,36
0,38	0,37	0,39	0,36	0,36	0,35	0,34	0,35
0,34	0,37	0,33	0,37	0,36	0,38	0,37	0,37

Tabla 8: determinación de Calcio (%)

Primera semana		Segunda semana		Tercera semana		Cuarta semana	
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 1	Muestra 2
6,20	6,00	5,80	6,00	5,95	6,20	5,93	5,88
6,13	5,93	6,16	6,20	6,13	6,00	5,79	5,93
6,00	5,80	5,92	5,80	6,00	5,80	6,00	6,00
5,93	6,17	6,13	5,85	5,93	5,89	6,10	6,10
5,79	6,19	6,20	6,01	6,25	6,05	6,13	6,23

misma población ($p > 0,151$), excepto para la variable densidad aparente que, en la semana 4 de este estudio, se encontró que las determinaciones promedio de cada muestra no son estadísticamente iguales al 5% ($p = 0,032$).

La prueba precedente no se realizó para la variable pH, porque los valores obtenidos para todas las muestras y a lo largo de las cuatro semanas fueron: 6.90 y 7.00 (Figura 1).

El análisis longitudinal se realizó con el fin de determinar si la composición de los barros fue estable a lo lar-

go del tiempo del estudio. Para esto, se hizo un análisis de la varianza a un factor: "tiempo" con cuatro niveles: "semanas", utilizando en cada semana las determinaciones provenientes de las dos muestras tomadas como una. Esta técnica estadística requiere de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de las observaciones, razón por la cual, previo a él, se probó el ajuste a la normal con el test de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 10) obteniéndose que este supuesto es válido para todas las muestras ($p > 0,292$, densidad real, sem.1).

La homogeneidad de varianzas se probó con el estadístico de Levene (Tabla 11), resultando en todos los casos $p > 0,131$ (%C).

Al hacer el Anova (Tabla 12) se encontró que no hay diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones promedio de cada semana ($p > 0,574$, densidad real).

Siendo las mediciones obtenidas de cada variable las que se presentan en la Tabla 13, las mismas no dependen ni del lugar de muestreo ni del momento en el tiempo en el que se tomó dicha muestra; se considera que los barros se producen con una composición química estable, dentro de un intervalo de confianza del 95 %.

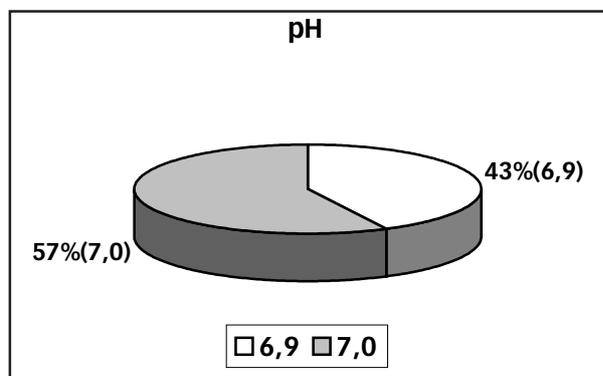


FIGURA 1: representación porcentual de los valores de pH de todas las muestras de barros en el tiempo total.

Tabla 9: valores p asociados a la prueba de Mann-Whitney

Semana	Densidad aparente	Densidad real	%C	%N	%P	%K	%Ca
1	0.548	0.310	1.000	0.841	0.690	0.690	0.548
2	0.841	0.222	0.548	0.690	0.421	1.000	0.690
3	0.151	0.841	0.310	0.222	1.000	0.548	0.548
4	0.032 ^(*)	0.421	1.000	0.841	0.841	0.222	0.841

(*) diferencia estadísticamente significativa al 5%.

Tabla 10: valores p asociados a la prueba de Mann-Whitney.

Semana	Densidad aparente	Densidad real	%C	%N	%P	%K	%Ca
1	0,894	0,292	0,985	0,893	0,686	0,681	0,618
2	0,799	0,589	0,771	0,675	0,571	0,459	0,907
3	0,650	0,814	0,905	0,803	0,911	0,509	0,967
4	0,898	0,612	0,159	0,567	0,877	0,923	0,971

Tabla 11: prueba de homogeneidad de varianzas.

Variable	Estadístico de Levene	Valor p
Densidad aparente (g/cm ³)	1,216	0,318
Densidad real (g/cm ³)	1,866	0,153
% C	2,002	0,131
% N	0,649	0,589
% P	1,878	0,151
% K	0,222	0,881
% Ca	1,109	0,358

Tabla 12: resultados del análisis de la varianza (ANOVA).

Variable	Estadístico F	Valor p
Densidad aparente (g/cm ³)	0,110	0,954
Densidad real (g/cm ³)	0,674	0,574
% C	0,554	0,649
% N	0,564	0,643
% P	0,030	0,993
% K	0,441	0,725
% Ca	0,641	0,594

CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos se puede concluir que:

I. Utilizando un intervalo de confianza del 95% para los promedios, se observa que las mediciones obtenidas de cada variable no dependen ni del lugar de muestreo ni del momento en el tiempo en el que se tomó dicha muestra; se considera que los barros se producen con una composición química estable.

II. El contenido de materia orgánica (% C X 1,72 = 53,50%) y la presencia de iones Ca (a concentraciones relativamente elevadas % 5.9875 ± 0,059) influiría positivamente sobre la formación y estabilidad de los agregados del suelo, favoreciendo la solidez de los cimientos responsables de la agregación de las partículas finas del medio edáfico, amortiguando los procesos de erosión, especialmente en aquellos suelos pesados. La riqueza de los barros en materia orgánica y su carácter coloidal mejoraría el balance hídrico del suelo, al aumentar su capacidad de retención de agua, lo que le permitiría al suelo resistir mejor los períodos de sequía [9]. Una parte importante de la materia orgánica adicionada al suelo tendería a mineralizarse, descomponiéndose en productos más sencillos; otra fracción se incorporaría al suelo evolucionando a formas más resistentes a la degradación, incrementando y modificando las sustancias húmicas del medio edáfico.

Tabla 13: valores promedio de todas las variables.

Variable	Intervalo de confianza del 95 %	
Densidad aparente	0,5188 ± 0,0063	(0,5125; 0,5251)
Densidad real	0,8995 ± 0,0069	(0,8926; 0,9064)
%C	31,103 ± 0,6791	(30,424; 31,782)
%N	7,1255 ± 0,0216	(7,1039; 7,1471)
%P	0,9775 ± 0,0055	(0,9720; 0,9830)
%K	0,3620 ± 0,0037	(0,3583; 0,3657)
%Ca	5,9875 ± 0,0590	(5,9285; 6,0465)

III. El aporte de barro (Porosidad = 42 %) aumentaría la del suelo dada la baja densidad aparente de este producto (0,5188 ± 0,0063) g/cm³. Con ello se favorecería la penetración del agua y aire, estimulándose el crecimiento del sistema radicular de las plantas [10].

IV. El barro presenta un pH neutro (6, 9, 7). Valores de pH por debajo de la neutralidad indicarían que este no se encuentra maduro y por lo tanto inadecuado para su uso agrícola. La presencia, además, de iones Ca y de sales básicas le confiere un marcado poder tampón, por lo que podría usarse como enmienda cálcica de suelos ácidos. Su aplicación a suelos ácidos produciría un aumento de pH en el suelo que por un lado estaría acorde con el pH más favorable para el crecimiento vegetal de la mayoría de las plantas, y por otro lado evitaría el riesgo de toxicidad en suelos contaminados con metales pesados, ya que al aumentar el pH del mismo disminuye la disponibilidad de ellos por pasar a formas más insolubles. Sobre suelos neutros o alcalinos este barro no provocaría cambios apreciables de pH.

V. El nitrógeno en cantidades suficientes en este barro ($7,1255 \pm 0,0216$) es el macronutriente de mayor importancia en la nutrición vegetal, puede ser absorbido por la planta en forma amónica o nítrica, pero en mayor proporción como esta última; en consecuencia, las formas orgánicas tendrán que mineralizarse para ser asimiladas por la planta. En este barro, dada la baja relación C/N= 4,4, se darían las condiciones óptimas para que se produzca la mineralización [11].

VI. El % de P de este barro es de $0,9775 \pm 0,0055$, cantidad adecuada para que se produzca su mineralización, ya que se considera que el P orgánico presente se mineraliza pasando a formas inorgánicas cuando su concentración en el material supera al 0,3% y la relación C/P es inferior a 200 (en nuestro caso la relación C/P=31,8).

VII. El barro presenta una proporción adecuada de K total ($0,3620 \pm 0,0037$). Según Cabre [12], en los barros este se encontraría fundamentalmente como cloruro y por lo tanto en forma muy soluble y fácilmente disponible para la planta.

VIII. La utilización de barros como fuente de materia orgánica no está exenta de riesgos, derivados principalmente de su contenido en metales pesados que actúan como inhibidores del desarrollo vegetal [13, 14, 15]. El proceso de obtención de este tipo de barros no permite presumir que existan metales pesados en el mismo; sin embargo, se realizará este análisis en un trabajo posterior como etapa previa al diseño de experimentos que permitirá estudiar la evolución del mismo en el suelo.

IX. La mayor o menor incorporación de los metales a las plantas dependerá de distintos equilibrios químicos, los cuales a su vez dependen del pH del suelo. Cuanto más bajo sea este, mayor será la concentración de metales en solución y por consiguiente estarán más disponi-

bles para las plantas. La movilidad de los metales pesados está determinada decisivamente por el pH del suelo, a pH ácido aumenta la movilidad del aluminio, zinc, manganeso, cobre, hierro y cobalto y a pH básico del molibdeno y del selenio. En general, en los suelos con elevada capacidad de intercambio catiónico (ricos en materia orgánica y con altos contenidos de arcilla) se asegura una cierta inmovilización de los metales pesados por quedar estos retenidos por adsorción al complejo coloidal del suelo. El grado de peligrosidad de los metales pesados va ligado a dos propiedades principales, su toxicidad y su persistencia, sin olvidar la capacidad que tienen las plantas de absorber cualquier elemento. Si estas plantas no se consumen vuelven a restituir nuevamente esos elementos al suelo en formas relativamente asimilables; por lo tanto, se verificará en el curso de los años una acumulación continua de metales pesados con posibilidad de un creciente efecto nocivo. Si por el contrario, el destino de la cosecha es para la alimentación humana o animal, el riesgo podrá ser grave o por lo menos más inmediato. Se debe destacar que, a priori, los barros analizados en este trabajo son aptos para su utilización como fertilizante orgánico. Para confirmar esa posibilidad deben realizarse las siguientes etapas que forman parte de un proyecto global de investigación:

1. Análisis cuantitativo de oligoelementos para descartar contaminación por metales pesados. Hay que tener en cuenta que la presencia natural de los metales en el suelo es en cantidades traza como productos de la propia geoquímica de los materiales de los que proceden, siendo muchos de ellos elementos esenciales para la vegetación y la fauna. El riesgo potencial que su presencia provoca se produce cuando se acumulan en grandes cantidades en el suelo.

2. Diseño de experimentos para el trabajo en campo.

3. Utilización de un campo experimental donde se sembrará soja.

4. Análisis de suelos abonados con barros y análisis de testigos.

5. Análisis de plantas desarrolladas en suelos abonados con barros y análisis de testigos

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocemos y agradecemos a la Srta. Ana Laura Pareja la invalorable colaboración en los análisis de laboratorio y recopilación de material bibliográfico. ●

REFERENCIAS

1. **Ross**, D. J. *Soil microbial biomass estimated by the fumigation-incubation procedure: seasonal fluctuations and influence of soil moisture content.* Soil Biol. Biochem. 19: p. 397-404. 1987.
2. **Power**, J.; **Dorán**, J.; **Wilhelm**, W. *Uptake of nitrogen from soil fertilizer, and crop residues by no-till corn and soil-bean.* Soil Sci. Soc. Amer. J. 50: p. 137-142. 1995.
3. **Domingues Vivancos**. *Tratado de Fertilización.* Mundi Prensa, Madrid. 1997.
4. **Alexander**, M. *Introduction to soil microbiology.* John Wiley & Sons, New York. 1980.
5. **Conover**, W. J. *Practical Nonparametric Statistics.* John Wiley & Sons, New York. 1980.
6. **Sidney**, S. *Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta.* Trillas, México. 1983.
7. **Ferrán Aranaz**, M. *SPSS para Window. Análisis Estadístico.* McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A.U. Madrid. 2001.
8. **Walpole**, R. E.; **Myers**, R. H.; **Myers**, S. L. *Probabilidad y Estadística para Ingenieros.* 6^a ed. Prentice Hall, México. 1999.
9. **Bengtson**, G. W.; **Cornette**, J. J. *Disposal of composted municipal waste in a plantation of young slash pine: Effects on soil and trees.* J. Environ. Qual., 2: p. 441-444. 1973.
10. **Banse**, H. J. *Beeinflussung der physikalischen bodeneigenschaften durchkompostgaben.* Internationale Arbeitsgemeinschaft für Müllforschung Informatiosblatt. 13: p. 30-34. 1961.
11. **Miller**, R. H. *Factors affecting the decomposition of an anaerobically digested sewage sludge in soil.* J. Environ. Qual. 3: p. 376-380. 1974.
12. **Cabre**, J.; **Arraez**, J.; **Aragoneses**, R. *Eliminación de lodos de aguas residuales. La E.D.A.R. de Reus: Un ejemplo de aprovechamiento mediante compostaje.* Química e Industria. 36: p. 537-541. 1990.
13. **Robles**, J.; **Nogales**, R.; **Esteban**, E.; **Gallardo-Lara**, F. *Poder fertilizante de un compost de basura urbana III. Efecto directo y residual sobre la asimilabilidad de Mn.* I Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, Argentina. 1984.
14. **Khaleel**, R.; **Reddy**, K. R.; **Overcash**, M. R. *Change in soil physical due to the organic waste applications.* J. Environ. Qual. 10: p. 133-141. 1981.
15. **Guiddi**, G.; **Levi-Minzi**, R.; **Riffaldi**, R.; **Giachetti**, M. *Field - Trials in Italy evaluate compost and fertilizers.* Bio-cycle. 24: p. 44-46. 1983.

M

MONÓMEROS AROMÁTICOS HALLADOS EN LOS LICORES RESIDUALES Y RECUPERADOS DEL PULPADO HIDROALCOHÓLICO DE *EUCALYPTUS GRANDIS*

Núñez, Carlos Eduardo

Programa de Investigación de Celulosa y Papel. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552. 3300.
Posadas, Misiones, Argentina. Correo electrónico: c_e_nunez@fceqyn.unam.edu.ar

AROMATIC MONOMERS IN SPENT LIQUORS OF EUCALYPTUS GRANDIS HYDRO-ALCOHOLIC PULPING

ABSTRACT

Aromatic substances of hydro alcoholic pulping spent liquors were studied to understand sub products and physical properties behavior. Spent liquor was prepared to perform a qualitative chromatographic analysis. Eighteen substances were found in the spent liquor, and twelve passed to the distilled liquor. Not all peaks were identified. Four principal substances were found in the spent liquor: sinapaldehyde, coniferaldehyde, siringaldehyde and vanillin. Derived acids of the last two compounds also appeared, and p-hydroxibenzoic acid. Siringaldehyde and vanillin were the substances mostly taken by the steam, but cinamic structure aldehydes were not found.

KEY WORDS (IPST Thesaurus): spent liquors, organosolv pulping, monomers, liquid chromatography, vanillin.

RESUMEN

La observación cualitativa de las características físicas de los licores residuales hidroalcohólicos y sus productos de recuperación, motivó a realizar un estudio de las sustancias aromáticas que contenían. A partir de un licor residual realizado *ex profeso*, se efectuó un análisis cromatográfico cualitativo del mismo y de los licores recuperados por destilación. Se hallaron dieciocho sustancias en el licor, de las cuales doce pasaron por arrastre a los destilados de la recuperación del alcohol. No se identificaron todos los picos hallados. Las cuatro sustancias principales encontradas en el licor residual fueron sinapaldehído, coniferaldehído, siringaldehído y vainillina, hallándose también los ácidos derivados de los dos últimos y el ácido p-hidroxibenzoico. Las dos sustancias principales arrastradas por el vapor fueron siringaldehído y vainillina, faltando en este caso los aldehídos de estructura cinámica.

PALABRAS CLAVES (Según el tesoro de IPST): pulpado organosolv, licor residual, monómeros, cromatografía líquida, vainillina.

INTRODUCCIÓN

Durante las operaciones de recuperación de los licores residuales de los pulpados hidroalcohólicos se observan fenómenos que llevan a suponer la existencia de sustancias aromáticas en los licores residuales. El más conspicuo es el olor propio de los destilados del proceso de recuperación del etanol, que es distinto al de este solvente puro y al del furfural que se forma durante la cocción por deshidratación de las pentosas.

Cuando se realiza dicha recuperación por un proceso de destilación simple, es decir sin rectificación, se puede observar que los destilados sucesivos van cambiando a medida que las fracciones se enriquecen en agua. Las variaciones se pueden medir de manera cualitativa por medio de reacciones específicas de las distintas funciones químicas.

Las primeras, ricas en etanol, dan solamente la reacción del furfural; pero a partir de cierto punto esta sustancia disminuye su cantidad, y comienzan a dar positivo las reacciones específicas de los productos de la degradación de la lignina, como las de los grupos siringilo y cinamilo.

Como una introducción al análisis de dichas sustancias se realizaron inicialmente algunas pruebas de separación del extracto clorofórmico de los licores residuales, por cromatografía sobre papel.

A través de ella, y utilizando diversas reacciones de color, se obtuvieron entre cuatro y seis manchas según los casos. Por medio de los patrones correspondientes, se identificaron las cuatro principales como sinapaldehído, coniferaldehído, siringaldehído y vainillina, en ese orden de concentración, que estimativamente conformaban un 90% de la superficie de las manchas separadas.

En una segunda instancia se separaron los extractos clorofórmicos por cromatografía líquida de alta performance, por la que se separaron veintidos sustancias, algunas de las cuales fueron identificadas, quedando un sesenta por ciento del área total de los picos sin reconocer.

Aunque existen trabajos realizados sobre los monómeros y oligómeros aromáticos formados en la degradación de la lignina [1–6], no se han encontrado referencias relativas a las condiciones del pulpado hidroalcohólico, es decir, temperaturas mayores de 175°C, dos a cuatro horas de cocción y baja acidez.

Tampoco se han encontrado antecedentes sobre el arrastre con vapor de dichas sustancias monoméricas, ya sea en procesos de pulpado convencionales o en los de carácter organosolv.

La caracterización y cuantificación de estos monómeros aromáticos, aparte de ser de interés como variable de proceso en sistemas donde el alcohol se recicla inde-

finidamente, pueden tener, además, importancia para la elaboración de subproductos del proceso principal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una operación de pulpado de características tomadas como tipo en un trabajo previo [7], con la que se llega a un rendimiento de 48% y un n° de kappa de aproximadamente 40, con *chips* de dimensiones reducidas de *Eucalyptus grandis*.

Las condiciones de pulpado fueron: licor conformado de agua y etanol azeotrópico en partes iguales en volumen; pH inicial 6,8; relación licor-madera 6,0; tiempo hasta temperatura máxima 90 minutos; tiempo en temperatura máxima 120 minutos, temperatura máxima 185 °C.

Terminada la cocción, se escurrió el licor residual y se lavaron los *chips* con porciones de alcohol, para disolver las fracciones de lignina precipitada, y estos lavados se juntaron con el licor original. A continuación se destiló a presión atmosférica, midiendo en el destilado la presencia de productos de degradación de la lignina, por medio de la reacción del floroglucinol y de Mäule, que dan positivo para los grupos siringilo y cinamilo respectivamente. Ello hizo descartar las fracciones de punto de ebullición menores de 92°C. Al llegar a este estado la mayor parte de la lignina está precipitada. La destilación se continuó hasta quedar un pequeño residuo de líquido en el balón.

Se extrajo con cloroformo en ampolla de decantación, el residuo de la destilación, “Extracto A”, y el destilado de punto de ebullición mayor de 92°C, “Extracto B”. En ambos se evaporó el solvente a presión reducida.

Para su inyección en el cromatógrafo se redisolviéron en etanol azeotrópico grado HPLC, y se filtraron por membrana de 20 μ .

Análisis cromatográfico

Para las separaciones cromatográficas por HPLC se utilizó como base la técnica de Chen, utilizada para la determinación de los productos de oxidación de lignina con nitrobenzeno [8]. Se utilizó como eluyente una mezcla de acetonitrilo-agua 1:8 más 1% de ácido acético, trabajando con columna C18 de 30 cm, a temperatura ambiente, un caudal de 2 ml/min y detector UV a longitud de onda de 280 μ m.

Se utilizaron trece sustancias de referencia, todas de grado comercial, que se purificaron por sucesivas cristalizaciones en etanol o mezclas de etanol-agua, secándose a temperatura ambiente bajo vacío.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis del extracto "A" del licor residual

El cromatograma HPLC del extracto "A" del licor de cocción separó dieciocho sustancias, de las cuales se pudieron identificar siete, habiendo dos más de caracterización no segura, Figura N° 1. Ello abarcó aproximadamente el 70% de la superficie total de los picos. De las que no fueron identificadas destacan los picos n.º 1 y 7 por su magnitud.

El n.º 1 posee tiempo de retención similar al de los ácidos fórmico y acético, que en las condiciones de las experiencias apenas se resuelven apareciendo en tiempos semejantes.

El ácido acético podría formarse por oxidación del etanol y desacetilación de las hemicelulosas, y el áci-

do fórmico se produce por desmetoxilación de la lignina.

Sin embargo, dado el muy bajo valor de las absorptividades de dichos ácidos, un pico de esas dimensiones implicaría una concentración incompatible con las titulaciones de neutralización realizadas y el pH del licor residual que fue de 4,0.

El pico n.º 2, identificado como debido al furfural, es dudoso. Una solución de dicha sustancia recién destilada, hervida a reflujo media hora, dio un cromatograma con varios picos casi superpuestos, de tiempos de retención en el rango del n.º 2.

Otra experiencia consistente en alcalinización del licor residual, extracción con cloroformo y posterior acidificación y nueva extracción, para eliminar selectivamente la sustancia, redujo inesperadamente la concentra-

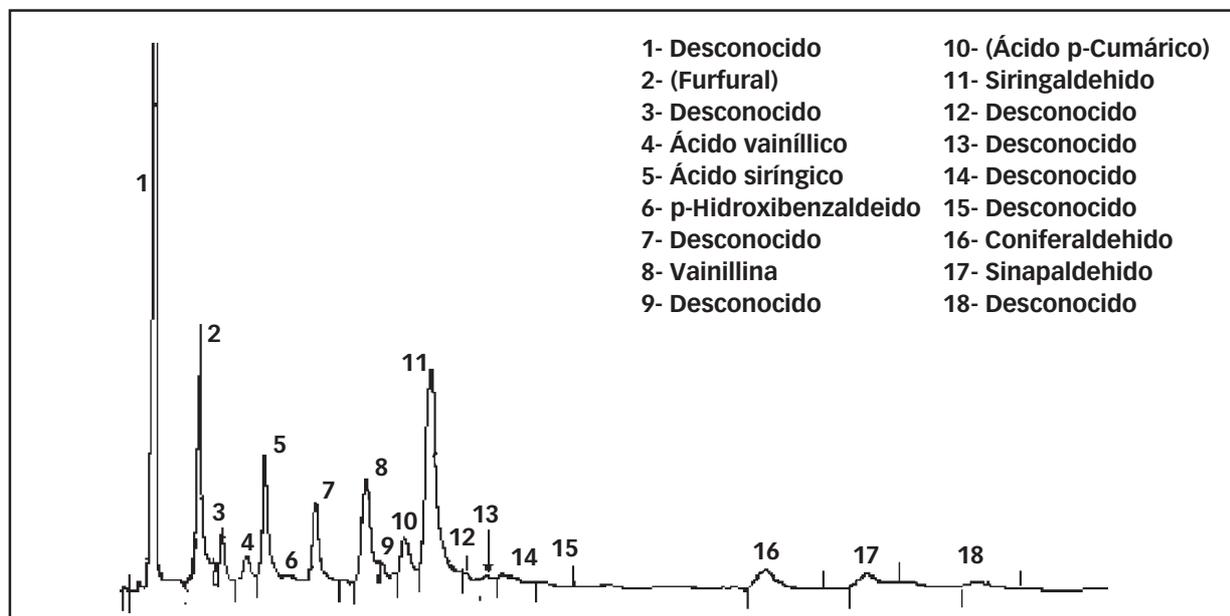


FIGURA N° 1: cromatograma del extracto clorofórmico del licor residual de cocción hidroalcohólica de *Eucalyptus grandis*.

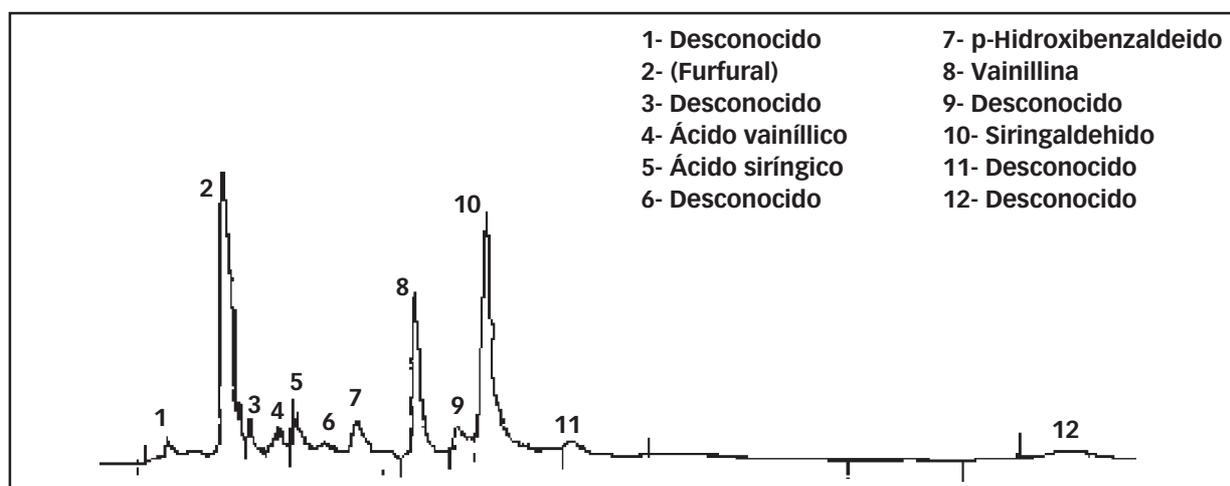


FIGURA N° 2: cromatograma del extracto clorofórmico de las fracciones destiladas ricas en agua del licor residual de cocción hidroalcohólica de *Eucalyptus grandis*.

ción de varios de los picos, manteniendo la incertidumbre sobre la identificación.

Comparando los resultados de trabajos de hidrólisis de madera, [3, 5, 6], falta solamente un grupo de sustancias siempre presentes en los mismos, que son las cetonas de Hibbert, es decir aquellas con cadenas laterales propilo y núcleos aromáticos H, G o S, con grupos carbonilos e hidroxilo en posiciones α y β . Por su tamaño molecular y polaridad, podrían corresponderse con el rango de tiempos de retención de los picos 12 al 15.

La sustancia representada por el pico n.º 18, de tiempo de retención superior al del coniferaldehído y el sinapaldehído, podría corresponder a un dímero de la degradación de la lignina.

Análisis del extracto del destilado acuoso "B"

El análisis cromatográfico del extracto clorofórmico del destilado "B" rico en agua separó doce sustancias de las dieciocho que había en el licor residual de la cocción hidroalcohólica, Figura n.º 2.

Dentro de las identificadas fueron arrastradas por el vapor de agua los ácidos vainílicos y siríngicos y el p-hidroxibenzaldehído, la vainillina y el siringaldehído. Por el contrario, se observa la ausencia de los aldehídos cinamílicos, es decir el coniferaldehído y el sinapaldehído. Faltan también algunos picos grandes como los n.º 1 y 7 del licor residual.

La existencia de estas sustancias en el destilado de la recuperación del alcohol, significa por un lado que van a existir fenoles monoméricos, tanto en la fase acuosa rica en azúcares fermentescibles como posiblemente en el licor de cocción, si se utiliza este proceso de manera industrial.

La proporción en uno y otro dependerá de la forma de recuperación puesto que, como ya se dijera, los fenoles destilan cuando la composición del destilado alcanza a tener una cantidad suficiente de agua.

Si bien el alcance de este trabajo no abarcó la determinación cuantitativa, una estimación hecha para los cuatro principales monómeros hallados de la degradación de la lignina, es decir sinapaldehído, coniferaldehído, siringaldehído y vainillina, teniendo en cuenta la masa del extracto clorofórmico recuperado, da como resultado que la cantidad de los mismos puede rondar en 1,5% sobre madera.

De confirmarse este nivel de formación, la existencia de estas sustancias debería estudiarse, tanto por su implicancia dentro del licor de cocción como en su utilización, como subproducto del pulpado hidroalcohólico.

Es interesante destacar que durante la realización de un trabajo sobre pulpado hidroalcohólico del bagazo de la caña de azúcar [9] para obtener pulpa química, en el que el lavado de las pulpas obtenidas en microdigestores fue realizado de forma múltiple en un equipo tipo *soxhlet*, estas sustancias llegaron a precipitarse como una masa de cristales blancos.

CONCLUSIONES

Se hallaron dieciocho sustancias fenólicas en el licor residual del pulpado hidroalcohólico de *Eucalyptus grandis* estudiado, trece de las cuales pasaron al destilado en el proceso de recuperación del alcohol, en las fracciones ricas en agua.

En el licor residual, las cuatro sustancias más abundantes fueron sinapaldehído, coniferaldehído, siringaldehído y vainillina, existiendo también dos ácidos derivados de las mismas; el ácido siríngico y el vainílico, además del p-hidroxibenzoico.

En los destilados, las dos sustancias principales fueron siringaldehído y vainillina, sus ácidos correspondientes y p-hidroxibenzaldehído.

Se estimó que la cantidad producida de los cuatro aldehídos principales fue de 1,5% sobre madera. ●

REFERENCIAS

1. **Goldshmid**, O. *Aqueous Hydrolysis of Lignin*. TAPPI Vol. 38 N° 2, pp. 728, 1955.
2. **Pearl**, I. A.; **Beyer**, D. L.; **Johanson**, B.; **Wilkinson**, S. *Alkaline Hydrolysis of Representative Hardwoods*. TAPPI, Vol. 40, N°5, p. 374, 1957.
3. **Stanek**, D. A. *A study of the Low-Molecular Weight Phenols Formed upon the Hydrolysis of Aspenwood*. TAPPI Vol. 41, N°10, p. 601, 1958.
4. **Enkvist**, T.; **Turunen**, J.; **Ashorn**, T. *The Demethylation and Degradation of Lignin or Spent Liquors by Heating with Alkaline Reagents*. TAPPI Vol. 45, N°2, p. 128, 1962.
5. **Nimz**, H. *Der Abbau des Lignins durch Schonende Hydrolyze*. Holsforschung Bd 20, (1966). H.4.
6. **Klemola**, A. *Steam Hydrolysis of Birchwood, Part III. Investigation of Low-Molecular Aromatic Degradation Products*. Suomen Kemistilehti. B 41. 1968.
7. **Núñez**, C. E. *Pulpado Hidroalcohólico de Eucalyptus grandis: Deslignificación, Catalizadores, Ligninas*. ATIPCA. Proceedings del 24° Congreso Técnico sobre Celulosa y Papel. Buenos Aires. 1988. Tomo I, p. 213 a 223.
8. **Chen**, C. I. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science. Heidelberg 1992, p. 301.
9. **Núñez**, C. E.; **Ferreira**, J. *Pulpado Hidroalcohólico de Bagazo: Cinética, Deslignificación y Retención de Polisacáridos*. Proceedings del 27° Congreso Técnico sobre Celulosa y Papel. ATIPCA. Buenos Aires. 1991, p. 189 a 204.

B BLANQUEO EN DOS ETAPAS DE PULPAS QUIMIMECÁNICAS INDUSTRIALES

Area, M. C. / Felissia, F. E. / Barboza, O. M.

Programa de Investigación de Celulosa y Papel, FCEQyN, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 (3300), Posadas, Misiones, Argentina

TWO STAGE BLEACHING OF INDUSTRIAL CHEMIMECHANICAL PULPS

The objective of this work is to optimize the bleaching of a hardwood chemimechanical pulp with hydrogen peroxide, using a two-stage process. Cold soda pulps from Celulosa Argentina S.A. Zárate mill were used as raw material (eucalyptus-poplar mixtures). Variables were: consistency (15 to 25%), total peroxide concentration (4.32 to 7.7% od) and temperature (61.5 to 78.5°C). The total amount of peroxide was distributed in identical quantities in each stage. Total alkalinity in all cases was 4.2% od (50% in each stage). Mechanical and optical tests were made according to TAPPI standards. Pulp brightness reversion after a year of storage was measured. Color parameters L^* , a^* , b^* were also determined and k/s of pulps was calculated after reversion. Consistency, temperature and peroxide load have significant influence on brightness, but they do not present any effect on mechanical properties. Maximum brightness of 78.7% ISO was obtained using process extreme conditions. Minimum reversion was obtained using 75°C, 6.6% of H_2O_2 and 17% of consistency.

KEY WORDS: bleaching, hydrogen peroxide, stages, high yield pulps, hardwoods, reversion.

El objetivo del trabajo es optimizar el blanqueo con peróxido de hidrógeno de pulpas quimimecánicas de latifoliadas implantadas, utilizando un proceso en dos etapas. Se emplearon pulpas a la soda fría de mezclas de salicáceas y eucalyptus provenientes de la fábrica Zárate de Celulosa Argentina S.A. Las variables fueron: consistencia (15 a 25%), concentración de peróxido total (4,32 a 7,7% bps) y temperatura (61,5 a 78,5°C). La cantidad total de peróxido se distribuyó en forma equitativa en cada etapa. La alcalinidad total en todos los casos fue de 4,2% bps (50% en cada etapa). Los ensayos mecánicos y ópticos se realizaron según normas TAPPI. Se midió la reversión natural de las blancuras después de un año de almacenamiento de las pulpas. Se midieron también los parámetros de color L^* , a^* , b^* , y se calculó el cociente k/s de las pulpas revenidas. La consistencia, la temperatura y la carga de peróxido tienen influencia significativa sobre la blancura, pero no sobre las resistencias físico-mecánicas. La máxima blancura alcanzada fue de 78,7% ISO utilizando las condiciones extremas del proceso. Las pulpas blanqueadas a 75°C, 6,6% de H_2O_2 y 17% de consistencia presentan la mínima reversión.

PALABRAS CLAVE: blanqueo, peróxido de hidrógeno, etapas, pulpas de alto rendimiento, latifoliadas, reversión.

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo es optimizar el blanqueo con peróxido de hidrógeno de pulpas quimimecánicas a la soda fría, utilizando un proceso en dos etapas. Se pretende encontrar los niveles más convenientes de las variables de proceso de blanqueo de pulpas de alto rendimiento de latifoliadas implantadas, con el fin de obtener pulpas de alta blancura a un costo razonable. Esto significaría conseguir la misma blancura final que trabajando con una sola etapa con un menor consumo de reactivos, y sin disminución de las resistencias físico-mecánicas de las pulpas.

Numerosos autores discuten los efectos de la utilización de blanqueo en dos etapas. Lachenal *et al* [1] mencionan que la ventaja fundamental de utilizar dos etapas de blanqueo consiste especialmente en la posibilidad de utilizar el peróxido residual del licor de blanqueo. Si los residuales son importantes, la opción es recircular el licor de la segunda etapa como carga de la primera, agregando licor fresco solamente en la segunda etapa. El peróxido en el licor residual se reactiva mediante el agregado de álcali extra al final de la primera etapa.

Strand *et al* [2] también reportan resultados similares. Estos autores desarrollaron un modelo matemático computarizado para optimizar estrategias para el blanqueo con H_2O_2 , trabajando con pulpas CTMP. Sus resultados indican que una planta industrial puede hacer un uso más eficiente de la carga de peróxido implementando la recirculación del peróxido residual.

Hook y Wallin [3] señalan como una ventaja adicional que, para la obtención de una determinada blancura final, la blancura obtenida al finalizar la primera etapa puede ser utilizada como indicativo de la carga necesaria de peróxido en la segunda etapa.

Otros autores han encontrado, sin embargo, que en ciertas condiciones la recirculación del peróxido residual posee efectos perjudiciales sobre la respuesta al blanqueo [4].

Se pretende con este trabajo comprobar si existe una economía de peróxido de hidrógeno utilizando la carga total de este reactivo repartida en dos etapas. Nuestras conclusiones en un trabajo previo indican que esto se verifica, y que la mejor proporción para pulpas quimimecánicas es de 50% en cada etapa [5]. En este caso se utilizaron directamente esas proporciones y las condiciones obtenidas como óptimas para estas mismas pulpas, pero utilizando una etapa [6]. Considerando el elevado costo del H_2O_2 , un pequeño ahorro en la carga de este reactivo implicará una gran economía en los costos globales de blanqueo.

Estos resultados podrían aplicarse a la fábrica Zárate de Celulosa Argentina S.A., que produce pulpas a la soda fría de mezclas de salicáceas y eucalyptus. Esta fábrica posee la particularidad de contar con dos torres en sus instalaciones de blanqueo. Actualmente las mismas son utilizadas en serie, aplicándose una carga única de reactivos en un punto previo a la primera torre. Más datos sobre el proceso de blanqueo de esta fábrica pueden encontrarse en la referencia [7].

Se utilizaron pulpas industriales de la fábrica mencionada. El diseño experimental utilizado consistió en un central compuesto (*CCD, Central Composite Design*) de tres variables [8], donde la carga de H_2O_2 se repartió en partes iguales entre la primera y la segunda etapa [5]. El licor de la segunda etapa se agregó previa eliminación por espesado del licor residual de la primera etapa.

Para la selección de las variables de mayor influencia sobre este tipo de pulpas, se realizó un trabajo de "tamizado o *screening*" [9]. Se observó que los valores de blanco y resistencias físico-mecánicas son mayores en los niveles superiores de las variables en estudio, y en base a esto se decidió desplazar el rango de consistencia, concentración de peróxido de hidrógeno y temperatura.

Es bien conocido que la presencia de iones metálicos, tales como Mn, Cu, Fe, es desfavorable en el blanqueo con peróxido de hidrógeno porque catalizan la descomposición de este reactivo. Un camino eficiente para controlar y remover estos iones metálicos en la pulpa y en consecuencia maximizar la utilización del peróxido es la aplicación de un pre-tratamiento quelante. El DTPA es el complejante de iones metálicos más utilizado actualmente debido a su estabilidad a la oxidación con H_2O_2 y a su habilidad para formar iones complejos con los metales [10]. No obstante, sabemos que este producto requiere condiciones muy definidas de experiencia para ser eficiente. Si bien la utilización del mismo no ha presentado un gran beneficio en la fábrica de referencia por el motivo citado anteriormente, ese no es el caso en el laboratorio, por lo cual se ha utilizado en este trabajo. La selección y optimización de agentes complejantes más efectivos será el tema de un trabajo posterior.

Un aspecto a tener en cuenta en la decisión de las condiciones de blanqueo a utilizar es la reversión posterior de la blancura de las pulpas. El blanqueo con peróxido puede producir tanto como destruir distintos grupos en la lignina que produzcan reversión [11]. Por esto, se midió la reversión natural de las blancuras después de un año de almacenamiento de las pulpas en condiciones ambientales de humedad y temperatura. Se consideraron indicativos de la reversión: la pérdida de la blancura, y las diferencias en el cociente entre los coefi-

cientes de absorción y dispersión de la luz “k/s” calculado mediante la ecuación de Kubelka-Munk. También se midieron los parámetros de color L, a, b, de las hojas de pulpa revenidas.

EXPERIMENTAL

Se trabajó con 50 g de pulpa seca 100%. Se utilizó como materia prima, pulpa quimimecánica a la soda fría de latifoliadas a partir de *chips* (50% de salicáceas y 50% de eucalyptus), proveniente de la fábrica Zárate de Celulosa Argentina S.A. Las condiciones de fabricación de la pulpa inicial están dadas en un trabajo anterior [9].

Se aplicó un diseño experimental CCD con tres variables: consistencias (15 a 25%), concentración de peróxido (4,3 a 7,7% bps) y temperatura (61,5 a 78,5°C). La alcalinidad total en todos los casos fue de 4,2% bps (3% de silicato de sodio + 3,5% de NaOH), aplicándose 50% en cada una de las etapas. La cantidad de peróxido de hidrógeno dada por el diseño se dividió en forma equimolar en cada una de las etapas. Los valores de las variables, reales y transformadas, se presentan en la Tabla 1. El tiempo de tratamiento total fue de dos horas (una hora en cada etapa).

Antes de realizar el blanqueo las pulpas fueron pre-tratadas con DTPA (0,5% bps), 15 minutos a una consistencia de 3% bps, y 60°C.

Al finalizar el pre-tratamiento, las pulpas fueron espesadas y centrifugadas para ajustar la consistencia según los niveles requeridos para cada experiencia. Esto se realizó escurriendo la pulpa a mano, y centrifugando posteriormente en una centrífuga de laboratorio hasta una sequedad aproximada del 29%. El ajuste exacto se logró en cada caso diluyendo con la cantidad exacta de licor de blanqueo y agua desmineralizada. Se logró una buena homogeneización de la mezcla licor-pulpa mediante una batidora de mano con paletas de acero inoxidable.

Primera etapa

La cantidad de pulpa pre-tratada fue de 50 g (bps) en todos los casos, o sea que se trató individualmente el peso equivalente a cada experiencia de blanqueo.

El licor de blanqueo consistió de:

Silicato de sodio: 3%.

Álcali total: 2,1%.

Peróxido: 50% del total correspondiente a cada punto del diseño.

Las pulpas se colocaron en bolsas de polietileno, se agregó el licor de blanqueo y se sellaron. Las bolsas se pusieron en baño térmico durante una hora con agitación manual a la media hora de tratamiento. Al finalizar el tiempo correspondiente a la primera etapa (1 hora), se extrajo una muestra de licor para los análisis químicos correspondientes (álcalis y peróxido residual), centrifugando a 3.000 r.p.m.

Tabla 1: diseño experimental

Experiencia	Consistencia	H ₂ O ₂ 1ª E	H ₂ O ₂ 2ª E	H ₂ O ₂ total	Temperatura	Consistencia	H ₂ O ₂ total	Temperatura
1	17	2,50	2,50	5,0	65,0	-1	-1	-1
2	23	2,50	2,50	5,0	65,0	1	-1	-1
3	17	3,50	3,50	7,0	65,0	-1	1	-1
4	23	3,50	3,50	7,0	65,0	1	1	-1
5	17	2,50	2,50	5,0	75,0	-1	-1	1
6	23	2,50	2,50	5,0	75,0	1	-1	1
7	17	3,50	3,50	7,0	75,0	-1	1	1
8	23	3,50	3,50	7,0	75,0	1	1	1
9	15	3,00	3,00	6,0	70,0	-1,68	0	0
10	25	3,00	3,00	6,0	70,0	1,68	0	0
11	20	2,15	2,15	4,3	70,0	0	-1,68	0
12	20	3,85	3,85	7,7	70,0	0	1,68	0
13	20	3,00	3,00	6,0	61,6	0	0	-1,68
14	20	3,00	3,00	6,0	78,4	0	0	1,68
15	20	3,00	3,00	6,0	70,0	0	0	0
16	20	3,00	3,00	6,0	70,0	0	0	0
17	20	3,00	3,00	6,0	70,0	0	0	0

Posteriormente se pesaron las pulpas para los cálculos de consistencia y *make up* de reactivos, para ingresar a la segunda etapa.

Segunda etapa

El licor de la segunda etapa se ajustó tal de obtener las mismas condiciones que en la primera. Para los cálculos se tuvieron en cuenta los residuales existentes en la muestra extraída para análisis al fin de la primera etapa.

Se agregaron:

Silicato de sodio: solamente la cantidad correspondiente para reemplazar el silicato de la muestra extraída y completar el 3 % total.

Álcali total: la cantidad correspondiente para reemplazar el NaOH de la muestra extraída + el % de NaOH adecuada para llegar al 2,1% de álcali total de la etapa 2.

Peróxido: la cantidad necesaria para reemplazar el peróxido residual de la muestra extraída + el correspondiente a la etapa 2 (50% del total).

El procedimiento subsiguiente fue exactamente igual al de la primera etapa. El tiempo de retención fue de una hora en baño termostático a la temperatura de la experiencia.

Al finalizar el tiempo de reacción se retiraron las bolsitas del baño y se centrifugaron las pulpas inmediatamente. En los licores se realizaron las determinaciones de pH final, álcali residual y peróxido residual.

Las pulpas fueron neutralizadas con metabisulfito de sodio hasta pH 5.5, a una consistencia de 1% y lavadas con agua desmineralizada.

Al finalizar el lavado se elaboraron hojas para ensayos ópticos y físicos según normas TAPPI (218 y 200). Se realizaron los ensayos físico-mecánicos (normas TAPPI) y se midieron las blancuras como % ISO. Se midió la reversión natural de las blancuras después de un año de almacenamiento de las pulpas en condiciones ambientales de humedad y temperatura, y luminosidad cero. Se midió y calculó el cociente k/s de las pulpas revenidas, y se midieron los parámetros de color L, a, b.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades físico-mecánicas de la pulpa inicial fueron:

- Blancura inicial: 43,5% ISO
- Volumen Específico: 2,19 (cm³/g)
- I. Explosión: 1,54 (mN/kg)
- I. Tracción: 34,9 (Nm/g)
- I. Rasgado: 3,57 (Nm²/kg)

Las Tablas de resultados de las experiencias realizadas se presentan como Anexo.

Blanqueo en 2 etapas: análisis de residuales y consumos de peróxido de hidrógeno

Las Figuras 1 y 2 presentan los datos comparativos de consumo de peróxido, y consumo de peróxido por unidad de blanco para las 17 experiencias.

El análisis de los residuales de la primera y segunda etapa indica que estos son directamente proporcionales, con un coeficiente de correlación $R = 0,94$. Para la misma aplicación de peróxido, los residuales de la segunda

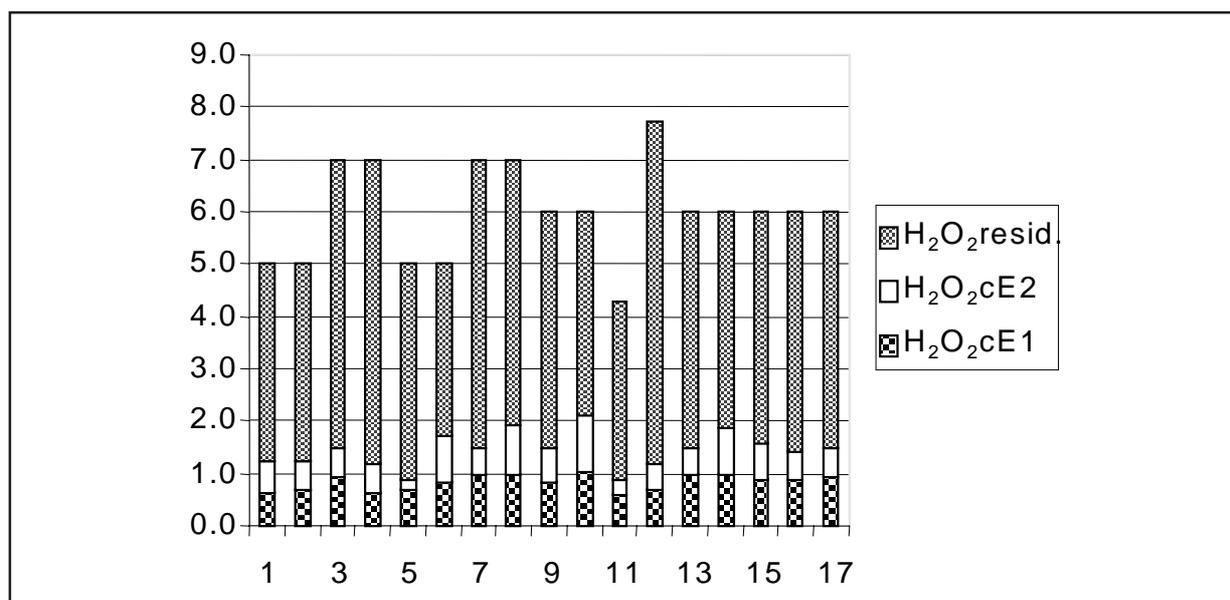


FIGURA 1: comparación de consumo de peróxido de hidrógeno en las 17 experiencias.

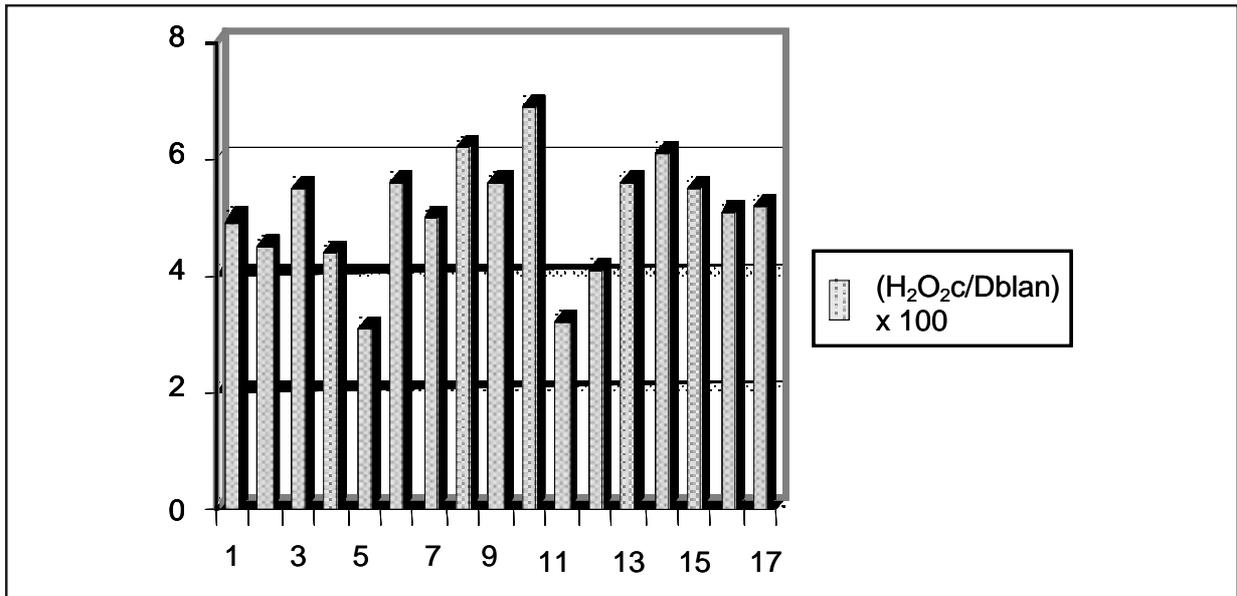


FIGURA 2: comparación de consumo de peróxido de hidrógeno por unidad de ganancia de blancura en las 17 experiencias.

etapa son apenas más elevados que los de la primera etapa.

En la Figura 1 se observa que el consumo de peróxido (diferencia entre el peróxido aplicado y el residual en cada caso) es siempre mayor o igual en la primera etapa que en la segunda. Este consumo puede deberse a la reacción de blanqueo en sí o a reacciones laterales de descomposición. Por consiguiente, para verificar la eficiencia de la reacción de blanqueo, es mejor analizar el consumo global de peróxido por unidad de ganancia de blanco (Figura 2).

De este análisis se desprende que la experiencia 10 (máximo de consistencia) presenta las condiciones menos eficientes. El consumo de reactivo en la experiencia 10 es superior al de la 8, con una ganancia de blanco menor.

Las ecuaciones 1 y 2 muestran las predicciones del consumo de peróxido y peróxido residual en función de las variables significativas transformadas (0, -1, +1, etc.).

$$H_2O_2c \text{ total} = 1,62 + 0,15 * \text{consistencia} + 0,11 * H_2O_2 + 0,10 * \text{temperatura} + 0,20 (\text{consistencia} * \text{temperatura}) - 0,21 (H_2O_2)^2 \quad (1)$$

$$H_2O_2r \text{ total} = 4,38 - 0,15 * \text{consistencia} + 0,89 * H_2O_2 - 0,11 * \text{temperatura} - 0,20 * (\text{consistencia} * \text{temperatura}) + 0,21 * (H_2O_2)^2 \quad (2)$$

Las Figuras 3 a 6 presentan la variación del consumo y el residual de peróxido de hidrógeno en función de las variables en estudio.

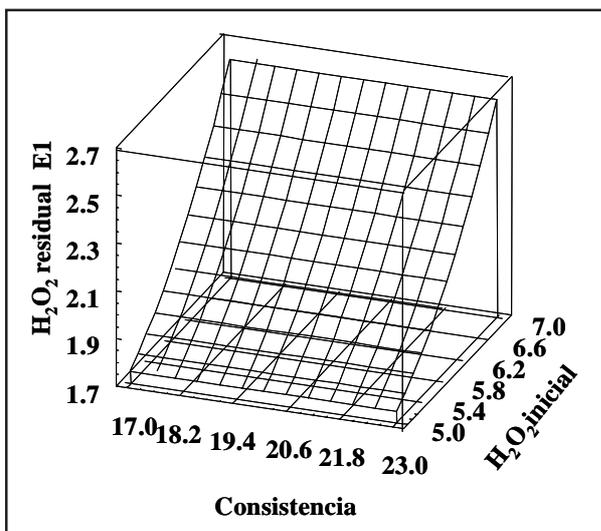


FIGURA 3: H₂O₂ residual total de la 1ª etapa en función del H₂O₂ inicial y de la consistencia.

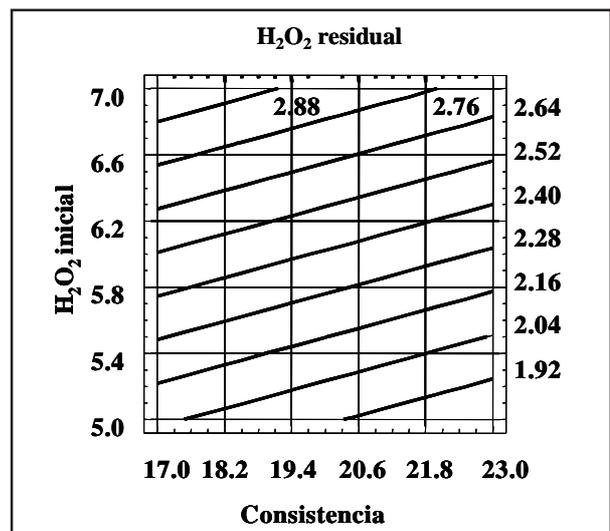


FIGURA 4: H₂O₂ residual total de la 2ª etapa en función del H₂O₂ inicial y de la consistencia.

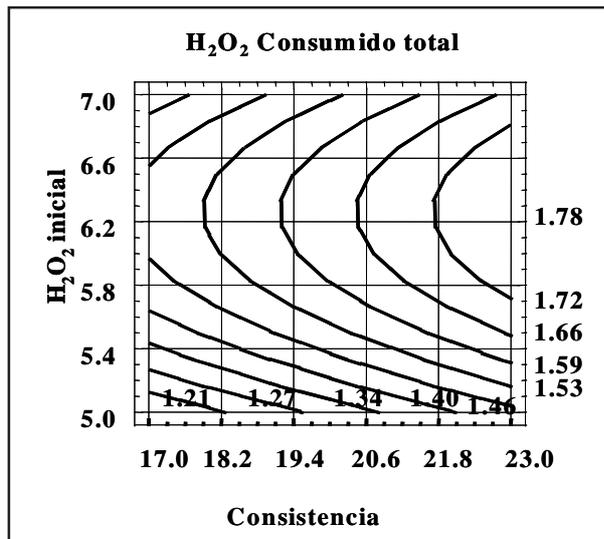


FIGURA 5: H₂O₂ consumido total en función del H₂O₂ inicial y de la consistencia.

Los residuales no muestran ninguna variación con la consistencia en la primera etapa, mientras que disminuyen con esta variable en la segunda etapa (Figuras 3 y 4), lo cual se refleja en las variaciones del peróxido residual total (ecuación 2).

El consumo en la primera etapa del blanqueo en dos etapas, presenta una marcada variación cuadrática con el peróxido inicial, con un máximo en 6,2% de peróxido. El consumo en la segunda etapa presenta las mismas tendencias del consumo total.

Las Figuras 5 y 6 muestran la presencia de un máximo de consumo de peróxido a 6,2% de peróxido inicial. La variación con la temperatura y con la consistencia es siempre creciente. La presencia de una influencia cuadrática del H₂O₂ inicial sobre el consumo se evidencia en la ecuación 1. Es notable asimismo el marcado efecto de la interacción consistencia-temperatura.

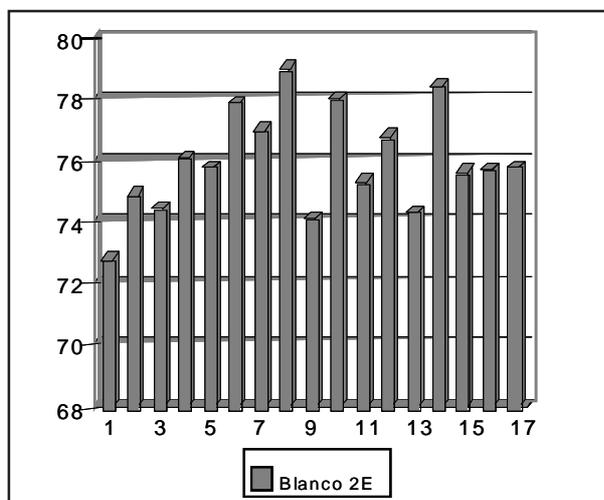


FIGURA 7: comparación de la blancura final en las 17 experiencias.

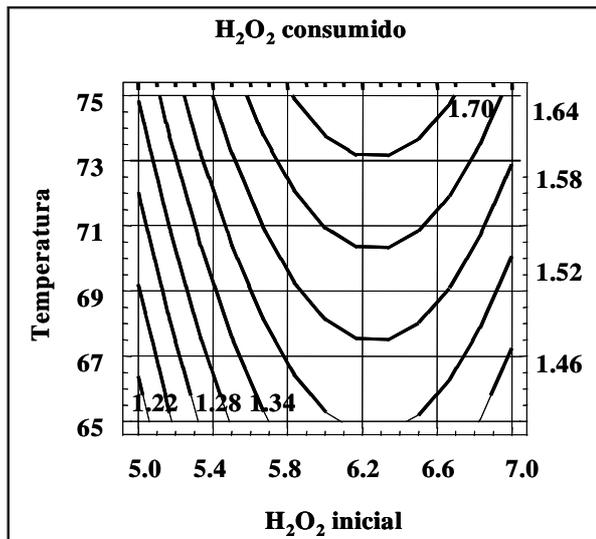


FIGURA 6: H₂O₂ consumido total de las pulpas en función del H₂O₂ inicial y de la temperatura.

Si bien en la bibliografía se presenta –en algunos casos– un beneficio en trabajar con elevadas consistencias en la 2ª etapa [2, 11], al estudiar el sistema a diferentes niveles de temperatura los resultados son diferentes. Los residuales en la 1ª etapa del blanqueo en dos etapas dependen exclusivamente de la carga inicial de peróxido, mientras que en la 2ª etapa presentan su valor máximo a medias consistencias y elevada temperatura, debido al efecto de interacción de estos dos factores. Los consumos sobre incremento de blanco muestran la misma tendencia, por lo que sería preferible trabajar a medias consistencias (17%) y altas temperaturas (75°C).

Blanqueo en 2 etapas: propiedades ópticas

Los valores de blancura final para las 17 experiencias se presentan en el Gráfico 7. La variación de la blancura de las pulpas en función de las variables en estudio de mayor influencia se presenta en la Figura 8.

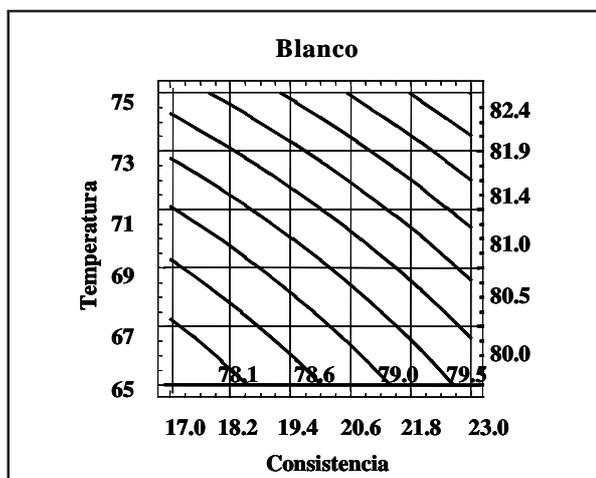


FIGURA 8: blancura de las pulpas en función de la temperatura y de la consistencia.

La Figura 9 presenta la comparación de la blancura original de las pulpas (inmediatamente después del blanqueo) con la blancura revenida, mientras que la Figura 10 muestra la relación entre el parámetro de color “b” con el cociente k/s de Kubelka-Munk.

Las ecuaciones 3 a 6 muestran las predicciones de blancura, reversión de la blancura, “k/s” y “b” en función de las variables significativas transformadas (0, -1, +1, etc.).

$$\text{Blancura final} = 79,87 + 1,06 * \text{consistencia} + 0,56 * \text{H}_2\text{O}_2 + 1,35 * \text{temperatura} + 0,15 * (\text{temperatura})^2 \quad (3)$$

$$\text{Reversión} = 3,83 + 0,24 * \text{consistencia} - 0,33 * \text{H}_2\text{O}_2 - 0,96 * \text{temperatura} - 0,29 * (\text{H}_2\text{O}_2 * \text{temperatura}) + 0,41 * (\text{H}_2\text{O}_2)^2 + 0,50 * (\text{temperatura})^2 \quad (4)$$

$$k/s = 0,001149 - 0,00106 * \text{consistencia} - 0,00218 * \text{temperatura} + 0,00131 * (\text{temperatura})^2 \quad (5)$$

$$b = 11,90 - 0,52 * \text{consistencia} - 0,54 * \text{H}_2\text{O}_2 - 1,36 * \text{temperatura} + 0,15 * (\text{consistencia} * \text{temperatura}) - 0,17 * (\text{consistencia})^2 + 0,23 * (\text{H}_2\text{O}_2)^2 \quad (6)$$

Con respecto a la blancura, puede observarse en la Figura 7 que el máximo valor obtenido con el blanqueo en dos etapas fue de 78,7% ISO. Este se produjo en las condiciones de la experiencia 8, (incremento de blancura con respecto al inicial de 31,4), correspondiendo al nivel +1 de las tres variables (consistencia de 23%, 7% de peróxido, 75°C de temperatura). Estos resultados co-

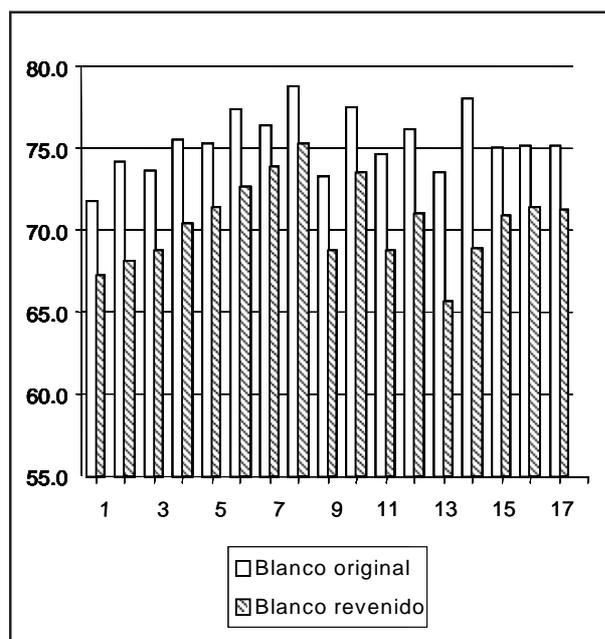


FIGURA 9: comparación de la blancura original con la blancura revenida de las pulpas.

inciden con los obtenidos utilizando una sola etapa (6). Comparando esta experiencia con la número 6, (iguales condiciones de temperatura y consistencia pero con dosis de peróxido de 5%), la diferencia en la blancura consiste en un aumento de dos puntos cuando se utiliza la mayor carga de reactivo. El mínimo incremento de blanco con respecto al inicial fue de 25,2 en la experiencia 1, con todas las variables en sus niveles inferiores.

Otras condiciones nos permiten llegar a una blancura objetivo de 78% ISO, con consumos por unidad de blancura algo menores, como es el caso, por ejemplo, de la experiencia 14 (consistencia: 20%, peróxido: 6%, temperatura: 78,5°C).

Los efectos del aumento de temperatura, consistencia y carga de peróxido consisten en aumentar la blancura en mayor o menor grado, (Tabla 3, Figura 8 y ecuación 3). Se observa que la temperatura es el factor que más influye aumentando la blancura final (con un muy leve efecto cuadrático), seguido por la consistencia.

La blanqueabilidad de las pulpas (es decir, la respuesta de una pulpa al agente de blanqueo) es una de las claves del proceso [12]. Las pulpas utilizadas muestran dificultad para superar blancuras de 79% ISO utilizando un blanqueo en 1 ó 2 etapas y con diferentes niveles de las variables estudiadas. La única posibilidad consistiría en modificar las condiciones de pulpado de forma tal de mejorar la blanqueabilidad de las pulpas [13].

La Figura 9 muestra la blancura original y la blancura revenida de las pulpas. La pérdida de blancura fue de aproximadamente 2,5 a 9,1%, dependiendo de las condiciones de blanqueo.

Las Figuras 11 y 12, 14 a 16 exponen la variación de los parámetros de reversión: pérdida de blancura (reversión), “k/s” y “b” en función de las variables en estudio. La Figura 13 muestra la proporcionalidad del aumento

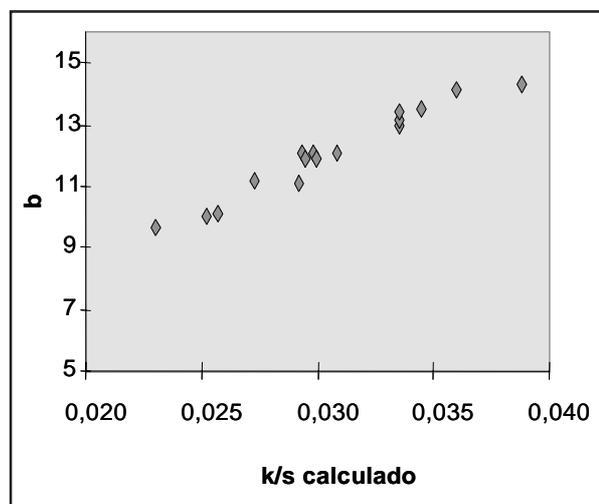


FIGURA 10: comparación de parámetro de color “b” con el cociente k/s.

del coeficiente de absorción de la luz medido como “delta k/s” y la pérdida de blancura en el rango de este trabajo ($R = 0,998$).

Algunos autores afirman que el coeficiente de absorción de la luz “k” definido por la ecuación de Kubelka-Munk, es el parámetro preferido para monitorear la reversión, ya que varía linealmente con la formación de grupos cromóforos en la pulpa [12]. Ese no es el caso de la reversión medida como pérdida de blanco, ya que la blancura (reflectancia a 457 nm) es una combinación de la absorción y de la dispersión (*scattering*: “s”) de la luz.

En los últimos tiempos se ha comenzado a utilizar con mayor frecuencia el parámetro de color “b” como un indicativo de los cromóforos (color amarillo) de las pulpas. Este se calcula a partir de mediciones a dos longitudes de onda. Esta medida parece ser lo más adecuado

para reproducir la detección del ojo humano de las variaciones de blancura, ya que se mide a las longitudes de onda de máxima percepción.

En la Figura 10 se muestra la linealidad entre el cociente “k/s” calculado a partir de los valores de reflectancia de las pulpas revenidas y el parámetro de color “b”, en el rango de valores de este trabajo.

Como se observa en las Figuras 11 y 12 que se desprenden de la ecuación 4, dentro del rango de niveles estudiado, se presenta un mínimo de reversión en las condiciones: 75°C, 6,6% de H_2O_2 inicial y 17% de consistencia.

En la Figura 13 se observa que en el caso del rango de valores de blancuras y reversiones del presente trabajo, la pérdida de blanco (diferencia entre el inicial y el final) y el incremento del cociente “k/s” son directamente

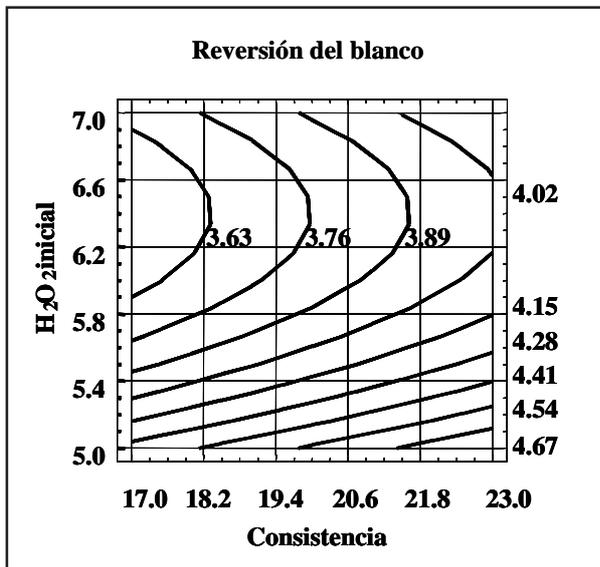


FIGURA 11: reversión de la blancura de las pulpas en función del H_2O_2 inicial y de la consistencia.

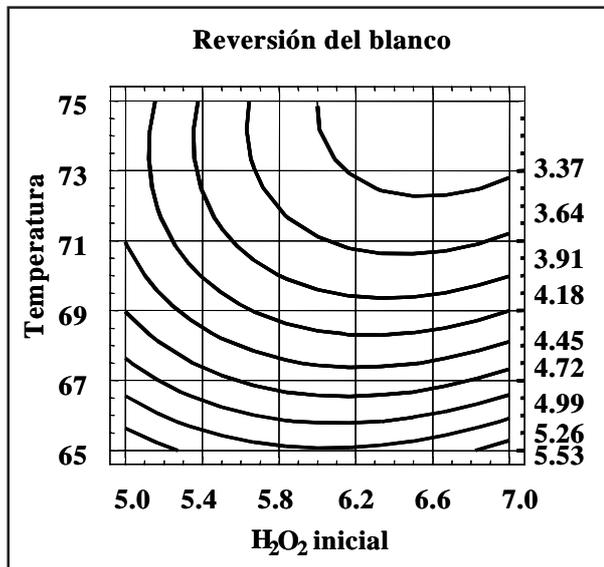


FIGURA 12: reversión de la blancura de las pulpas en función de la temperatura y del H_2O_2 inicial.

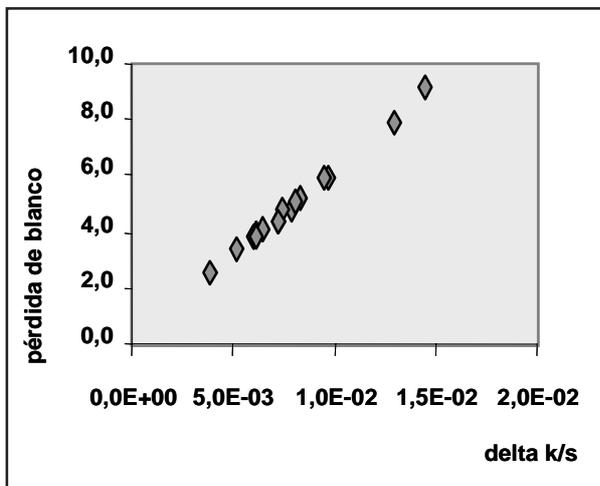


FIGURA 13: relación entre el incremento del cociente k/s y la pérdida de blanco después de 1 año de envejecimiento.

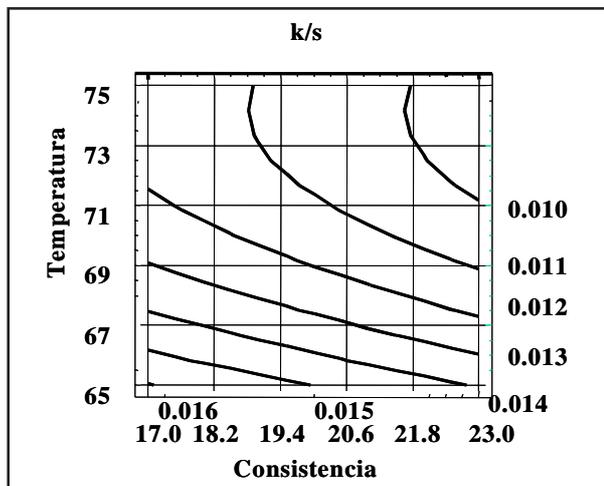


FIGURA 14: cociente k/s en función de la temperatura y de la consistencia.

proporcionales presentando una elevada correlación. Esto hace válido el estudio de la reversión mediante la pérdida de blanco.

La Figura 14 representa la variación de k/s de las pulpas revenidas según la ecuación 5. El efecto de la temperatura es mucho más marcado que el de la consistencia. La menor absorción de luz se da a la máxima temperatura y máxima consistencia.

Idénticos resultados presenta el parámetro de color "b", mostrando además una disminución del color final de las pulpas revenidas con cargas crecientes de peróxido inicial (Figuras 15 y 16). Esto podría indicar que si bien la pérdida de blanco es mayor blanqueando a consistencias elevadas, las pulpas revenidas así obtenidas se ven menos amarillas. Esto es posible, debido a que la pérdida de blanco se mide a una sola longitud de onda, lo cual brinda, como ya se mencionó, una información parcial del sistema.

Todas las ecuaciones obtenidas son significativas al 95%. Las variables estudiadas no presentan influencia significativa sobre las resistencias físico-mecánicas de las pulpas.

CONCLUSIONES

-En todos los parámetros de evaluación estudiados en el blanqueo en dos etapas se presenta un beneficio al trabajar con temperaturas de aproximadamente 75°C. Es posible que esto se deba a características intrínsecas de las pulpas a la soda fría de latifoliadas.

-Los consumos por unidad de incremento de blanco muestran una marcada disminución al trabajar a medias consistencias (17%) y altas temperaturas (75°C).

-El máximo valor de blancura obtenido con el blanqueo en dos etapas fue de 78,7% ISO. Este se obtuvo trabajando en los niveles más elevados de las variables: consistencia del 23%, 7% de peróxido, y 75°C de temperatura.

-Estas pulpas muestran dificultad para superar blancuras de 79% ISO con los diferentes niveles de las variables estudiadas.

-La pérdida de blancura después de un año de envejecimiento natural fue aproximadamente de 2,5 a 9,1% ISO, dependiendo de las condiciones de blanqueo.

-Dentro del rango de niveles estudiado, se presenta un mínimo de reversión de la blancura de las pulpas en las condiciones: 75°C, 6,6% de H₂O₂ inicial y 17% de consistencia.

-El parámetro de color "b" de las pulpas revenidas presenta sus valores mínimos en las pulpas blanqueadas utilizando elevadas temperaturas, cargas iniciales de peróxido y consistencias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Venica. A Celulosa Argentina. A AKZO Chemicals (donación del DTPA).

A José Portel, *in memoriam*. ●

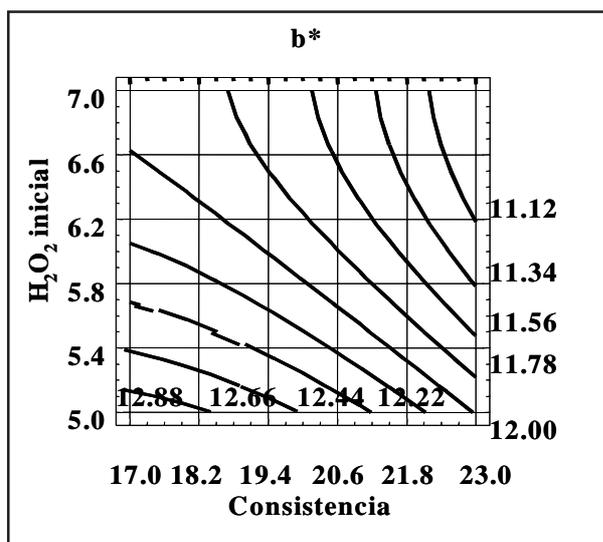


FIGURA 15: factor de color "b" en función del H₂O₂ inicial y de la consistencia.

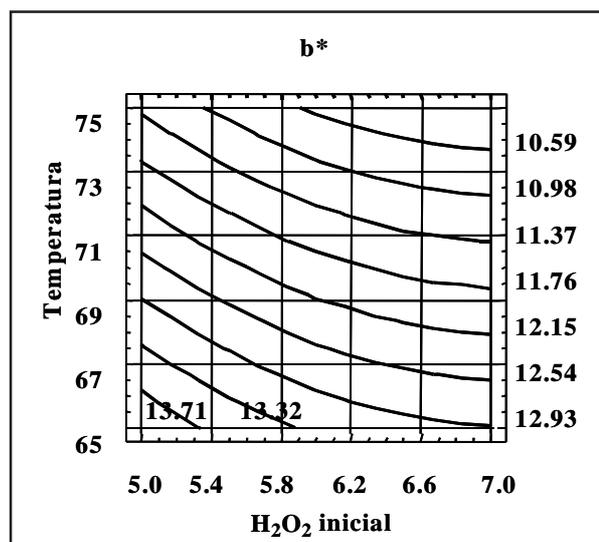


FIGURA 16: factor de color "b" en función de la temperatura y del H₂O₂ inicial.

REFERENCIAS

1. **Lachenal, D.; Dubreuil, M.; Bourson, L.** *Reactivation of residual H_2O_2 in high yield pulp bleaching as a way to reach high brightness.* Tappi Journal vol. 73, nº 10, pp. 195-199, 1990.
2. **Strand, E.; Moldenius, S.; Koponen, R.; Viljakainen, E.; Edwards, L. L.** *Optimization of peroxide bleaching systems.* Tappi Journal, vol. 71, nº 7, pp. 130-134, 1988.
3. **Hook, J.; Wallin, S.; Akerlund, G.** *Optimization and control of two-stage peroxide bleaching.* TAPPI Pulping Conf. (Seattle) Proc. (Book 1): 267-275. Oct. 22-25, 1989.
4. **Mahagaonkar, M.; Abbot, J.** *Peroxide bleaching of radiata pine TMP and eucalyptus regnans cold caustic soda pulps with sodium hydroxide and magnesium oxide.* Appita, vol. 48, nº 1, pp. 40-44, 1995.
5. **Area, M. C.; Barboza O. M.; Valade, J. L.** *Bleaching of Eucalyptus grandis chemimechanical pulps.* Tappi Journal, vol. 80, nº 3, pp. 141-145, 1997.
6. **Area, M. C.; Barboza, O. M.; Felissia, F. E.** *Optimización del blanqueo en una etapa de pulpas químico-mecánicas industriales* Investigación y Técnica del Papel (España), nº 138 pp. 635-651, octubre 1998.
7. **Area, M. C.; Vénica, A.** *Aplicación del diseño de experiencias en la optimización del blanqueo a escala industrial,* Investigación y Técnica del Papel (España), nº 135, pp. 9-21, enero 1998.
8. **Barker, T. B.** *Quality by Experimental Design.* Chap. 6, pp. 62-73. Marcel Dekker Inc., 1985 (TS156B3-7).
9. **Area, M. C.; Barboza, O. M.** *Análisis de la influencia de las variables de blanqueo en las propiedades de pulpas químico-mecánicas,* Investigación y Técnica del Papel, nº 125, pp. 487-499, julio 1995.
10. **Bambrick, D. R.** *The effect of DTPA on reducing peroxide decomposition* Tappi Journal, vol. 68, nº 6, pp. 96-100, 1985.

11. **Johnson, R. W.** *Brightness stability of mechanical pulps.* Tappi Journal, vol. 72, nº 12, pp. 181-187, 1989.

12. **Meyrant, P.; Dodson, M.** *High-consistency bleaching: a must for high brightness target?* Tappi Journal, vol. 73, nº 1, pp. 109-114, 1990.

Dodson, M. G.; Bohn, W. L.; Kouk, R. S., Meyrant, P., *The impact of sulfonation on hydrogen peroxide bleaching response of hardwood and softwood high-yield pulps.* Tappi Journal, vol. 72, nº 9, pp. 177-182, 1989.

ABREVIATURAS Y UNIDADES

2E: 2 etapas

a*: parámetro de color CIELAB (rojo a verde)

Alcali c.: Alcali consumido (% base pulpa seca 100%)

b*: parámetro de color CIELAB (amarillo a azul)

bps: base pulpa seca 100%

ConsDBlan: Peróxido de hidrógeno consumido/DBlan 2E

DBlan: diferencia de blancura (blancura inicial – blancura final)

E1: primera etapa del blanqueo en 2 etapas

E2: segunda etapa del blanqueo en 2 etapas

H_2O_2c : Peróxido de hidrógeno consumido, (% base pulpa seca 100 %)

H_2O_2r : Peróxido de hidrógeno residual, (% base pulpa seca 100 %)

I. Explosión: Índice de explosión (mN/kg)

I. Rasgado: Índice de rasgado (Nm²/kg)

I. Tracción: Índice de tracción (Nm/g)

k: Coeficiente de absorción de luz

L*: parámetro de color CIELAB (blanco al negro)

NaOH: Hidróxido de sodio (% base pulpa seca 100%)

s: Coeficiente de dispersión de luz (*scattering coefficient*) (m²/kg)

V.E.: Volumen específico (cm³/g)

Tabla A1: resultados de los análisis químicos de licores y propiedades físico-mecánicas de las pulpas

n° de experiencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Consistencia (% bps)	17	23	17	23	17	23	17	23	15	25	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ Inicial total (% bps)	5,0	5,0	7,0	7,0	5,0	5,0	7,0	7,0	6,0	6,0	4,3	7,7	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Temperatura (°C)	65,0	65,0	65,0	65,0	75,0	75,0	75,0	75,0	70,0	70,0	70,0	70,0	61,5	78,5	70,0	70,0	70,0
H ₂ O ₂ c etapa 1 (% bps)	0,64	0,69	0,93	0,66	0,68	0,86	0,96	0,99	0,85	1,05	0,57	0,71	0,97	1,00	0,89	0,88	0,93
H ₂ O ₂ c etapa 2 (% bps)	0,61	0,55	0,55	0,53	0,20	0,84	0,51	0,95	0,63	1,06	0,32	0,48	0,53	0,87	0,66	0,55	0,54
H ₂ O ₂ c total (% bps)	1,25	1,24	1,48	1,19	0,88	1,70	1,47	1,94	1,48	2,11	0,89	1,19	1,50	1,87	1,55	1,43	1,47
H ₂ O ₂ r etapa 1 (% bps)	1,86	1,81	2,57	2,84	1,82	1,64	2,54	2,51	2,15	1,95	1,59	3,13	2,03	2,00	2,11	2,12	2,07
H ₂ O ₂ r total (% bps)	3,75	3,76	5,52	5,81	4,12	3,30	5,53	5,06	4,52	3,89	3,43	6,49	4,50	4,13	4,45	4,57	4,53
Álcali c. etapa 1 (% bps)	0,67	0,76	0,62	0,76	0,73	1,01	0,77	1,04	0,60	1,00	0,72	0,78	0,56	0,95	0,84	0,79	0,75
Álcali c. Total (% bps)	1,89	1,91	1,85	2,06	1,69	2,21	2,19	2,33	1,96	2,38	1,88	2,01	1,80	2,42	1,95	1,94	2,00
pH final etapa 1	10,6	10,6	10,8	10,5	10,8	10,6	10,7	10,5	10,9	10,7	10,9	10,7	10,9	10,7	10,1	10,1	10,2
pH final etapa 2	10,7	10,7	10,9	10,6	10,7	10,7	10,6	10,6	10,9	10,8	10,9	10,7	10,9	10,7	10,3	10,3	10,2
V.E. (cm ³ /g)	2,04	2,09	2,08	2,07	2,09	2,06	2,13	2,06	2,09	2,00	2,07	2,17	2,16	2,09	2,06	2,12	2,12
I. Explosión (mN/kg)	1,43	1,56	1,53	1,40	1,57	1,64	1,40	1,56	1,55	1,58	1,42	1,57	1,43	1,55	1,56	1,34	1,60
I. Tracción (Nm/g)	31,3	32,6	30,5	31,3	35,6	40,2	31,3	35,8	34,2	34,4	34,2	31,3	33,2	33,1	32,7	30,8	35,8
I. Rasgado (Nm ² /kg)	3,20	3,53	3,32	3,09	4,12	4,35	4,27	4,09	3,38	3,47	3,29	3,20	3,27	3,26	3,02	2,63	3,19

Tabla A2: resultados de las propiedades ópticas de las pulpas blanqueadas

n° de experiencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Consistencia (% ps)	17	23	17	23	17	23	17	23	15	25	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ Inicial total (% bps)	5,0	5,0	7,0	7,0	5,0	5,0	7,0	7,0	6,0	6,0	4,3	7,7	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Temperatura (°C)	65,0	65,0	65,0	65,0	75,0	75,0	75,0	75,0	70,0	70,0	70,0	70,0	61,5	78,5	70,0	70,0	70,0
L*	93,01	93,11	93,14	93,44	93,43	94,02	94,01	94,48	93,24	93,91	93,31	93,76	92,24	93,58	93,60	93,84	93,76
a*	-1,53	-1,71	-1,17	-1,72	-1,75	-1,95	-1,81	-1,64	-1,42	-1,39	-1,93	-1,68	-1,20	-1,73	-2,03	-1,97	-1,87
b*	14,13	13,48	12,98	12,08	11,12	11,19	10,04	9,65	13,15	10,06	13,40	12,08	14,30	13,75	11,93	12,03	11,91
Opacidad (%)	99,24	99,61	99,47	99,08	98,53	98,42	98,45	99,5	99,67	99,02	98,96	99,43	99,49	99,5	98,46	99,14	98,7
Coef. Dispersión (s)	32,26	51,79	32,72	33,26	29,49	30,43	31,93	43,16	42,88	34,00	31,47	37,67	32,35	39,78	30,46	35,29	32,08
Coef. Absorción (k)	0,47	0,74	0,59	0,41	0,33	0,29	0,32	0,40	0,62	0,37	0,40	0,45	0,61	0,50	0,33	0,38	0,35
K/s inicial calculado	0,0287	0,0248	0,0257	0,0226	0,0231	0,0198	0,0213	0,0179	0,0263	0,0196	0,0240	0,0217	0,0259	0,0189	0,0235	0,0233	0,0233
k/s final calculado	0,0360	0,0345	0,0336	0,0309	0,0292	0,0273	0,0252	0,0230	0,0335	0,0257	0,0336	0,0298	0,0388	0,0334	0,0300	0,0293	0,0295
k/s final medido	0,0146	0,0143	0,0180	0,0123	0,0112	0,0095	0,0100	0,0093	0,0145	0,0109	0,0127	0,0119	0,0189	0,0126	0,0108	0,0108	0,0109
D _{blan1e}	31,9	32,3	32,7	34,1	35,8	37,0	37,9	38,2	34,7	35,8	33,5	36,4	32,3	38,2	33,6	34,3	33,5
D _{blan2e}	28,2	30,6	30,1	32,0	31,7	33,9	32,9	35,2	29,7	34,0	31,1	32,6	30,0	34,5	31,5	31,6	31,6
Cons _{blan1e}	9,128	8,873	10,246	11,938	8,929	9,485	10,254	11,396	9,661	11,551	9,311	12,355	8,224	10,375	11,657	10,546	11,459
Cons _{blan2e}	4,433	4,052	4,917	3,719	2,776	5,015	4,468	5,511	4,983	6,206	2,862	3,650	5,000	5,420	4,921	4,525	4,652
Blanco final 2E (% ISO)	71,7	74,1	73,6	75,5	75,2	77,4	76,4	78,7	73,2	77,5	74,6	76,1	73,5	78,0	75,0	75,1	75,1
Blanco revenido 2E (% ISO)	67,30	68,19	68,75	70,39	71,42	72,60	73,87	75,28	68,77	73,56	68,75	71,03	65,58	68,85	70,94	71,32	71,24
Reversión (% ISO)	4,4	6,0	4,8	5,2	3,8	4,8	2,5	3,4	4,4	4,0	5,9	5,1	7,9	9,1	4,0	3,8	3,8



COMPARACIÓN DEL BLANQUEO EN UNA Y DOS ETAPAS DE PULPAS QUIMIMECÁNICAS INDUSTRIALES

Area, M. C. / Felissia, F. E. / Barboza, O. M.

Programa de Investigación de Celulosa y Papel, FCEQyN, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552 (3300), Posadas, Misiones, Argentina

INDUSTRIAL CHEMI-MECHANICAL PULPS BLEACHING: ONE STAGE AND TWO STAGE COMPARISON

ABSTRACT

The objective of this work is to compare a one-stage and a two-stage processes performance, in hydrogen peroxide bleaching of a hardwood chemi-mechanical pulp. Cold soda pulps from Celulosa Argentina S.A. Zárate mill were used as raw material (eucalyptus-poplar mixtures). Preliminary tests were made to observe the pulp behavior using a one- or a two-stage bleaching process as a function of the reaction time. Based on laboratory results, a two stage bleaching process is considered the best option. Alternatives of process modification are proposed supported by the present mill technology.

KEY WORDS: bleaching, hydrogen peroxide, stages, high yield pulps, hardwoods.

RESUMEN

El objetivo del trabajo es comparar el blanqueo con peróxido de hidrógeno de pulpas quimimecánicas de latifoliadas implantadas, utilizando procesos en una y dos etapas. Se emplearon pulpas a la soda fría de mezclas salicáceas y eucalyptus provenientes de la fábrica Zárate de Celulosa Argentina S.A. Se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de observar el comportamiento de la pulpa al aplicar un blanqueo en una y dos etapas, con respecto al tiempo de reacción. Sobre la base de los resultados de laboratorio, se considera superior la aplicación de un sistema de blanqueo en dos etapas. Se proponen alternativas de modificación del proceso aprovechando la tecnología disponible en la fábrica.

PALABRAS CLAVE: blanqueo, peróxido de hidrógeno, etapas, pulpas de alto rendimiento, latifoliadas.

INTRODUCCIÓN

El objetivo del trabajo es comparar el blanqueo con peróxido de hidrógeno de pulpas quimimécánicas de latifoliadas implantadas, utilizando procesos en una y dos etapas. La propuesta trata de disminuir el costo global del blanqueo de las pulpas (regulado básicamente por la cantidad de peróxido de hidrógeno consumido), sin producir modificaciones en el blanco final.

Se emplearon pulpas a la soda fría de mezclas salicáceas y eucalyptus provenientes de la fábrica Zárata de Celulosa Argentina S.A. En el momento en que se realizó el trabajo, esta fábrica presentaba la particularidad de contar con dos torres de flujo ascendente en su sistema de blanqueo funcionando en serie. Los reactivos se aplican en una carga única, en un punto previo a la primera torre. Más datos sobre el proceso de blanqueo de esta fábrica pueden encontrarse en la referencia [1].

Para la selección de las variables de mayor influencia sobre este tipo de pulpas, se realizó un trabajo de “tamizado o *screening*” [2]. Se observó que los valores de blanco y resistencias físico-mecánicas son mayores en los niveles superiores de las variables en estudio, y basándose en esto se decidió desplazar el rango de consistencia, concentración de peróxido de hidrógeno y temperatura.

Sin embargo, debido a que a partir de febrero de 1995 la fábrica de referencia realizó modificaciones en el proceso de producción de pulpas, entre ellas el aumento de la consistencia de refinación en la 2ª etapa, se produjeron notables variaciones en la calidad de las pulpas crudas. Por esto, se realizaron algunos ensayos preliminares ya que se hizo necesario comprobar la validez de las conclusiones del trabajo anteriormente mencionado de selección de variables y de condiciones de blanqueo, válidas para las pulpas obtenidas en el año 1994. Finalmente, en

base a estos ensayos preliminares, se decidieron las condiciones del diseño experimental definitivo [3].

METODOLOGÍA

La base de este estudio puede encontrarse en artículos anteriores [1, 4]. En ellos se describe detalladamente la metodología del blanqueo en fábrica, y la utilizada en laboratorio para obtener los resultados en una y dos etapas, así como el diseño experimental utilizado.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de observar el comportamiento de la pulpa, al blanqueo en una y dos etapas, con respecto al tiempo de reacción. Para esta prueba se utilizaron niveles fijos de las variables de los trabajos en una y dos etapas, situándolas en el punto de menor carga de peróxido de hidrógeno y mayor eficiencia de blanqueo (consistencia: 20% y temperatura: 70°C).

Los valores de consumo de peróxido e incremento de blanco obtenidos se presentan en las Tablas 1 y 2 y en la Figura 1.

En la Tabla 3 y en la Figura 2 se muestra la comparación de la ganancia de blancura y del consumo de peróxido por unidad de ganancia de blancura en 1E y 2E en las experiencias del diseño experimental utilizado.

Las Figuras 3 a 6 presentan los consumos de peróxido por unidad de ganancia de blancura en una etapa y en dos etapas, en función de las variables en estudio.

Las ecuaciones 1 y 2 muestran las predicciones de consumo de peróxido por unidad de incremento de blanco en una etapa y dos etapas en función de las variables significativas transformadas (0, -1, +1, etc.).

Tabla 1: consumos de peróxido de hidrógeno (bps) en una etapa (1E).

TIEMPO	Cons1E	Cons1E global	Blancura ISO 1E	Dblan 1E	ConsDBlan1E	ConsDBlan total**
1h	1,12	1,12	72,88	29,38	0,04	0,54
2h	0,37	1,49*	75,79	2,91	0,13	0,05
				32,29		

* Consumo en la 1ª hora + la 2ª hora. ** Consumo total/variación de blancura total.

Tabla 2: consumos de peróxido de hidrógeno (bps) en dos etapas (2E)

TIEMPO	Cons2E	Cons2E global	Blancura ISO 2E	Dblan2E	ConsDBlan2E
1h (E1)	0,57	0,57			
1h (E2)	0,32	0,89*	74,60	31,10	0,03**

* Consumo de las dos etapas. ** Consumo total/variación de blancura total.

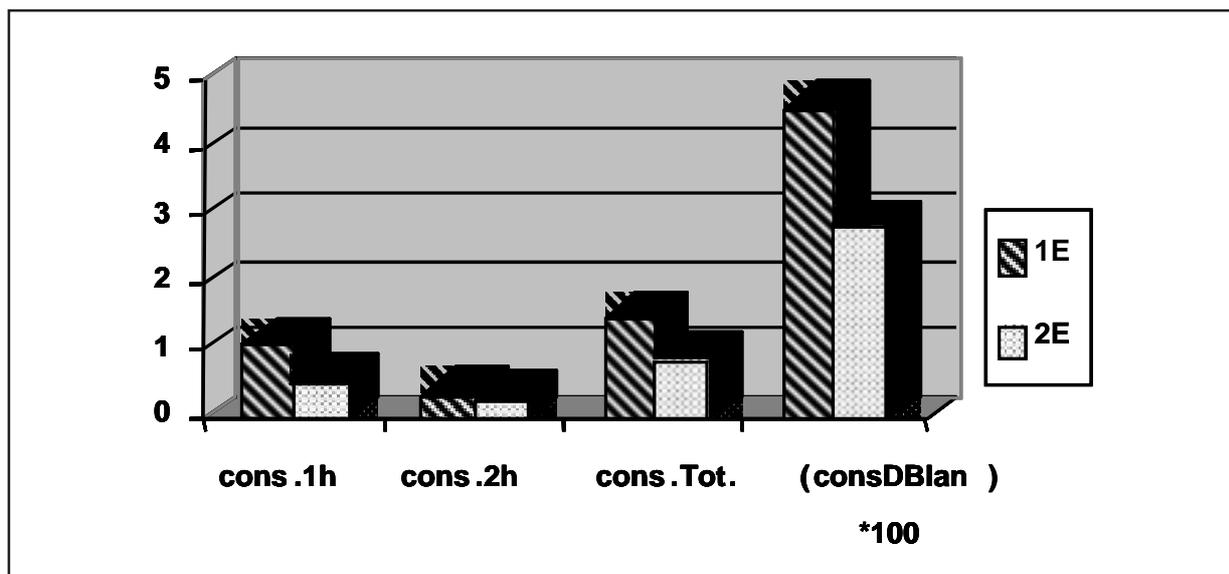


FIGURA 1: comparación del consumo de peróxido por unidad de ganancia de blancura en la primera y segunda hora de tratamiento.

Tabla 3: resultados del blanqueo en 1E y 2E

Experiencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Consistencia (% bps)	17	23	17	23	17	23	17	23	15	25	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ Inicial total (% bps)	5,0	5,0	7,0	7,0	5,0	5,0	7,0	7,0	6,0	6,0	4,3	7,7	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Temperatura (°C)	65,0	65,0	65,0	65,0	75,0	75,0	75,0	75,0	70,0	70,0	70,0	70,0	61,5	78,5	70,0	70,0	70,0
DBlan1E	31,9	32,3	32,7	34,1	35,8	37,0	37,9	38,2	34,7	35,8	33,5	36,4	32,3	38,2	33,6	34,3	33,5
DBlan2E	28,2	30,6	30,1	32,0	31,7	33,9	32,9	35,2	29,7	34,0	31,1	32,6	30,0	34,5	31,5	31,6	31,6
ConsDBlan1E (x 100)	9,13	8,87	10,25	11,94	8,93	9,48	10,25	11,40	9,66	11,55	9,31	12,35	8,22	10,37	11,66	10,55	11,46
ConsDBlan2E (x 100)	4,4	4,05	4,92	3,72	2,78	5,01	4,47	5,51	4,98	6,21	2,86	3,65	5,00	5,42	4,92	4,52	4,65

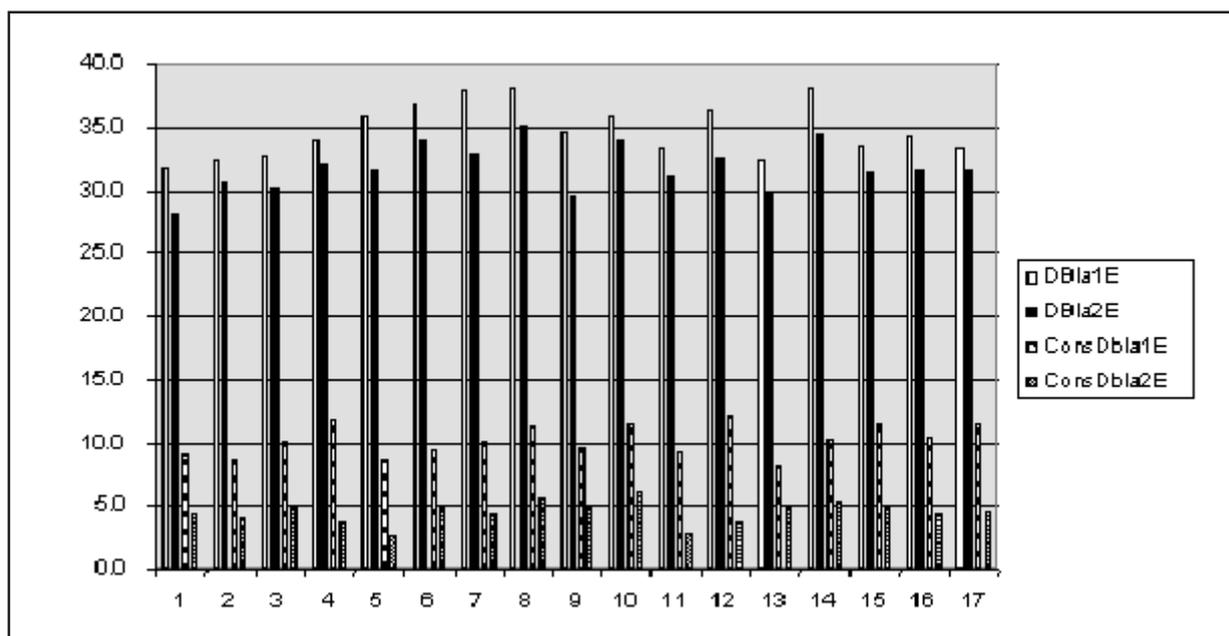


FIGURA 2: comparación de la ganancia de blancura y del consumo de peróxido por unidad de ganancia de blancura en una etapa (1E) y en dos etapas (2E).

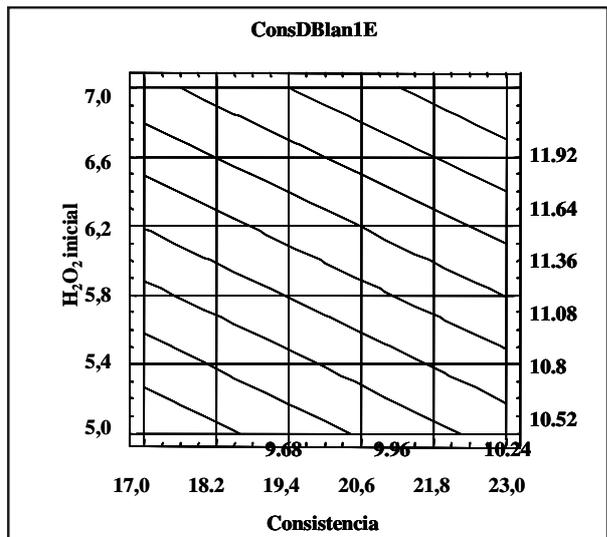


FIGURA 3: consumos de peróxido por unidad de ganancia de blancura en una etapa (1E), en función del H₂O₂ inicial y la consistencia.

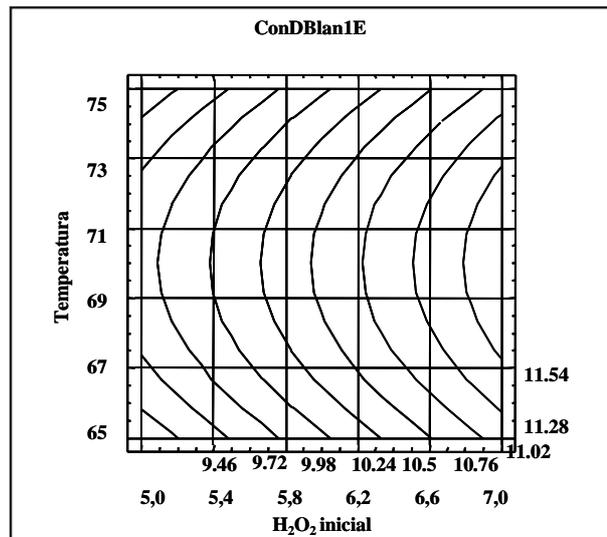


FIGURA 4: consumos de peróxido por unidad de ganancia de blancura en una etapa (1E), en función de la temperatura y el H₂O₂ inicial.

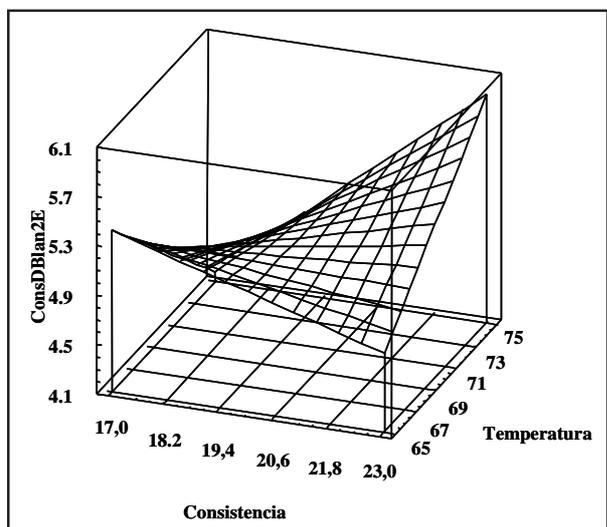


FIGURA 5: consumos de peróxido por unidad de ganancia de blancura en dos etapas (2E), en función de la temperatura y la consistencia.

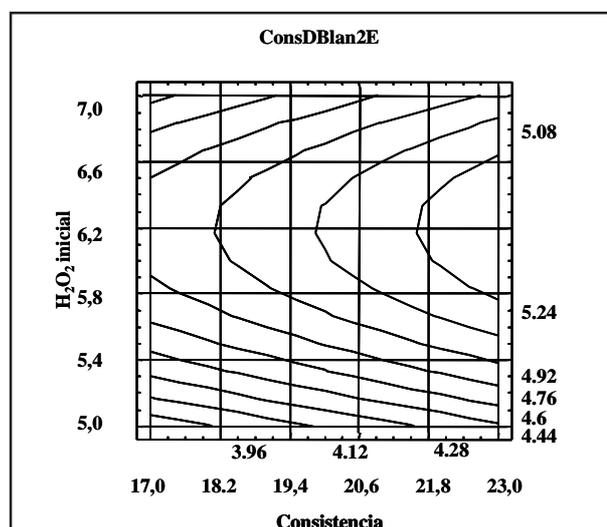


FIGURA 6: consumos de peróxido por unidad de ganancia de blancura en dos etapas (2E), en función del H₂O₂ inicial y la consistencia.

$$\text{ConsDBlan1E} = 10,81 + 0,46 * \text{consistencia} + 0,92 * \text{H}_2\text{O}_2 - 0,61 * (\text{temperatura})^2 \quad (1)$$

$$\text{ConsDBlan2E} = 5,07 + 0,27 * \text{consistencia} + 0,27 * \text{H}_2\text{O}_2 + 0,61 * (\text{consistencia} * \text{temperatura}) \quad (2)$$

Los Gráficos de valores observados *versus* valores predichos por las ecuaciones 1 y 2 se presentan en las Figuras 7 y 8.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La comparación entre el blanqueo en una etapa y en dos etapas utilizando las mismas condiciones se muestra en las Figuras 1 y 2 y en la Tabla 1. Es evidente que el consumo de reactivos en ambos casos es mayor en la pri-

mera hora, produciendo además el mayor incremento de blanco. En la hora posterior se evidencia que el sistema presenta gran dificultad en aumentar la blancura cuando este se encuentra cerca de sus valores máximos. Si bien la blancura final obtenida es prácticamente igual en una etapa que en dos etapas, la misma se logra en este último caso con la mitad de gasto del reactivo.

Los consumos de H₂O₂ por cada punto de ganancia de blancura en una etapa aumentan con la carga inicial de H₂O₂ y la consistencia, presentando un máximo en el punto central de temperatura (Figuras 3 y 4). En el caso de dos etapas, el máximo consumo por unidad de incremento de blanco se presenta en el punto central del H₂O₂ inicial, máxima consistencia y máxima temperatura (Figuras 5 y 6). La Figura 5 muestra el efecto de la interacción consistencia-temperatura en la eficiencia del blan-

queo en dos etapas. Es evidente el beneficio de trabajar a baja consistencia y elevadas temperaturas.

En las Figuras 7 y 8 se observa la calidad del ajuste de las ecuaciones obtenidas.

En la Figura 9 se observa que en ambos procesos (una y dos etapas) los residuales de peróxido son elevados.

La recirculación de esta fracción residual depende de un buen diseño del balance de agua. La excesiva dilución de los reactivos podrá solamente prevenirse a través de un reciclo efectivo y un lavado eficiente.

En un sistema típico de blanqueo en una etapa (de media o alta consistencia) la pulpa es espesada en una prensa de gran eficiencia (doble tela, tornillo, etc.) hasta una consistencia del 50%. Los reactivos de blanqueo se introducen a la entrada de la torre, que en general es de flujo descendente. Su función es mantener a la pulpa en

contacto con el licor durante el tiempo de residencia preestablecido.

A la salida de la torre, previo agregado de agua de dilución, la pulpa es espesada nuevamente, permitiendo la eventual recuperación de los reactivos residuales, que son recirculados a la entrada de la torre.

En un sistema óptimo en dos etapas, el esquema prensa-torre se repite dos veces, seguido de una tercera prensa lavadora al final del proceso [5, 6]. El licor que se incorpora en la primera torre es el residual extraído por la última prensa a la salida de la segunda torre.

A la entrada de la segunda torre se incorpora el licor conteniendo los reactivos frescos a la pulpa.

El líquido extraído por la prensa intermedia (segunda prensa) es retirado del sistema, ya que contiene una muy baja carga de residuales, y todas las sustancias contenidas en la pulpa, susceptibles de extraerse en álcalis. Estas

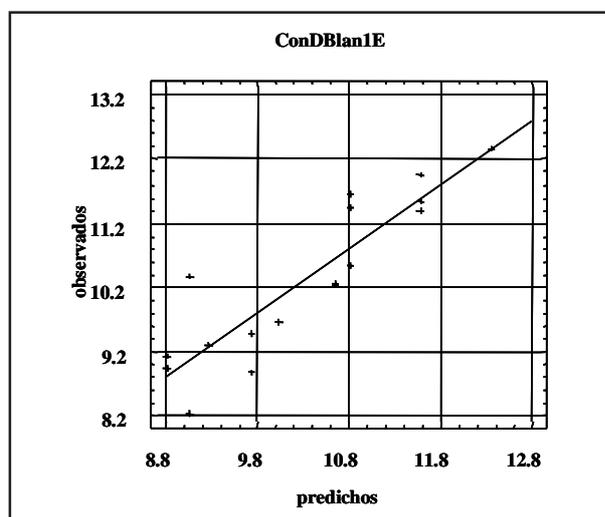


FIGURA 7: valores observados *versus* predichos de consumo sobre diferencia de blanco en una etapa (ConDBlan1E) según la ecuación 1 ($R^2= 0,7892$).

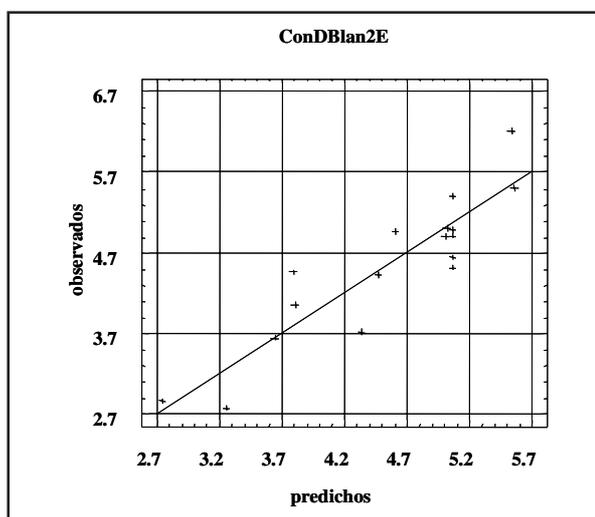


FIGURA 8: valores observados *versus* predichos de consumo sobre diferencia de blanco en dos etapas (ConDBlan2E) según la ecuación 2 ($R^2= 0,8181$).

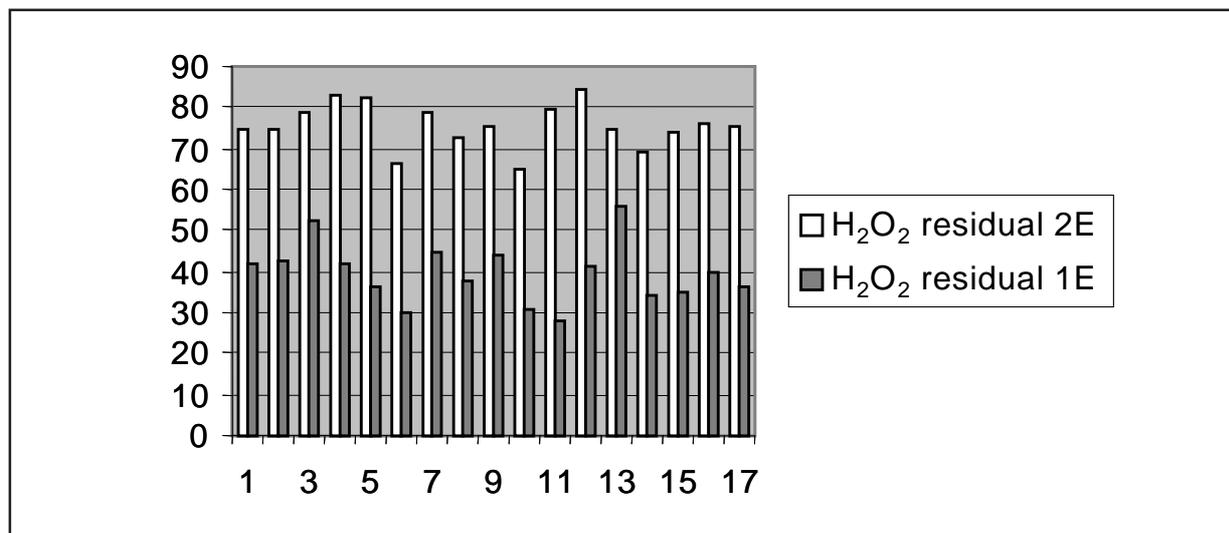


FIGURA 9: residuales de peróxido de hidrógeno del blanqueo en una y dos etapas (1E y 2E) como porcentaje de la carga inicial.

sustancias no deseadas consumen peróxido de hidrógeno vía reacciones secundarias no deseadas en el blanqueo.

Cuando los residuales son elevados, un sistema en dos etapas es ideal, ya que permite un importante porcentaje de recirculación, independientemente de la consistencia de blanqueo. Esto se debe a que la regulación de la consistencia se realiza con una sola corriente de licor en cada torre (los residuales en la primera, y el licor fresco en la segunda). Por el contrario, con una sola torre, la cantidad de licor que puede recircularse está limitada por la consistencia de entrada de la pulpa y la dilución de los reactivos que ingresan.

En este esquema en dos etapas, la existencia de las tres prensas es ampliamente justificada. La primera aumenta la capacidad de recirculación, la segunda mejora la limpieza de la pulpa, y la tercera permite la máxima recuperación de reactivos residuales.

La incorporación de agua a la salida de la segunda torre es necesaria para aumentar la recuperación de los reactivos. Los volúmenes de licor fresco de blanqueo y de agua de dilución se encuentran en el orden de 0,2 y 2 m³/ton de pulpa seca, y de 0,2 y 4 m³/ton de pulpa seca, en un blanqueo en una y dos etapas respectivamente [6].

Con dos etapas de blanqueo, cuanto mayor es la diferencia de consistencia de la pulpa entre la entrada y la salida de la prensa, mayor es la cantidad de licor residual que puede recircularse. Para maximizar el volumen de licor a recircular, la consistencia en la primera torre debe

ser mucho menor que en la segunda. Así, la utilización de media consistencia en la primera torre y alta consistencia en la segunda, permite el mayor aprovechamiento de los reactivos residuales.

La mejor propuesta para la optimización de un sistema de blanqueo, basada en la máxima recuperación de reactivos, incluye entonces la aplicación de un sistema de blanqueo en dos etapas, con tres prensas de alta eficiencia, una a la entrada de la primera torre, una intermedia, y una a la salida de la última torre. La Figura 10 ilustra este esquema.

Una representación del sistema de blanqueo existente en la fábrica se ilustra en la Figura 11.

Para aprovechar parte de la tecnología existente en la fábrica, y sobre la base de los resultados de laboratorio, se sugiere la alternativa de incorporar el 50% del licor con reactivos frescos antes de la primera torre, y 50% en el ingreso de la pulpa a la segunda. Se mantiene la primera torre de media consistencia con flujo ascendente, incorporando una prensa de alta eficiencia antes de la segunda torre, y se modifica la segunda torre para que funcione a alta consistencia con flujo descendente. El licor residual extraído en la última prensa se recircula distribuyéndolo en tres puntos: a los mezcladores previos a la primera y la segunda torre, y como agua de dilución del fondo de la segunda torre. El licor extraído de la primera prensa es enviado al filtro lavador de pulpa cruda, para

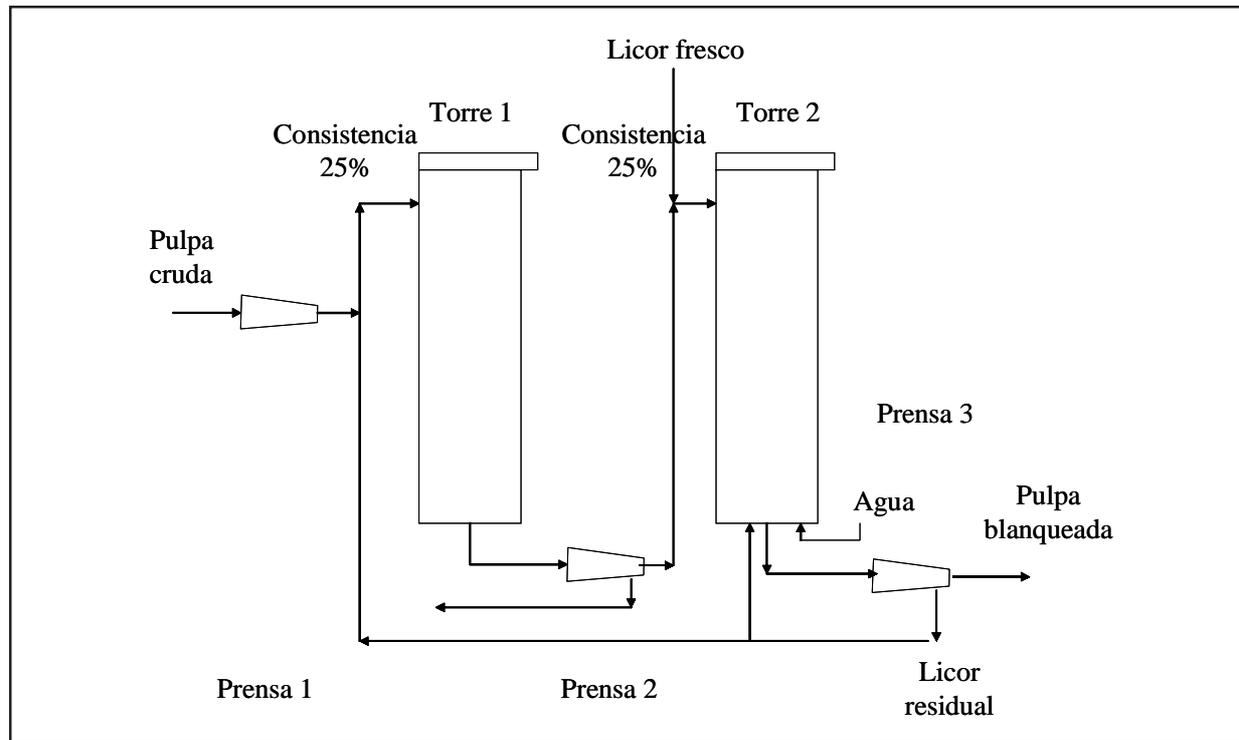


FIGURA 10: sistema óptimo de blanqueo en dos etapas [adaptado de (6)].

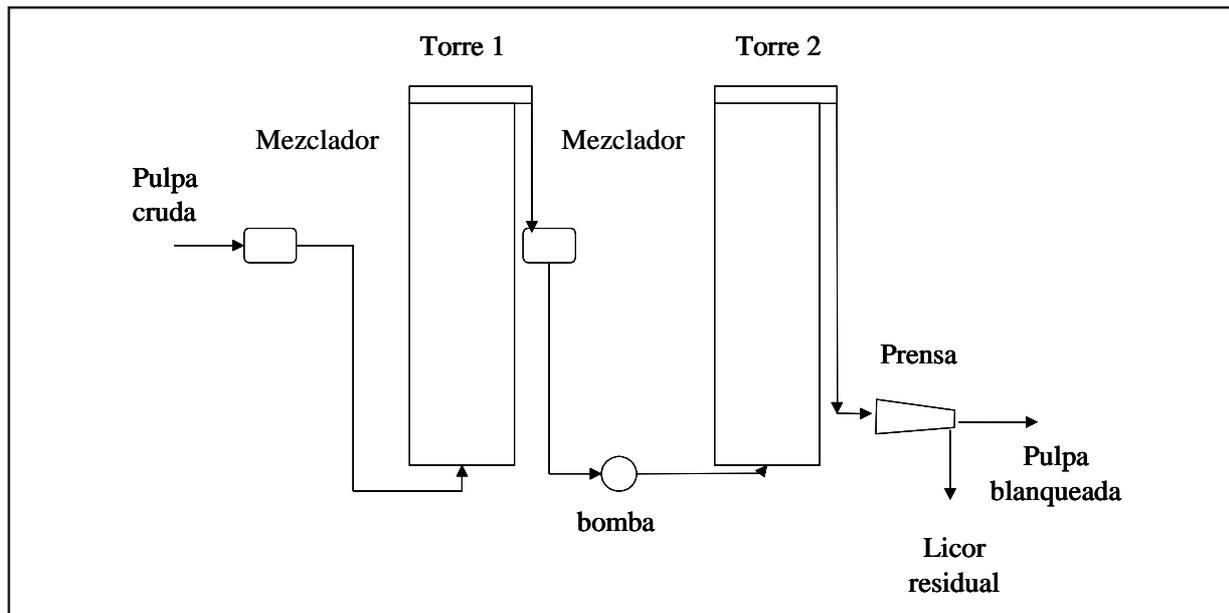


Figura 11: sistema de blanqueo en actual de fábrica (dos torres, una etapa).

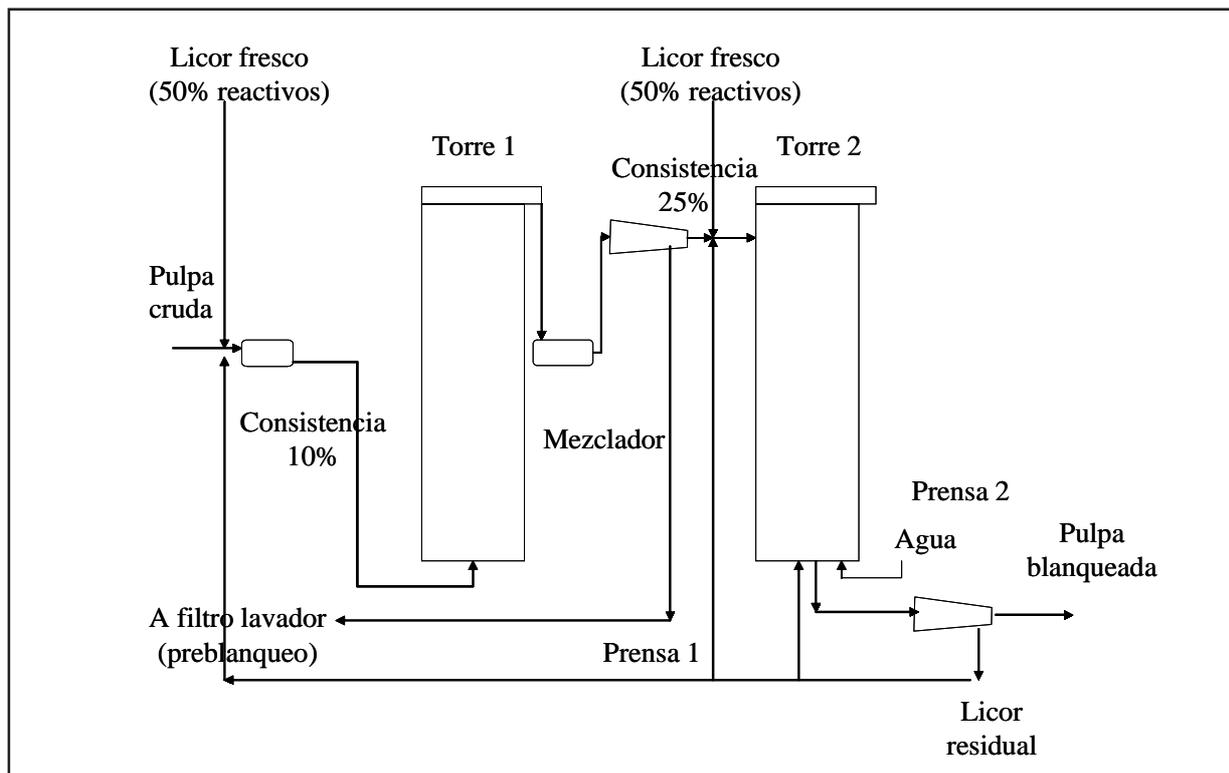


Figura 12: sistema de blanqueo en dos etapas, propuesto.

aprovechar los eventuales residuales. El sistema propuesto se presenta en la Figura 12.

Las modificaciones propuestas permitirían, de acuerdo con los resultados de laboratorio, reducir a la mitad la carga de peróxido total aplicada, con la consiguiente reducción de costos.

Por ejemplo, un blanqueo en una etapa con una carga total de 6% de H_2O_2 , a un costo aproximado de reactivos de blanqueo de U\$S 25 por tonelada de pulpa,

en la producción de 100 t/día (33.000 t/año) representa un costo de reactivos de U\$S 1.650.000.-. Por tanto, la aplicación del blanqueo en dos etapas, con la carga total repartida en partes iguales en dos etapas, suponiendo una reducción del 50% en la carga de reactivos, representa una importante disminución en los costos anuales.

De acuerdo con las inversiones a realizar (costo de incorporación de una prensa, transformación de la segun-

da torre, y otros gastos menores) puede calcularse el tiempo de amortización.

Para obtener las mejores condiciones de aplicación y recirculación de reactivos, debería realizarse la simulación del proceso propuesto, sobre la base de las ecuaciones obtenidas.

CONCLUSIONES

- Tanto en una etapa como en dos etapas se obtuvieron similares blancuras finales, siendo los valores máximos de aproximadamente de 79% ISO.

- El máximo valor de blancura obtenido con el blanqueo en dos etapas fue de 78,7% ISO. Este se obtuvo trabajando con una consistencia de 23%, 7% de peróxido, y 75°C de temperatura. Estos resultados coinciden con los obtenidos utilizando una sola etapa.

- Estas pulpas muestran dificultad para superar blancuras de 79% ISO utilizando un blanqueo en una o dos etapas y con diferentes niveles de las variables estudiadas. Hay que considerar que los resultados de laboratorio siempre son inferiores a los obtenidos en escala industrial.

- Si bien la blancura final obtenida es prácticamente igual en una etapa que en dos etapas, la misma se logra en este último caso con la mitad de gasto del reactivo.

- Se plantea la aplicación de un sistema de blanqueo en dos etapas para optimizar el sistema de blanqueo de la fábrica de referencia. ●

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Venica. A Celulosa Argentina.

REFERENCIAS

1. **Area**, M. C.; **Venica**, A. D. *Aplicación del diseño de experiencias en la optimización del blanqueo a escala industrial*. Investigación y técnica del papel, n° 135, pp.9-21, enero 1998.
2. **Area**, M. C.; **Barboza**, O. M. *Análisis de la influencia de las variables de blanqueo en las propiedades de pastas quimimecánicas*. Investigación y Técnica del Papel, n° 125, pp.487-499, 1995.
3. **Area**, M. C.; **Barboza**, O. M.; **Felissia**, F. E. *Optimización del blanqueo en una etapa de pulpas quimimecánicas industriales*. Investigación y Técnica del Papel, n° 138, pp. 635-651, octubre 1998.
- 4-**Area**, M. C.; **Felissia**, F. E.; **Barboza**, O. M. *Blanqueo en dos etapas de pulpas químico-mecánicas industriales*. Revista de Ciencia y Tecnología, n° 5, pp. 29-39, 2003. (En este número).
- 5-**Stand**, E.; **Moldenius**, S.; **Koponen**, R.; **Viljakainen**, E.; **Edwards**, L. L. *Optimization of peroxide bleaching systems*. Tappi Journal, n° 7, pp. 130-134, 1988.
6. **Meyrant**, P.; **Dodson**, M. *High consistency bleaching: a must for high brightness targets?* Tappi Journal, n° 1, 109-114, 1990.

ABREVIATURAS

1E: 1 etapa o primera etapa

2E: 2 etapas o segunda etapa

bps: base pulpa seca 100%

Cons1E: consumo de peróxido de hidrógeno en el blanqueo en 1 etapa (%bps)

Cons2E: consumo de peróxido de hidrógeno en el blanqueo en 2 etapas (%bps)

ConsDBlan: (peróxido de hidrógeno consumido / Dblan) * 100

DBlan: diferencia de blanco (blanco inicial – blanco final)



CAMBIOS HEMÁTICOS ATRIBUIBLES AL *GOSIPOL* EN TERNEROS DESTETE SUPLEMENTADOS CON SEMILLA DE ALGODÓN

¹Coppo, J. A. / ²Coppo, N. B.

¹Prof. Tit.. ²Prof. Adj. Cátedra de Fisiología General.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, U.Na.M. Félix de Azara 1552,
Posadas (3300), Misiones, Argentina. E-mail: jcoppo@vet.unne.edu.ar

GOSSYPOL ATTRIBUTABLE HEMATIC CHANGES IN COTTONSEED SUPPLEMENTED WEANED CALVES.

ABSTRACT

The purpose of this assay is to investigate the appearance of undesirable secondary effects connected to hematic, renal, hepatic, and muscular functions, in cottonseed supplemented calves. This energetic-proteic forage of low cost, possesses high fat and protein concentration, but contains *gossypol*, a toxic polyphenol able to cause severe organic damage in certain doses. Sixty half-bred British x Zebu weaned calves (7-9 months old and 200 kg liveweight), were randomized in control lot C (n=30), maintained on natural pasture, and supplemented lot S (n = 30), which received cottonseed (2 kg/animal/day) during 5 months (Autumn-Winter). Weighings and biochemical determinations were monthly carried out on C and S animals. In most of the parameters studied, repeated Anova measures indicated significance of both, treatment and time effects (p<0.05), although the interaction between them was not significant. Orthogonal contrasts pointed out that differences between C and S began to be significant on the 90th day of the supplementation start. Diarrheas were registered initially in S, without deaths in any lot. When the assay was concluded, significant decreases of neutrophils were verified in C, attributable to the ontogeny; declines of erythrogram parameters, attributable to pasture winter impoverishment were also verified. In S, significant increases of packet cell volume (42.1 versus 36.7%), erythrocytes (7.93 versus 6.95 T/l) and hemoglobin (15.1 versus 11.4 g/dl) were verified, which are attributed to cottonseed nutritional supply, as well as increments of total leukocytes (12.40 versus 9.85 G/l), neutrophils (4.84 versus 3.05 G/l), eosinophils (0.62 versus 0.39 G/l), gamma glutamyl transferase (29 versus 15 IU/l), alkaline phosphatase (236 versus 175 IU/l), aspartate amino transferase (61 versus 45 IU/l) and lactate dehydrogenase (711 versus 407 IU/l), which are interpreted as ontogenic changes and/or undesirable secondary effects caused by both, gossypol and dietary fat excess.

KEY WORDS: calves, supplementation, cottonseed, gossypol, hemogram, enzymogram.

RESUMEN

El propósito del ensayo fue indagar la aparición de efectos secundarios indeseables atinentes a las funciones hepática, renal, muscular y sanguínea en terneros suplementados con semilla de algodón. Este forraje energético-proteico, de bajo costo, posee altas concentraciones de grasa y proteína, pero contiene *gossypol*, un polifenol tóxico que en determinadas dosis es capaz de provocar severos daños orgánicos. Sesenta terneros destete cruce cebú x británico (7-9 meses de edad y 200 kg de peso) fueron aleatorizados en lote control C (n = 30), a pastura natural, y lote suplementado S (n = 30), quienes recibieron semilla de algodón (2 kg/animal/día) durante cinco meses (otoño-invierno). Mensualmente los animales fueron sometidos a pesajes y determinaciones bioquímicas. El

Anova de medidas repetidas indicó que los *efectos tratamiento* y *tiempo* resultaron significativos para la mayoría de los análisis estudiados ($p < 0.05$), no así la *interacción* entre ambos. Los contrastes ortogonales señalaron que las diferencias entre C y S comenzaron a ser significativas a los 90 días de iniciada la suplementación. Clínicamente se registraron diarreas iniciales en S, sin que se produjeran muertes en ningún lote. Al finalizar el ensayo, en C se constataron disminuciones significativas de neutrófilos, imputables a la ontogenia, así como de parámetros del eritrograma, atribuibles al empobrecimiento invernal de las pasturas. En S se verificaron aumentos significativos de hematocrito (42.1 *versus* 36.7%), eritrocitos (7.93 *versus* 6.95 T/l) y hemoglobina (15.1 *versus* 11.4 g/dl), que se atribuyen al aporte nutricional efectuado por la semilla de algodón, así como de leucocitos totales (12.40 *versus* 9.85 G/l), neutrófilos (4.84 *versus* 3.05 G/l), eosinófilos (0.62 *versus* 0.39 G/l), gammaglutamiltransferasa (29 *versus* 15 UI/l), fosfatasa alcalina (236 *versus* 175 UI/l), aspartatoaminotransferasa (61 *versus* 45 UI/l) y lactatodehidrogenasa (711 *versus* 407 UI/l), que se interpretan como cambios ontogénicos y/o efectos secundarios indeseables provocados por el *gosipol* y el exceso de grasa dietaria.

PALABRAS CLAVES: terneros, suplementación, semilla de algodón, *gosipol*, hemograma, enzimograma.

INTRODUCCIÓN

La semilla de algodón es un económico suplemento energético-proteico para el ganado, poseyendo 18-27% de proteínas, 20-23% de fibra y 96-98% de nutrientes digeribles totales, con una energía metabolizable de 3.5-3.9 Mcal/kg [1, 2]. Lamentablemente, su tenor graso es excesivo (21-24%) y también contiene *gosipol*, un polifenol tóxico cuya concentración dependería del tipo de algodónero, clima donde se cultiva y características del suelo [3]. La tolerancia al *gosipol* variaría según la especie y edad del animal [4, 5, 6]; la mayor susceptibilidad correspondería a los monogástricos (cerdo, perro), luego a los rumiantes jóvenes (terneros, corderos) y por último a las gallinas [7]. En ganado bovino parecerían existir susceptibilidades distintas según la raza: ante dosis similares del tóxico, habrían sucumbido terneros Holstein y sobrevivido otros de raza Jersey [8].

Debido a su elevado tenor graso, la semilla de algodón produciría en el corto plazo diarreas en el ganado bovino; a largo plazo afectaría la capacidad reproductiva de vacas lecheras [9]. El *gosipol* y los ácidos grasos ciclopropenoides de la semilla de algodón se comportarían como *factores anti-nutricionales*, inhibiendo la proteólisis en el tubo digestivo [10]; los rumiantes serían menos sensibles que los monogástricos porque en el rumen una parte del *gosipol* se combinaría con proteínas para dar origen a complejos estables, no absorbibles [11, 12].

La intoxicación por *gosipol* cursa con retraso del desarrollo, pérdida de vivacidad, gastroenteritis, disnea, convulsiones y muerte [7, 13], provocando lesiones como enteritis, ascitis, hepatitis tóxica, nefritis, congestión esplénica, hidropericardio, degeneración miocárdica y edema pulmonar [7, 8, 13, 14]. Terneros de tres meses

alimentados con una ración conteniendo 13-20% de harina de algodón murieron por insuficiencia cardíaca precedida por hematuria; las necropsias habrían revelado lesiones hepáticas congestivas, degenerativas y necróticas [15]. Microscópicamente resaltarían en hígado las necrosis centrolobulillares y periacinares con áreas de degeneración grasa y fibrosis en casos crónicos; en corazón la degeneración y necrosis de las fibras miocárdicas, que se mostrarían vacuoladas y atrofiadas [16, 17].

El *gosipol* es espermostático, por lo que está siendo estudiado como potencial agente para el control reversible de la fertilidad masculina humana [18]. En toros tendría el mismo efecto, induciendo anomalías espermatocíticas [19], especialmente en la membrana del espermatozoide [20]. En roedores no alteraría la ovulación pero sí la espermatogénesis [8], inhibiendo enzimas necesarias para la concepción, tales como hialuronidasa, arilsulfatasa, acrosina y otras [21].

El objetivo del presente ensayo fue constatar la aparición de efectos secundarios indeseables en terneros cruzados categoría *destete*, suplementados durante un lapso prolongado con cantidades moderadas de semilla de algodón, mediante exámenes clínicos y un panel de pruebas de laboratorio concebidas para explorar las funciones hepática, renal, muscular y sanguínea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los trabajos se realizaron en un establecimiento ganadero ubicado en Leandro Alem (Misiones), sobre potreros de pastura natural donde predominaban las gramíneas perennes de ciclo estival y escasa calidad (4-6% de proteína bruta, 50% de digestibilidad, EM = 1,5 Mcal/kg MS). Se utilizaron 60 terneros *destete* cruzados

cebu x británico (2/3 Brahman 1/3 Hereford), de 7-9 meses de edad (alrededor de 200 kg de peso medio), clínicamente sanos y fenotípicamente homogéneos.

Bajo un diseño prospectivo de medidas repetidas, se aleatorizaron los lotes control (C) y suplementado (S), compuestos por 30 animales cada uno. El lote S fue suplementado con 2 kg diarios de semilla entera de algodón y los terneros del lote C fueron mantenidos a pastura natural. Todos los animales dispusieron de sal común (20-30 g/animal/día), acorde a la usanza del establecimiento. El ensayo se realizó entre los meses de abril y setiembre (150 días), efectuándose seis controles mensuales (días 0, 30, 60, 90, 120 y 150) que incluyeron pesajes, exámenes clínicos y pruebas de laboratorio.

A partir de sangre total anticoagulada con EDTA se determinaron concentraciones de eritrocitos y leucocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media (HCM) y concentración de HCM (CHCM) por método electrónico en analizador hematológico Sequoia-Turner 500. La fórmula leucocitaria fue obtenida por microscopía a partir de frotis coloreados según Giemsa. Mediante un espectrofotómetro automático UV-visible Zeltec ZL5000 se cuantificaron las actividades plasmáticas de aldolasa ALD (técnica cinética, lecturas a 340 nm, reactivos Boehringer), gammaglutamiltransferasa GGT (cinética, 405 nm, reactivos Wiener), fosfatasa alcalina ALP (cinética, 334 nm, reactivos GT-Lab), aspartatoaminotransferasa AST (técnica del oxoglutarato, 334 nm, reactivos Wiener), creatinfosfoquinasa CPK (cinética, 334 nm, reactivos GT-Lab) y lactatodehidrogenasa LDH (método optimizado, 340 nm, reactivos Wiener).

Informáticamente se efectuaron estadísticas descriptivas paramétricas (*software Statistix 1996*) que abarcaron normalidad distributiva (Wilk-Shapiro, WS), homogeneidad inicial (intervalos de confianza, IC±95%), ten-

dencia central (media aritmética, \bar{x}) y dispersión (desvío estándar, DE). El análisis de la variancia (Anova) de medidas repetidas (*software Statistica 1999*) permitió conocer la significancia ($p < 0,05$) de los efectos *tratamiento* y *tiempo*, así como la *interacción* entre ambos. Post-Anova se efectuaron comparaciones de medias por contrastes ortogonales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores iniciales obtenidos encuadraron en el intervalo de referencia para la cruce, edad, tipo de alimentación y zona geográfica considerada [22], resultando en cada analito estadísticamente homogéneos (IC±95%) y distribuyéndose con simetría gaussiana (WS); el Anova de medidas repetidas no detectó casos de *interacción tratamiento por tiempo* [23]. No se registraron muertes de animales atribuibles al forraje administrado, tan solo ocurrieron episodios diarreicos al inicio de la suplementación, que revirtieron rápidamente al producirse la adaptación a la dieta [9]. El peso aumentó significativamente en ambos lotes, resultando mayores las ganancias en S (542 g/animal/día) que en C (326 g/animal/día).

Eritrograma

En la Tabla 1 se consignan las estadísticas descriptivas obtenidas para cada uno de los parámetros del eritrograma. El hematocrito y la concentración de eritrocitos disminuyeron en los terneros del lote control y aumentaron en los suplementados. Hubo significación estadística para los efectos *tratamiento* y *tiempo*; las diferencias entre C y S comenzaron a ser significativas a partir de los 90 días de iniciada la suplementación. En S, la elevación de ambos parámetros se atribuye al efecto nutricional del suplemento energético-proteico administrado; sus incrementos estarían en relación directa con el mejoramiento de la dieta del rumiante [24]. En C, las

Tabla 1: eritrograma en terneros suplementados (S) y controles (C). $\bar{X} \pm DE$

analito	valores iniciales		valores finales	
	C (n = 30)	S (n = 30)	C (n = 30)	S (n = 30)
hematocrito (%)	39.2 ^a ± 1.8	38.6 ^a ± 2.4	36.7 ^b ± 2.9	42.1 ^c ± 1.7
eritrocitos (T/l)	7.33 ^a ± 0.6	7.44 ^a ± 0.5	6.95 ^b ± 0.7	7.93 ^c ± 0.6
VCM (fl)	53.5 ^a ± 4.1	51.9 ^a ± 3.8	52.8 ^a ± 4.3	53.1 ^a ± 4.0
hemoglobina (g/dl)	13.8 ^a ± 0.7	13.2 ^a ± 0.5	11.4 ^b ± 1.5	15.1 ^c ± 0.9
HCM (pg)	18.8 ^a ± 0.9	17.6 ^a ± 0.7	16.4 ^b ± 0.8	19.0 ^a ± 0.9
CHCM (%)	35.2 ^a ± 0.8	34.2 ^a ± 0.9	31.1 ^b ± 0.7	35.9 ^a ± 0.8

VCM: volumen corpuscular medio, HCM: hemoglobina corpuscular media, CHCM: concentración de HCM. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de cada grupo.

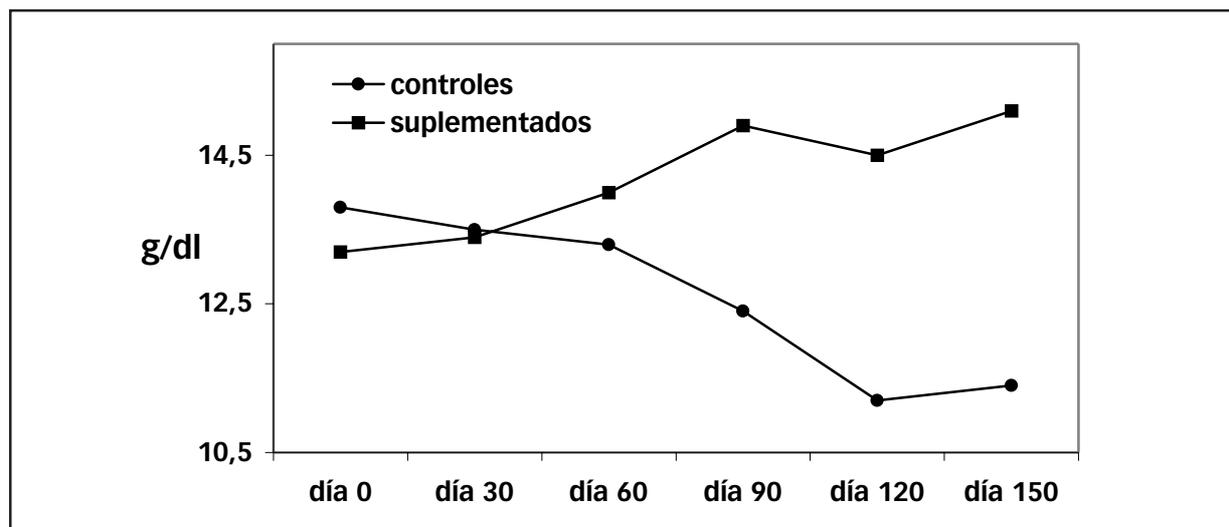


Figura 1: hemoglobina en terneros suplementados y controles.

declinaciones podrían imputarse al empobrecimiento invernal de las pasturas [2, 25].

La adecuada eritropoyesis del bovino requeriría un continuo y equilibrado aflujo de proteínas, minerales y vitaminas, cuya deficiencia se traduciría en decrementos de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina [24, 26]. En cantidades elevadas, el *gospol* alteraría el equilibrio vitamínico del bovino [27]. La vitamina E contrarrestaría los efectos del *gospol*, mejorando los niveles de hematocrito y hemoglobina en terneros intoxicados [14].

El volumen corpuscular medio no registró diferencias significativas entre animales experimentales y controles. El ligero aumento del VCM registrado en S quizás responda a razones ontogénicas; para el hemisferio norte se ha reportado que en terneros recién nacidos esta tasa sería de 46 fl y ascendería hasta 52 fl en la adultez [24]. La disminución en C, si bien escasa, refrendaría la postura del déficit nutricional en este lote, pues ciertas carencias (hierro, cobre) tenderían a provocar microcitosis en el ganado [28, 29]. La reducción del VCM respondería a deficiencias dietarias, especialmente férricas [30].

La hemoglobina se elevó en S y declinó en C (Figura 1). El Anova de medidas repetidas indicó significación estadística para los efectos *tratamiento* y *tiempo*. Los contrastes ortogonales declararon que las diferencias entre lotes se iniciaron a los tres meses. Los índices hemoglobínicos (HCM y CHCM), si bien no se alteraron en S, disminuyeron significativamente en C. Nuevamente, estos cambios deben ser interpretados a la luz del aporte nutricional efectuado por la semilla de algodón, en función de la escasez invernal de pasturas que caracteriza a la región nordeste del país [2, 25]. La concentración de hemoglobina ocupa un importante lugar en el panel de indicadores nutricionales del bovino [29]. La hipocromía,

además de responder a hemorragias y hemólisis, puede deberse a deficiencias dietarias, especialmente de hierro y cobre [30].

Con la cantidad aquí suministrada de semilla de algodón, no parecen haberse generado los bloqueos de la absorción intestinal de hierro reportados por otros investigadores en la intoxicación por *gospol* [5], ni tampoco los fenómenos de anemia hemolítica provocados por el aumento de fragilidad de la membrana eritrocitaria (resistencia globular osmótica) causada por el polifenol tóxico [1, 31, 32].

Siendo que el suplemento aportado eleva significativamente los niveles plasmáticos de colesterol [33, 34] y que este es capaz de afectar las propiedades reológicas del eritrocito (menor resistencia a la deformabilidad) [35], tal circunstancia no se habría traducido en reducción del número de hematíes de los terneros suplementados. En otros ensayos, administrando cantidades moderadas de semilla de algodón durante lapsos cortos, tampoco se hallaron cambios del eritrograma en terneros [36, 37], pero sí ocurrieron ante cantidades más altas del suplemento, tanto en bovinos [5, 38] como en ovinos [12] y otras especies [39].

Leucograma

La Tabla 2 resume las variaciones del leucograma registradas en animales experimentales y controles. No se efectuó análisis de la variancia de los muy escasos *basófilos* detectados en el recuento diferencial, por tratarse de una variable *cuantitativa discreta* (casi *dicotómica*), cuya distribución *binomial* hubiera requerido el uso de estadísticas *no paramétricas* [23].

La concentración de leucocitos totales no resultó afectada en los animales controles, aumentando significa-

Tabla 2: leucograma en terneros suplementados (S) y controles (C). $\bar{x} \pm DE$

enzima	valores iniciales		valores finales	
	C (n = 30)	S (n = 30)	C (n = 30)	S (n = 30)
leucocitos tot. (G/l)	10.75 a \pm 0.8	9.40 a \pm 0.7	9.85 a \pm 0.8	12.40 b \pm 0.9
linfocitos (G/l)	6.45 a \pm 0.4	5.18 a \pm 0.2	5.75 a \pm 0.3	6.35 a \pm 0.4
neutrófilos (G/l)	3.46 a \pm 0.3	3.29 a \pm 0.2	3.05 b \pm 0.2	4.84 c \pm 0.4
monocitos (G/l)	0.43 a \pm 0.02	0.47 a \pm 0.03	0.59 a \pm 0.04	0.50 a \pm 0.03
eosinófilos (G/l)	0,32 a \pm 0.03	0.38 a \pm 0.02	0.39 a \pm 0.04	0.62 b \pm 0.05
basófilos (G/l)	0.09	0.08	0.07	0.09

En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias de cada grupo.

tivamente en los suplementados (efecto *tratamiento*), hacia el día 90 de iniciado el ensayo. Por su parte los neutrófilos (Figura 2), que generalmente se analizan en conjunto con los leucocitos totales porque acompañan sus variaciones [24, 28, 40], también se elevaron en S, pero declinaron en C, en ambos casos significativamente. En este último lote, los cambios podrían atribuirse a razones ontogénicas, pues tanto leucocitos totales como neutrófilos disminuyen en forma directamente proporcional al crecimiento del ternero [24, 41].

Si bien la leucocitosis neutrofílica puede deberse a intoxicaciones, trastornos metabólicos, inflamaciones agudas y destrucción de tejidos [24, 28, 40, 42], tales como las provocadas por el *gospol* [4, 8], las elevaciones en S no resultaron de la magnitud suficiente como para indicar tales trastornos (leucocitos: 9.4 \rightarrow 12.4 G/l y neutrófilos: 35 \rightarrow 39%). Tampoco fueron acompañadas de síntomas que evidenciaran lesiones internas graves. No obstante, constituyen una señal de repercusión orgánica al suplemento, pues no ocurrieron en los terneros alimentados a pastura natural. En algunas experiencias de

suplementación de terneros con semilla de algodón no se registraron variaciones del leucograma [37], pero en otras –sobre ganado adulto– se constataron leucopenias y neutrofilia [5].

Los linfocitos no acusaron significación estadística para los efectos *tratamiento* ni *tiempo*, disminuyendo su concentración en C y aumentándola en S, muy ligeramente en ambos casos. Ello aleja la presunción de posibles intoxicaciones e inflamaciones crónicas señaladas por la linfocitosis, así como la de colestasis u obstrucciones urinarias indicadas por la linfopenia [28, 42]. Otros investigadores verificaron linfopenia en bovinos intoxicados con *gospol* [5]. Dicho compuesto sería capaz de producir fenómenos de genotoxicidad en linfocitos humanos [18], cuyo mecanismo ha sido recientemente esclarecido para los linfocitos T [43].

Los monocitos mostraron escasas variaciones, exentas de significación estadística para los efectos *tratamiento* y *tiempo*. Estos glóbulos blancos revelan pocas modificaciones atribuibles a la edad y al sexo [24]. Los terneros bajo ensayo no habrían padecido las inflama-

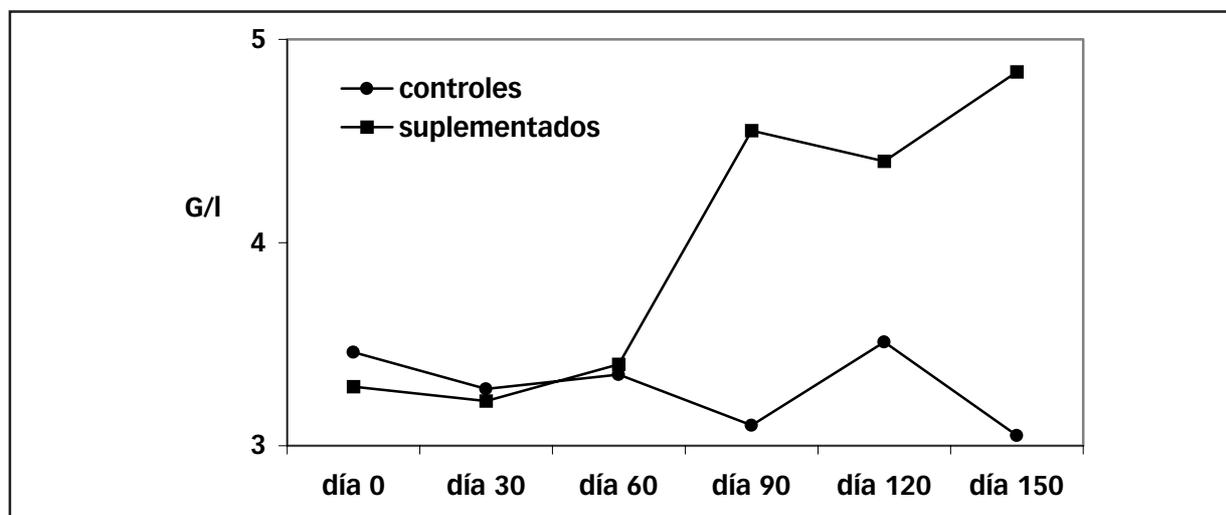


Figura 2: neutrófilos en terneros suplementados y controles.

ciones crónicas indicadas por la monocitosis [28, 40]. Pese a no haberse calculado el Anova para los basófilos, puede advertirse que estos glóbulos blancos registraron exiguos cambios a lo largo del ensayo, sin sobrepasar la tasa de 1% del total leucocitario. Se asevera que la basofilia ocurriría en casos de hiperlipemia e hiperlipoproteinemias [28, 42].

Los eosinófilos aumentaron en ambos lotes, ligeramente en C y significativamente en S (efecto *tratamiento*), estableciéndose hacia el día 90 el comienzo de la diferenciación estadística (contrastos ortogonales). Esta tendencia, común a ambos lotes, quizás deba relacionarse con la ontogenia, ya que los eosinófilos aumentarían progresivamente durante el crecimiento (1-2%) hasta alcanzar tasas de adultos (10%) [24]. Sin embargo, no debería descartarse que el aumento significativo en S estuviera señalando alguna reacción al suplemento, ya que la eosinofilia es frecuente en los fenómenos de hipersensibilidad a los alimentos, así como en algunas intoxicaciones [28, 42]. Paradójicamente, otros autores encontraron eosinopenias en bovinos intoxicados con *gosipol* [5].

Enzimograma

Las variaciones de las actividades enzimáticas se exponen en Tabla 3. ALD no registró variaciones significativas por efectos *tiempo* ni *tratamiento*, circunstancia que nos apartaría de la existencia de eventuales inflamaciones agudas hepáticas y musculares (incluyendo músculo cardíaco), capaces de ser evidenciadas por la elevación de esta enzima [44, 45]. La actividad CPK tampoco se modificó significativamente en los terneros bajo ensayo, aportando otro argumento para refrendar la ausencia de distrofias musculares [44] y necrosis de fibras miocárdicas [45], reportadas en bovinos intoxicados con *gosipol* [14, 17].

A pesar de las aseveraciones precedentes, debe advertirse que en los terneros suplementados ocurrieron ascensos enzimáticos indicativos de anomalías orgánicas, probablemente incipientes por no correlacionar con signos clínicos. Tal fue el caso de LDH, cuyos cambios resultaron escasos en C pero significativos en S (efecto *tratamiento*), diferencia que se inició hacia el día 90 y persistió hasta el final del ensayo. Su elevación está descrita en las lesiones musculares y hepáticas [44, 45]; en ratas intoxicadas con *gosipol* no se alteró la actividad LDH ni la de sus isoenzimas [46]. Dicho polifenol sería capaz de reprimir la actividad LDH_(x) testicular del bovino, mecanismo que inhibiría la fertilidad masculina [47].

Similares cambios a los de LDH ocurrieron para las actividades ALP y AST, donde el efecto *tratamiento* fue significativo, iniciándose la diferenciación entre C y S en el tercer mes de suplementación. La elevación de ALP se relaciona principalmente con trastornos hepáticos (colestasis, cirrosis) y óseos (osteomalacia, osteítis, osteoesclerosis), en tanto que AST lo hace con las necrosis de hepatocitos y fibras musculares [28, 44, 45]. El aumento de AST aquí registrado contrasta con la ausencia de cambios verificados para esta enzima en vacas lactantes suplementadas con semilla de algodón durante cortos períodos [10].

La actividad GGT también resultó significativa en S (efecto *tratamiento*), acusando leves modificaciones en C (Figura 3). El test de comparación de medias detectó que las diferencias entre lotes comenzaron a ser significativas hacia el día 90. GGT es una enzima que se eleva en trastornos hepatobiliares, especialmente de etiología tóxica [28, 42, 44]; su aumento se registró en ratas intoxicadas con *gosipol* [48]. Para la misma afección, otros autores verificaron elevaciones de *sorbitoldehidrogenasa* en vacas [32] y terneros [16], así como de otras actividades enzimáticas en animales de experimentación [49, 50].

Tabla 3: enzimograma en terneros suplementados (S) y controles (C). $\bar{x} \pm DE$

enzima	valores iniciales		valores finales	
	C (n = 30)	S (n = 30)	C (n = 30)	S (n = 30)
ALD (UI/l)	21 ^a ± 2	23 ^a ± 3	19 ^a ± 4	20 ^a ± 3
GGT (UI/l)	13 ^a ± 3	15 ^a ± 5	15 ^a ± 4	29 ^b ± 4
ALP (UI/l)	180 ^a ± 25	172 ^a ± 31	175 ^a ± 27	236 ^b ± 41
AST (UI/l)	39 ^a ± 5	43 ^a ± 4	45 ^a ± 7	61 ^b ± 9
CPK (UI/l)	128 ^a ± 18	135 ^a ± 21	133 ^a ± 23	137 ^a ± 25
LDH (UI/l)	415 ^a ± 52	391 ^a ± 40	407 ^a ± 59	711 ^b ± 67

ALD: aldolasa, GGT: gammaglutamiltransferasa, ALP: fosfatasa alcalina, AST: aspartatoaminotransferasa, CPK: creatinfosfoquinasa, LDH: lactatodehidrogenasa. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas (p < 0.05) entre las medias de cada grupo.

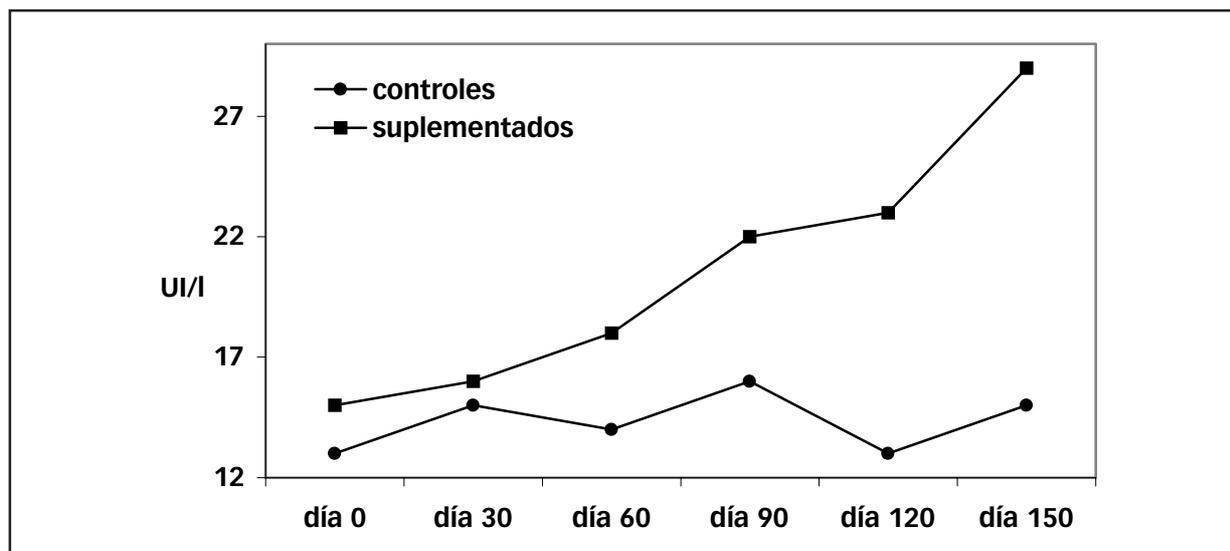


Figura 3: GGT en terneros suplementados y controles.

En comunicaciones anteriores reportamos que en estos mismos animales no resultaron adversamente afectados otros parámetros inherentes al funcionamiento del hígado (proteínas plasmáticas, albúminas) [51], riñones (sodio, potasio y cloruro) [52], (urea y creatinina) [51], hueso (calcio, magnesio y fósforo inorgánico) [52], sistema inmune (γ globulinas) [51], absorción intestinal (hierro, cobre) [52], pH ruminal [53], metabolismo glucídico [54] y metabolismo lipídico, en este caso con significativas elevaciones de triglicéridos, colesterol y lipoproteína a [54], así como modificaciones de C-HDL y C-LDL [55].

No obstante, en ocasión de intoxicar experimentalmente terneros con semilla de algodón (6 kg/día durante 7 meses), registramos significativos aumentos de GGT, ALD, CPK, LDH, AST, urea, potasio, fósforo inorgánico, leucocitos totales y linfocitos, así como de los parámetros del lipidograma, con disminuciones del eritrograma, hierro, neutrófilos, proteínas totales, albúminas y globulinas. La histopatología de estos animales reveló graves lesiones como miocarditis, hepatitis y necrosis tubular renal, entre otras [56].

En el presente caso, las modificaciones leucocitarias y enzimáticas fueron moderadas, sin llegar a configurar el estado de intoxicación propio de la semilla de algodón [3-8], verificado en animales sometidos a dosis mayores [15-17, 56]. Permaneciendo incólume el mecanismo de biosíntesis hepática y no habiendo resultado afectadas las funciones de depuración renal, absorción intestinal y defensa inmunológica, el incipiente y leve cuadro toxi-inflamatorio sería reversible [28, 44, 45] tras la suspensión de la suplementación, sin afectar el ulterior crecimiento de los animales, tal como está descrito en novillos [53].

CONCLUSIONES

La ausencia de síntomas y la mayor ganancia de peso en terneros suplementados avala el diseño ensayado (suministro de 2 kg/animal/día de semilla de algodón durante cinco meses), que reveló ser capaz de mejorar los parámetros del eritrograma en la temporada otoño-invernal, cuando los controles disminuyeron sus tasas de hematocrito, eritrocitos y hemoglobina debido al empobrecimiento de las pasturas. Las elevaciones de leucocitos totales, neutrófilos y eosinófilos, así como los moderados aumentos de las actividades GGT, ALP, AST y LDH, alertan sobre la existencia de incipientes reacciones orgánicas toxi-inflamatorias de probable localización hepática y muscular, atribuibles al *gospol* y grasa dietaria excesiva, por lo cual no resultaría conveniente prolongar el suministro de semilla de algodón más allá del lapso ensayado.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo pudo realizarse merced a la financiación otorgada por CONICET (PIP 577) y CIDEt (16Q137). Se reconoce el apoyo brindado por las empresas WIENER LAB y GT-LAB, que proveyeron los reactivos necesarios para la investigación. ●

REFERENCIAS

1. **Balbuena, O.; Kucseva, C. D.; Stahringer, R. C.** *Suplementación invernal con diferentes niveles de semilla de algodón. Efecto sobre la fragilidad eritrocitaria.* Anales XIX Sesión de Comunicaciones Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, p. 18. Corrientes, 1998.
2. **Peruchena, C. O.; D'Ascanio, G.; Valdivia, G.** *Suplementación invernal de novillos con semilla de algodón sobre pastizal natural.* Boletín N° 40, INTA Reconquista, p. 1-8, 1992.
3. **Baez-Kohn, A. R.** *Intoxicación por semilla de algodón.* Boletín Informativo del INTA (Misiones) 8: 1-4, 1990.
4. **Jarret, J. A.** *Too much cottonseed led to poisoning.* Hoard Dairyman 128: 8, 568-569, 1983.
5. **Kerr, L. A.** *Gossypol toxicosis in cattle.* Cont. Educ. Vet. 11: 1139-1142, 1989.
6. **Smalley, S. A.; Bicknell, E. J.** *Gossypol toxicity in dairy cattle.* Cont. Educ. Pract. Vet. 4: 9, 378-381, 1982.
7. **Radeleff, R. D.** *Toxicología Veterinaria*, Ed. Academia, León, 1967.
8. **Garner, R. J.; Papworth, D. S.** *Toxicología Veterinaria*, 3° ed., Acribia, Zaragoza, 1970.
9. **Morrison, F. B.** *Alimentos y Alimentación del Ganado*, 21° ed. Uthea, México, 1980.
10. **Lindsey, T. O.; Hawkins, G. E.; Guthrie, L. D.** *Physiological responses of lactating cows to gossypol from cottonseed meal rations.* J. Dairy Sci. 63: 562-573, 1980.
11. **Cheftel, J. C.; Cheftel, H.; Besancon, P.** *Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, 1983.
12. **Nikokyris, P.; Kandylis, K.; Deligiannis, K.; Liamadis, D.** *Effects of gossypol content of cottonseed in blood constituents in growing fattening lambs.* J. Dairy Sci. 74, 12: 4305-4313, 1991.
13. **Hudson, L. M.; Kerr, L. A.; Maslin, W. R.** *Gossypol toxicosis in a herd of beef calves.* J Am. Vet. Med. Assoc. 1: 192 (9), 1303-1305, 1988.
14. **Velasquez-Pereira, J.; Risco, C. A.; McDowell, L. R.; Staples, C. R.; Prichard, D.; Chenoweth, P. J.; Martin, F. G.; Williams, S. N.; Rojas, L. X.; Calhoun, M. C.; Wilkinson, N. S.** *Long-term effects of feeding gossypol and vitamin E to dairy calves.* J. Dairy Sci. 82: 6, 1240-1251, 1999.
15. **Orgad-Klopfer, U.; Adler, H.** *Gossypol poisoning in calves.* Israel J. Vet. Med. 42: 16-18, 1986.
16. **Holmberg, C.; Weaver, L.; Guterbock, W.; Genes, J.; Montgomery, P.** *Pathological and toxicological studies of calves fed a high concentration cottonseed.* Vet. Pathol. 25: 2, 147-153, 1988.
17. **Zelski, R. Z.; Rothwell, J. T.; Moore, R. E.; Kennedy, D. J.** *Gossypol toxicity in preruminant calves.* Aust. Vet. J. 72: 10, 394-398, 1995.
18. **Best, R. G.; McKenzie, W. H.** *Variable sister chromatid exchange response in human lymphocytes exposed in vitro to gossypol acetic acid.* Mutation Research 206: 227-233, 1988.
19. **Chenoweth, P. J.; Chase, C. C.; Risco, C. A.; Larsen, R. E.** *Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls.* Theriogenology 53: 1193-1203, 2000.
20. **Breitbart, H.; Rubinstein, S.; Nass-Arden, L.** *Effect of gossypol-acetic acid on calcium transport in plasma membranes from ram and bull spermatozoa.* Int. J. Androl. 7: 5, 439-447, 1984.
21. **Yuan, Y. Y.; Shi, Q. X.** *Inhibition of hamster sperm acrosomal enzyme by gossypol is closely associated with the decrease in fertilization capacity.* Contraception 62: 4, 203-209, 2000.
22. **Coppo, J. A.** *Fisiología Comparada del Medio Interno*, Ed. Dunken, Buenos Aires, 2001.
23. **Steel, R. G.; Torrie, J. H.** *Principles and Procedures of Statistics*, 2° ed., MacGraw-Hill, New York, 1992.
24. **Jain, N. C.** *Essentials of Veterinary Hematology*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
25. **Mufarrege, D.** *Distribución estacional de nutrientes minerales para el ganado en pastizales del nordeste argentino.* Resumen Anual INTA Mercedes (Corrientes), p.102-107, 1993.
26. **Steffen, D. J.; Leipold, H. W.; Gibb, J.** *Congenital anemia, dyskeratosis, and progressive alopecia in Polled Hereford calves.* Vet. Pathol. 28: 234-237, 1991.
27. **Lane, A. G.; Stuart, R. L.** *Gossypol intake may affect vitamin status of dairy cattle.* Feedstuffs, 9: 13-15, 1990.
28. **Coles, E. H.** *Veterinary Clinical Pathology*, 4° ed., Saunders, Philadelphia, 1989.
29. **Habich, G. E.** *Análisis de sangre de animales sanos como fuente de información para el manejo de rodeos lecheros.* Prod. Anim. 2: 2, 130-158, 1982.
30. **Barger, M. A.; Grindem, B. C.** *Interpretación del hemograma.* Selecc. Vet. 8: 5, 500-510, 2000.
31. **Calhoun, M. C.; Huston, J. E.; Kuhlmann, S. W.; Baldwin, B. C.; Menges, W.; Engdahl, B. S.; Ueckert, D. N.; Engdahl, G. R.** *Increased erythrocyte fragility in*

- cattle, sheep and goats fed whole cottonseed. Texas Agr. Expt. Sta. Consol. Prog. Rpt. 4780, p. 30, 1990.
32. **Gray, M. L.; Greene, L. W.; Williams, G. L.** *Effects of dietary gossypol consumption on metabolic homeostasis and endocrine function in beef heifers and cows.* J. Anim. Sci. 71: 11, 3052-3059, 1993.
33. **Coppo, J. A.** *Effect of dietary lipidic charge in the concentration of bovine plasmatic lipids and lipoproteins.* Acta Physiol. Pharm. 40: 289-297, 1990.
34. **Coppo, J. A.** *L'utilisation de suppléments nutritifs qui accroissent le degré de saturation des acides gras corporels des bovins.* Ann. Biol. Clin. 50: 263-264, 1992.
35. **Dumas, D.** *Influencia del colesterol en membrana sobre la deformabilidad y la fragilidad osmótica eritrocitarias.* Acta Bioq. Clín. Latin. 32: 2, 265-275, 1998.
36. **Claypool, D. W.; Hoffman, C. H.; Oldfield, J. E.; Adams, H. P.** *Canola meal, cottonseed and soybean meals as protein supplement for calves.* J. Dairy Sci. 68: 1, 67-70, 1985.
37. **Krishna, G.** *Possibilities of ensiling paddy straw and agro-industrial by-products for rearing crossbred calves in tropics.* World Rev. Anim. Prod. 20: 3-5, 1984.
38. **Coppo, J. A.; Scorza, S. H.; Coppo, N. B.** *Biochemical profiles of argentine cattle supplemented with cottonseed.* RIA 25: 3, 91-102, 1994.
39. **Yudina, I. G.; Skvortsov, F. F.** *Clinical and morphological findings in fowls after prolonged feeding of gossypol at threshold dosage.* Vses. Institut. Veter. Sanit. 5: 11-14, 1984.
40. **Schalm, O. W.** *Veterinary Hematology*, 4^o ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1981.
41. **Medway, W.; Prier, J. E.; Wilkinson, J. S.** *Patología Clínica Veterinaria*, Uteha, México, 1980.
42. **Gómez Piquer, J.** *Análisis Clínicos en Veterinaria*, Mira Ed. Zaragoza, 1992.
43. **Baumgrass, R.; Weiwad, M.; Erdmann, F.; Liu, J. O.; Wunderlich, D.; Grabley, S.; Fischer, G.** *Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol.* J. Biol. Chem. 276: 51, 47914-47921, 2001.
44. **Balcells, A. G.** *La Clínica y el Laboratorio*, 11^o ed., Marín, Barcelona, 1978.
45. **Pesce, A. J.; Kaplan, L. A.** *Methods in Clinical Chemistry*, Mosby, Saint Louis, 1990.
46. **Steiner, M.; Frick, J.; Rován, E.** *In vivo study of LDH isoenzymes activities in heart, liver and testis cytosols of gossypol-treated rats.* Int. J. Androl. 7: 521-528, 1984.
47. **Olgíati, K. L.; Toscano, W. A.** *Kinetics of gossypol inhibitions of bovine lactate dehydrogenase X.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 180-185, 1983.
48. **Dalvi, R. R.; Deoras, D. P.; Young-Curtis, P.** *Effect of gossypol treatment on liver and serum gamma-glutamyl transferase activity in rats.* Faseb. Journal, 9: A713, 1995.
49. **Deck, L. M.; Chamblee, B. B.; Royer, R. E.; Hunsaker, L.; VanderJagt, D. L.** *Inhibition of aldose reductase by gossypol-related compounds.* Adv. Exp. Med. Biol. 463: 487-492, 1999.
50. **Gawai, K. R.; Cox, C.; Jackson, J.; Dalvi, R. R.** *Changes in the activity of metabolic and nonmetabolic liver enzymes in rats following co-administration of gossypol with phenobarbital.* Pharmacol. Toxicol. 76: 289-291, 1995.
51. **Coppo, N. B.; Coppo, J. A.** *Creatinina, urea, proteínas plasmáticas y peso en terneros destete suplementados con semilla de algodón.* Med. Vet. 81: 4, 255-258, 2000.
52. **Coppo, J. A.; Coppo, N. B.** *Suplementación de terneros destete con semilla de algodón. Efectos sobre el peso y los electrolitos plasmáticos.* Prod. Anim. 20: 2, 85-91, 2000.
53. **Koza, G. A.; Balbuena, O.; Kucseva, C. D.; Coppo, N. B.; Coppo, J. A.** *Efectos de la suplementación con semilla de algodón sobre los lípidos plasmáticos y el pH ruminal de novillos cruza cebú.* Anales 5^o Reunión Latinoamericana de Fisiología Veterinaria, p.15-17. La Plata, 2000.
54. **Coppo, N. B.; Coppo, J. A.** *Analitos glucídicos y lipídicos en plasma de terneros destete suplementados con semilla de algodón.* Anales 12^o Reunión de Comunicaciones Científicas, Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE, p. 142. Corrientes, 2001.
55. **Koza, G. A.; Balbuena, O.; Coppo, N. B.; Kucseva, C. D.; Coppo, J. A.** *Cambios del lipidograma en novillos suplementados con semilla de algodón.* Actas de Ciencia & Técnica 4: 78-81, 2001.
56. **Coppo, J. A.; Maccio, O. A.; Scorza, S. H.; Coppo, N. B.** *Desórdenes metabólicos en bovinos suplementados con semilla entera de algodón.* Arch. Zoot. España 42: 159, 301-311, 1993.



FLUCTUACIONES FISIOLÓGICAS DE LOS NIVELES LIPÍDICOS EN SANGRE DE *RANA CATESBEIANA* (SHAW, 1802)

Coppo, N. B. / Coppo, J. A. / Fioranelli, S. A.

Cátedra de Fisiología General. FCEQyN. UNaM. F. Azara 1552. Posadas (3300),
Misiones, Argentina. E-mail: jcoppo@vet.unne.edu.ar

PHYSIOLOGICAL VARIATION OF BLOOD LIPIDS IN *RANA CATESBEIANA* (SHAW, 1802)

ABSTRACT

The purpose of this study is to determine plasma lipidogram reference values and sex, age, weight, climate, and breeding and feeding systems physiological modifications in bullfrog, *Rana catesbeiana*. Three hundred two healthy animals (both sexes and 9 to 21 months old), were studied. Reference intervals for triglycerides (0.34-0.52 g/l), total cholesterol (0.56-0.67 g/l), HDL-C (0.03-0.05 g/l), LDL-C (0.34-0.44 g/l), α -lipoprotein (6.01-8.67%) and β -lipoprotein (91.3-93.9%), were obtained. Significant differences between sexes ($p < 0.05$) were not registered. Growth correlated to weight increase ($r = 0.82$, $p = 0.02$). Age increase caused decrease of triglycerides (9 months = 0.62 g/l versus 21 months = 0.24 g/l), cholesterol (0.76 versus 0.54 g/l), HDL-C (0.06 versus 0.03 g/l) and α -lipoprotein (9 versus 5%), as well as increase of β -lipoprotein (91 versus 95%). Triglycerides were significantly lower (0.23 g/l) in the breeding system in which the water covered 90% of the pond floor and the food was supplied floating, than those in which water only covered its 50% (0.47 g/l) and 25% (0.58 g/l); in the last one, food was supplied in the floor. According of the type of food consumed, the extreme changes were verified between the high levels registered with natural diet (lagoon) and the low concentrations found viscera diet (bovine lungs) either for tryglycerides (0.57 versus 0,26 g/l), cholesterol (0,71 versus 0,52 g/l) and LDL-C (0,46 versus 0,29 g/l). In relationship to remaining seasons, significant decreases of triglycerides (0.25 versus 0.59 g/l) and cholesterol (0.59 versus 0.66 g/l) were verified in Winter. Utility of lipidogram to evaluate sanitary, metabolic, and nutritional state is proposed; their application as suitable tool to improve the frog meat production is emphasized.

KEY WORDS: bullfrog, weight, plasma lipids, climate, breeding system, feeding.

RESUMEN

Con el propósito de obtener valores normales para el lipidograma plasmático e indagar modificaciones fisiológicas atribuibles al sexo, edad, peso, clima y sistemas de crianza y alimentación, se estudiaron 302 ejemplares sanos de *Rana catesbeiana*, de ambos sexos y edades de 9 a 21 meses. Se obtuvieron intervalos de referencia para triglicéridos (0.34-0.52 g/l), colesterol total (0.56-0.67 g/l), C-HDL (0.03-0.05 g/l), C-LDL (0.34-0.44 g/l), lipoproteína α (6.01-8.67%) y lipoproteína β (91.3-93.9%). No se verificaron diferencias significativas entre sexos ($p < 0.05$). El crecimiento correlacionó con el aumento de peso ($r = 0.82$, $p = 0.02$). El avance de la edad produjo disminuciones de triglicéridos (9 meses = 0.62 g/l versus 21 meses = 0.24 g/l), colesterol (0.76 versus 0.54 g/l), C-HDL (0.06 versus 0.03 g/l) y lipoproteína α (9 versus 5%), así como aumentos de lipoproteína β (91 versus 95%). Los triglicéridos fueron significativamente más bajos (0.23 g/l) en el sistema de crianza donde el agua ocupó el 90% del piso de las piletas y el alimento se administró flotante, con relación a aquellos donde el agua ocupó solo el 50% (0.47 g/l) y el 25% (0.58 g/l),

siendo el alimento suministrado a piso en el último caso. Según el tipo de alimento consumido, los cambios extremos se constataron entre los altos niveles registrados con dieta natural (laguna) y las bajas concentraciones verificadas en la dieta a base de vísceras (pulmón bovino), tanto para triglicéridos (0.57 *versus* 0.26 g/l), colesterol (0.71 *versus* 0.52 g/l) y C-LDL (0.46 *versus* 0.29 g/l). Con relación al resto de las estaciones del año, en invierno declinaron significativamente los valores de triglicéridos (0.25 *versus* 0.59 g/l) y colesterol (0.59 *versus* 0.66 g/l). Se destaca la utilidad del lipidograma para evaluar estados metabólico, nutricional y sanitario, proponiéndose su aplicación como instrumento idóneo para optimizar la producción de carne de rana.

PALABRAS CLAVES: rana toro, peso, lípidos plasmáticos, clima, sistema de crianza, alimentación.

INTRODUCCIÓN

Metabólicamente, los lípidos desempeñan un rol eminentemente energético, interviniendo además como constituyentes de tejidos y secreciones. Proviene de los alimentos y de la biosíntesis orgánica, siendo eliminados por combustión tisular y excreción biliar. El estudio de los lípidos plasmáticos (lipidograma) habitualmente incluye las determinaciones de triglicéridos, colesterol total, lipoproteínas α (HDL), pre- β (VLDL) y β (LDL), así como la concentración de colesterol ligado a dos de dichas lipoproteínas (C-HDL y C-LDL) [1, 2, 3].

Las lipoproteínas posibilitan el transporte de triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol y fosfolípidos a través del medio acuoso plasmático, solubilizándolos por medio de proteínas. Son partículas esféricas que poseen un núcleo de lípidos neutros, compuesto por triglicéridos y ésteres de colesterol, y una superficie donde las apoproteínas se asocian con colesterol y fosfolípidos. Las principales clases de lipoproteínas aisladas por electroforesis han sido denominadas mediante un sistema análogo al utilizado para otras proteínas plasmáticas, como α , β y pre- β lipoproteínas. Cuando son separadas sobre la base de la densidad de ultracentrifugación, las clases se denominan por sus densidades relativas: lipoproteínas de alta densidad (HDL), de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL) [4, 5, 6].

El metabolismo lipoproteico revela características similares entre especies animales, pero no es exactamente igual en todas ellas. Caninos, felinos, equinos, rumiantes y algunos roedores poseerían “patrón HDL”, caracterizado por el predominio de lipoproteína α en el plasma. Cuando estos animales son alimentados con dietas grasas, el colesterol es captado por HDL (en lugar de LDL), evitándose efectos nocivos debido a la acción protectora atribuible a HDL. Seres humanos, cerdos, conejos, marmotas y varias especies de monos, responderían al “patrón LDL”, caracterizado por el aumento de lipoproteína

β y mayor riesgo aterogénico, cuando se consumen dietas grasas [1, 4].

Frecuentemente, el aumento de las calorías de la dieta es acompañado por el incremento de las grasas corporales y la elevación de triglicéridos y colesterol en sangre, así como por modificaciones de lipoproteínas plasmáticas [7, 8]. Aún existen escasos conocimientos acerca de las concentraciones plasmáticas y variaciones fisiológicas de los lípidos y lipoproteínas en *Rana catesbeiana*, anfibio caracterizado por poseer muy escasa grasa corporal [9].

La “rana toro” (*bullfrog*) se ubica taxonómicamente en el orden *Anuros*, familia *Ranidae* y su apelativo se debe a que el macho emite (croa) un *rugido* semejante al del toro durante la época reproductiva [10]. Es originaria de América del Norte y se caracteriza por su gran tamaño, alcanzando la adultez a los 12 meses, con pesos de hasta 300 g (30 cm de longitud). Su carne es comestible y se comercializa con alto precio, por lo cual la cría de este anfibio viene adquiriendo importancia en nuestro país desde finales de la década de 1980 [9].

El desarrollo de *Rana catesbeiana* comprende una fase acuática que comienza con la etapa de *larva* (6 mg de peso) y prosigue con la de *renacuajo*, de 1 g de peso, respiración branquial, corazón de dos cavidades y alimentación sobre la base de plancton, algas y microorganismos. Luego de atravesar varios estadios, por metamorfosis se transforma en *imago* (40 g, respiración pulmonar, corazón de tres cavidades), iniciando la fase anfibia de su ontogénesis [10, 11, 12]. La metamorfosis parece depender de las acciones de la tiroxina [13] e implica cambios como resorción de la cola, aparición de patas delanteras, párpados y tímpanos, desaparición de las branquias, ensanchamiento de la boca y desarrollo de la lengua, que –fija por delante– será desplegada (disparada) para atrapar insectos. No menos importantes serán los cambios conductuales y bioquímicos para hacer frente al cambio de vida (acuática por anfibia) [14, 15]. Durante la

metamorfosis, los anfibios modifican dramáticamente (*sic*) su aparato digestivo, apareciendo enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina y quitinasas gástricas [16].

Por ser ectotermos, los anfibios regulan su tasa metabólica –y por ende su ritmo de crecimiento– acorde a la temperatura ambiente; cuando esta desciende a menos de 10-15°C, las ranas dejan de alimentarse y entran en vida letárgica, utilizando como fuente de energía “cuerpos adiposos” periováricos [9, 10, 12]. Se afirma que en los animales poiquilotermos, el frío extremo induciría la síntesis de lípidos de bajo índice de saturación, con lo cual se evitaría que los panículos adiposos se endurezcan o solidifiquen; en los anfibios, previamente a la hibernación aumentaría la síntesis de grasa, a partir de la cual obtendrían agua (cada gramo de grasa aportaría un gramo de agua) [17].

Son animales que se adaptan a la vida en cautiverio, revelando excelentes condiciones de rusticidad, precocidad y prolificidad. En los criaderos, *Rana catesbeiana* es faenada a los 6-7 meses de vida, cuando ha alcanzado pesos de 170 g, de los cuales 60 g corresponden al “anca”. Su carne estaría exenta de colesterol y contendría más proteínas y hasta tres veces menos cantidad de grasa que el filete de merluza; análisis realizados indicarían que los porcentajes de proteínas y lípidos serían respectivamente de 18 y 0,4% para la carne de rana y de 16 y 1,4% para el filete de merluza, afirmándose que la proteína del anfibio dispondría de todos los aminoácidos esenciales [9, 10, 12]. El consumo mundial de carne de rana oscila entre 30.000 y 50.000 tn/año, existiendo también un mercado para el cuero (marroquinería), intestino (hilo para cirugía estética), hígado (elaboración de paté) y grasa (uso cosmético) [11, 12, 18]. Actualmente en nuestro país existirían unos 200 ranarios funcionando [12], varios de ellos en la provincia de Misiones.

El objetivo de este estudio fue obtener valores de referencia para el lipidograma plasmático de *Rana catesbeiana*, así como verificar eventuales variaciones fisiológicas atribuibles al sexo, edad, peso, clima (época del año) y sistemas de crianza y alimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos experimentales, alimentación y manejo

A lo largo de dos años de estudios, se utilizaron en total 302 ejemplares de *Rana catesbeiana* clínicamente sanos. Doscientos setenta fueron anfibios mantenidos en sistemas intensivos, en tres distintos criaderos del Nordeste argentino. De cada uno de estos ranarios (anfigranjas) se tomaron muestras a 90 ejemplares de distintas

edades, conformándose 12 grupos de 7-8 animales cada uno (edades de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20 y 21 meses), 50% de cada sexo y pesos entre 50 y 350 g. El 36% de las muestras se tomó en invierno y el 64% en las restantes estaciones del año. Ninguno de los criaderos utilizó calefacción durante la temporada invernal y todos administraron alimento a razón del 3-5% del peso vivo/día.

En el establecimiento situado en Oberá (Misiones), el agua provino de vertientes naturales y ocupó el 25% de la superficie de las piletas; el alimento (alimento 1) consistió en *pellets* balanceados para peces (45% de proteínas), administrado “en seco” (esparcido sobre el piso), esporádicamente acompañado por lombrices.

El agua del criadero de Paso de la Patria (Corrientes) era subterránea, extraída de la segunda napa a partir de una perforación, y ocupó el 50% de las piletas; las ranas se alimentaron con *pellets* balanceados flotantes en el agua (38% de proteínas), ocasionalmente adicionando larvas de moscas (alimento 5).

El criadero de Jardín América (Misiones) poseía agua surgente por gravedad, la cual ocupó el 90% de las piletas y se utilizó para vehiculizar el alimento flotante. Durante el primer año la ingesta de los batracios (alimento 4) fue una mezcla a partes iguales de vísceras de bovino (pulmón molido, “bofe”, 16% de proteínas) y *pellets* balanceados (45% de proteínas), y durante el segundo año se administraron tales vísceras como único alimento (alimento 3).

Los 32 ejemplares restantes provenían del establecimiento mencionado en primer término, pero el sistema de manejo fue extensivo (semicautiverio), pues las ranas se criaron en una laguna, seleccionando exclusivamente alimentos “naturales” (alimento 2). Se trató de animales adultos (16-20 meses de edad), de ambos sexos, a quienes se extrajeron muestras tanto en invierno como en el resto de las temporadas del año.

Toma de muestras

Las ranas fueron trasladadas al laboratorio en cajas térmicas que contenían una solución isotónica de NaCl al 0.6% enfriada con hielo (2-3°C), procedimiento que las insensibiliza y aletarga [10], facilitando su manipulación. El peso vivo se obtuvo en una balanza electrónica Scientech-SL, con precisión de 0.01 g. Las muestras se tomaron en horario matutino (7-8 AM), tras un período de ayuno de 24 horas.

La extracción de sangre se realizó con jeringa y aguja, por punción intracardíaca, obteniéndose una mezcla de sangres venosa y arterial, dada la característica anatómica de la existencia de un ventrículo único [15, 19].

Antes de las dos horas post-extracción la sangre fue centrifugada para separar el coágulo y obtener suero.

Determinaciones de laboratorio

En un espectrofotómetro L.Mannheim 4010 UV-visible, con cubeta semimicro de cuarzo (1 cm de paso de luz) termostalizada a 37°C, con reactivos Wiener Lab, se realizaron las determinaciones de triglicéridos (método de la lipasa-peroxidasa, lecturas a 505 nm) y colesterol total (técnica de la colesterol-oxidasa/peroxidasa, 505 nm) [20]. El colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) y de baja densidad (C-LDL) fue valorado por precipitación selectiva de la lipoproteína y valoración enzimática del colesterol por el método antes mencionado.

Mediante electroforesis en soporte de gel de agarosa (con buffer de veronal y coloración Fat Red 7B, reactivos Biopur) [3], se separaron las lipoproteínas α y β que fueron luego cuantificadas en un densitómetro Citocon CT-440 automático, provisto de impresora de curvas y valores.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, donde las variables independientes fueron edad, sexo, peso, época del año y sistemas de alimentación y manejo (según procedencia), considerando como variables dependientes (cuantitativas continuas) a los valores del lipidograma. La simetría de la distribución fue verificada mediante el test de Wilk-Shapiro (WS). Las estadísticas paramétricas incluyeron medidas de tendencia central (media aritmética, \bar{x}) y dispersión (desvío estándar, DE). La probabilidad fiducial fue evaluada mediante intervalos de confianza ($IC \pm 95\%$). El análisis de la variancia (ANOVA) se efectuó por modelo lineal a una vía, previa constatación de la homogeneidad de la variancia mediante test de Bartlett. En los casos en que el ANOVA resultó significativo ($p < 0.05$), se aplicó la prueba de compa-

raciones de medias (Tukey). El grado de asociación lineal se estableció por correlación (test de Pearson). Los análisis estadísticos se efectuaron con el auxilio de un programa informático (*Statistix 1996*). Para todas las inferencias se estipuló un $\alpha = 5\%$, por debajo del cual se rechazó la hipótesis nula de igualdad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se detallan los valores obtenidos para la totalidad de los anfibios estudiados. La distribución aproximadamente simétrica de los valores (WS), permitió el uso de estadísticas paramétricas. Los intervalos de confianza se ajustaron en cercanías de las medias aritméticas, pero los rangos individuales resultaron amplios, en coincidencia con reportes que aseveran una gran variación de los analitos sanguíneos en los anfibios, debido tanto a sus escasos mecanismos de regulación como a su mayor tolerancia a las hemodiluciones y hemoconcentraciones [15].

En los mamíferos, la lipemia aumenta en la etapa postprandial, pudiendo permanecer elevada durante 7-8 horas [1]. En los anfibios también se registrarían cambios de la concentración plasmática de varios analitos después de la ingestión de alimentos [21]. En el presente estudio el *efecto postprandial* quedó marginado del diseño debido al ayuno previo, y el *ritmo circadiano* se soslayó porque la toma de muestras se efectuó en horario matutino uniforme (condiciones basales).

Comparativamente, con excepción de la tasa de lipoproteína β , los valores registrados en ranas resultaron más bajos que los niveles reportados para el ser humano [3, 20, 22] y los carnívoros [23, 24], inscribiéndose más cercanos a los guarismos habituales en los rumiantes [1, 24]. Expresando los valores absolutos de C-HDL y C-LDL (determinados por espectrofotometría) en porcentajes (9 y 91% respectivamente), surge que dichas proporciones resultaron muy semejantes a las obtenidas (por

Tabla 1: valores obtenidos para la población total estudiada

parámetro	$\bar{x} \pm DE$	WS	IC $\pm 95\%$	rango
triglicéridos (g/l)	0.43 \pm 0.10	0.938	0.34 - 0.52	0.02 - 1.26
colesterol total (g/l)	0.62 \pm 0.14	0.927	0.56 - 0.67	0.30 - 1.18
C-HDL (g/l)	0.04 \pm 0.01	0.923	0.03 - 0.05	0.01 - 0.10
C-LDL (g/l)	0.39 \pm 0.09	0.949	0.34 - 0.44	0.18 - 0.83
lipoproteína α (%)	7.34 \pm 1.85	0.921	6.01 - 8.67	2.00 - 24.6
lipoproteína β (%)	92.65 \pm 4.62	0.930	91.3 - 93.9	75.4 - 98.0

\bar{x} : media aritmética, DE: desvío estándar, WS: test de normalidad distributiva de Wilk-Shapiro (valor en Tabla W: 0.947 para $\alpha = 0.05$), IC: intervalo de confianza. C-HDL y C-LDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta y baja densidad.

electroforesis) para sus respectivas lipoproteínas transportadoras (7 y 93% respectivamente). Teniendo en cuenta que el nivel de C-LDL fue mayor que el de C-HDL y que la tasa de lipoproteína α fue menor que la de lipoproteína β , estos animales presuntivamente encuadrarían en el “patrón LDL” antes que en el “patrón HDL” [1, 4].

Los anfibios estarían más emparentados filogenéticamente con las aves que con los mamíferos. En el plasma de las aves, el colesterol total asumiría niveles de 0.8-1.3 g/l, algo más altos que los hallados en las ranas del presente estudio. Se afirma que en las aves el colesterol aumentaría en esteatosis hepáticas, hipotiroidismo y dietas ricas en grasas, aunque también se elevaría en la fase inicial de la inanición (debido a mayor movilización y transporte sanguíneo), pues si el ayuno se prolonga su concentración plasmática disminuiría. La hipocolesterolemia también podría deberse a mala absorción, inflamación hepática e infecciones [2]. Según otros, la colesterolemia de las aves (1-2 g/l) se modificaría por la edad, herencia, nutrición y diversas enfermedades, principalmente hepáticas, declinando por disminución de la lipogénesis. La anemia ferropénica del pollo se acompañaría de hiperlipidemia debido a la reducción de la actividad de LPL (lipoproteinlipasa), necesaria para el depósito tisular de grasas. Mientras que los mamíferos transportan los lípidos absorbidos en el intestino a través de quilomicrones, las aves lo harían mediante VLDL [23].

En los mamíferos, las lipoproteínas se sintetizan en intestino e hígado [1, 22]. En lugar de hígado, las ranas poseen un voluminoso hepatopáncreas que segrega bilis a través de una vesícula biliar [15, 17]; las proteínas capaces de ligar ácidos grasos serían sintetizadas en dicho órgano [25].

En plasma de sapos *Bufo sp* (n = 26) se hallaron valores de colesterol total (0.9-1.8 g/l) ligeramente superiores a los aquí obtenidos; las concentraciones de triglicéridos (0.3-0.7 g/l) resultaron más semejantes a las encontradas en ranas [1]. Algunos investigadores afirman haber detectado VLDL en plasma de *Rana catesbeiana*, aunque en muy escasa proporción [26]; en el presente estudio no se detectó dicha fracción, quizás debido a la sensibilidad del método utilizado. Coincidentemente, la proporción de LDL habría resultado muy superior a la de HDL, en cuya composición se habrían reconocido triglicéridos (3.7%), ésteres de colesterol (19.3%), colesterol (11.9%), fosfolípidos (25.2%) y proteínas (36.8%) [26].

En ranas sexualmente maduras, el aumento de estrógenos (temporada reproductiva) provocaría liberación de una lipoproteína adicional hacia el plasma, la *vitelogenina* gonadal, incrementando hasta tres veces la concentración proteica y elevando la viscosidad plasmática. Sin embargo, no resultarían afectadas la viscosidad de los eritrocitos aglomerados, su deformabilidad ni su capacidad de agregación [27].

La Tabla 2 muestra que tanto triglicéridos como colesterol total disminuyeron paulatina pero significati-

Tabla 2: diferencias según edad

edad (meses)	TG (g/l)	CT (g/l)	Σ_c (g/l)	C-HDL		C-LDL		LP α %	LP β %
				g/l	%	g/l	%		
9	0.62 ^a	0.76 ^a	0.60	0.06 ^{ab}	10	0.54 ^{ab}	90	9 ^a	91 ^a
10	0.71 ^a	0.79 ^a	0.66	0.07 ^a	11	0.59 ^a	89	10 ^b	90 ^b
11	0.49 ^{ab}	0.60 ^b	0.55	0.05 ^{ab}	9	0.50 ^{ab}	91	8 ^{ab}	92 ^{ab}
12	0.55 ^{ab}	0.68 ^{ab}	0.47	0.06 ^{ab}	13	0.41 ^b	87	9 ^a	91 ^a
13	0.53 ^{ab}	0.55 ^{bc}	0.41	0.04 ^{ab}	10	0.37 ^{bc}	90	8 ^{ab}	92 ^{ab}
14	0.44 ^b	0.67 ^{ab}	0.43	0.05 ^{ab}	12	0.38 ^b	88	6 ^b	94 ^b
15	0.47 ^{ab}	0.59 ^b	0.44	0.04 ^{ab}	9	0.40 ^b	91	8 ^{ab}	92 ^{ab}
16	0.41 ^b	0.61 ^b	0.36	0.04 ^{ab}	11	0.32 ^c	89	8 ^{ab}	92 ^{ab}
18	0.29 ^{bc}	0.55 ^{bc}	0.43	0.05 ^{ab}	12	0.38 ^b	88	5 ^b	95 ^b
19	0.36 ^b	0.62 ^b	0.36	0.02 ^b	6	0.34 ^{bc}	94	7 ^{ab}	93 ^{ab}
20	0.20 ^{bc}	0.51 ^c	0.33	0.02 ^b	6	0.31 ^c	94	5 ^b	95 ^b
21	0.24 ^{bc}	0.54 ^{bc}	0.35	0.03 ^{ab}	9	0.32 ^c	91	5 ^b	95 ^b

TG: triglicéridos, CT: colesterol total, Σ_c : sumatoria C-HDL+ C-LDL, LP: lipoproteína. En cada columna, letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey, p < 0.05).

vamente con el incremento de la edad, en oposición a los cambios que ocurren en el ser humano [3, 20, 22, 28] y en algunos animales domésticos [1, 29]. Efectuando las sumatorias de C-HDL y C-LDL para cada edad, surge que los valores resultantes también tienden a descender a medida que aumenta la edad, acompañando la declinación del colesterol total. En efecto, tal sumatoria fue de 0.52 g/l para las edades comprendidas entre 9 y 14 meses, descendiendo a 0.38 g/l para las edades entre 15 y 21 meses. Cabe destacar que la sumatoria de C-HDL + C-LDL nunca es exactamente igual al colesterol total, debido a que parte del colesterol es transportado por quilomicrones y otras lipoproteínas [1, 3, 20] que por su escasa magnitud no aparecen en la corrida electroforética sobre gel de agarosa.

En consonancia con la declinación de colesterol total, el avance del crecimiento se tradujo en significativas disminuciones de C-HDL, tanto en valores absolutos (9-14 meses = 0.055 g/l *versus* 15-21 meses = 0.033 g/l) como relativos (9-14 meses = 10.8% *versus* 15-21 meses = 8.8%). Tales cambios correlacionaron con el descenso de la fracción transportadora de C-HDL (lipoproteína α), que fue de 8.3% entre las edades de 9 a 14 meses, y de 6.3% entre los 15 y 21 meses. En términos absolutos (concentración), C-LDL también descendió acompañando la declinación de colesterol total (9-14 meses = 0.465 g/l *versus* 15-21 meses = 0.345 g/l); pero en términos relativos (porcentaje de la sumatoria Σ) aumentó desde 89% (9-14 meses) hasta 91% (15-21 meses), en consonancia con el aumento de su proteína transportadora (lipoproteína β), cuya tasa fue de 91.7% entre las edades de 9 a 14 meses, incrementándose a 93.7% entre las edades de 15 a 21 meses. Análogamente, durante el crecimiento de terneros también se registraría disminución de lipoproteínas α e incremento de lipoproteínas β en el plasma [1].

El crecimiento de la rana toro estaría condicionado tanto por la disponibilidad de alimento como por la temperatura ambiente, que es la responsable del nivel del metabolismo en los animales ectotermos [10]. Durante el crecimiento de los mamíferos, la concentración de ácidos grasos libres estaría elevada en el plasma [1].

La Tabla 3 destaca que si bien los machos revelaron mayores niveles de colesterol total y C-LDL que las hembras, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el ser humano es habitual que los varones registren concentraciones más elevadas de colesterol, C-LDL, lipoproteína β y triglicéridos que las mujeres, debido a acciones hormonales [1, 3, 28]. El aumento del peso vivo se correspondió con significativas elevaciones de lipoproteína β , así como significativos descensos de lipoproteína α , triglicéridos, colesterol total, C-HDL y C-LDL. Tales cambios se atribuyen a la ontogenia, ya que al aumentar la edad se incrementó significativamente el peso de los animales, con alta correlación ($r=0.82$, $p=0.02$).

La rana toro ganaría peso en forma directamente proporcional a la cantidad de alimento que recibe [10]. Con dietas isocalóricas de creciente contenido proteico (25, 30, 35, 40 y 45% de proteína cruda), las mayores ganancias de peso se obtuvieron con 40% de proteínas; sin embargo, el contenido de grasa corporal correlacionó negativamente con el incremento de la proteína alimentaria [30].

En la Tabla 4 se exhiben otras correlaciones significativas verificadas entre los parámetros lipídicos con la edad y el peso. Se destaca que, a excepción de las lipoproteínas β (que ascendieron ante el avance de edad y peso), el resto de los analitos reveló asociaciones lineales de signo negativo (declinantes ante el incremento de peso y edad). Los valores de C-LDL correlacionaron significativamente con los de colesterol total ($r=0.75$, $p=0.001$).

Tabla 3: diferencias según sexo y peso vivo

parámetro	sexo		peso vivo (g)					
	machos	hembras	50-99	100-149	150-199	200-249	250-299	300-349
triglicéridos (g/l)	0.40 ^a	0.45 ^a	0.54 ^a	0.51 ^a	0.46 ^{ab}	0.36 ^b	0.38 ^b	0.29 ^c
colesterol t. (g/l)	0.65 ^a	0.59 ^a	0.69 ^a	0.71 ^a	0.67 ^a	0.57 ^b	0.58 ^b	0.49 ^c
C-HDL (g/l)	0.04 ^a	0.04 ^a	0.06 ^a	0.04 ^{ab}	0.05 ^{ab}	0.04 ^{ab}	0.02 ^b	0.03 ^{ab}
C-LDL (g/l)	0.41 ^a	0.36 ^a	0.48 ^a	0.51 ^a	0.39 ^b	0.40 ^b	0.34 ^b	0.29 ^b
lipoprot. α (%)	7.19 ^a	7.42 ^a	11.1 ^a	8.3 ^a	9.2 ^a	5.0 ^b	4.8 ^b	6.1 ^b
lipoprot. β (%)	91.6 ^a	94.9 ^a	88.8 ^a	91.9 ^a	90.8 ^a	95.0 ^b	95.1 ^b	93.7 ^b

En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 4: correlaciones obtenidas entre analitos plasmáticos, edad y peso

parámetro	edad (meses)			peso vivo (g)		
	r	p	tendencia	r	p	tendencia
triglicéridos (g/l)	-0.93	0.0001	↓	-0.96	0.001	↓
colesterol total (g/l)	-0.76	0.04	↓	-0.93	0.006	↓
C-HDL (g/l)	-0.80	0.01	↓	-0.83	0.04	↓
C-LDL (g/l)	-0.85	0.001	↓	-0.93	0.006	↓
lipoproteína α (%)	-0.84	0.005	↓	-0.83	0.03	↓
lipoproteína β (%)	0.84	0.005	↑	0.81	0.05	↑

r: correlación (Pearson), p: significancia, ↑: incrementativa, ↓: declinante.

La Tabla 5 revela que los valores significativamente más bajos de triglicéridos, colesterol total y C-LDL se registraron en ranas alimentadas con vísceras (pulmón bovino molido), seguidos de cerca por los ejemplares mantenidos con tales vísceras + *pellets* balanceados. Los valores más altos de dichos analitos ocurrieron en los animales que seleccionaron su alimento a libre albedrío (laguna), siendo intermedios los restantes. Teniendo en cuenta que los parámetros lipídicos son indicadores nutricionales que varían según la ingesta [1, 2, 3, 24], es probable que los cambios verificados se deban a la calidad y/o digestibilidad de los alimentos suministrados.

En tal sentido, carencias dietarias y agotamiento de reservas adiposas, así como alarmas simpáticas y disminuciones rigurosas de temperatura ambiental, provocan hipolipemia en los mamíferos [1]. En renacuajos de *Rana catesbeiana*, dietas con 38.6% de proteína bruta y niveles crecientes de energía digestible (ED = 3,627; 3,693; 3,758; 3,823; 3,889 y 3, 954 Kcal/kg), produjeron aumentos de la relación adiposo/somática de la carcasa, directamente proporcionales al contenido de energía del alimento [31]. En el presente ensayo también hubo diferencias atribuibles al sistema de manejo de los criaderos,

resultando significativamente bajos los niveles de triglicéridos en las ranas procedentes de Jardín América, donde el alimento se administró flotando en el agua.

Aparentemente, el consumo de alimentos “naturales” se traduciría en mayores niveles energéticos en sangre. Infortunadamente, *Rana catesbeiana* es considerada como *huésped indeseable* en las lagunas, porque su voraz apetito no tardaría en aniquilar a la fauna acuática original; el canibalismo no resultaría inusual en esta especie [10, 11]. Las necropsias permitieron verificar que el tubo digestivo de las ranas bajo estudio contenía pequeños peces, otras ranas y renacuajos, cangrejos, miriápodos, coleópteros y hemípteros acuáticos, así como abundante pasto.

Se asevera que el tubo digestivo de estos anuros es semejante al de los carnívoros y que –en vida libre– se alimentarían de insectos, anélidos, crustáceos, moluscos y pequeños vertebrados [13, 17]. En el Nordeste argentino, la dieta natural de anuros como *Bufo sp* estaría principalmente constituida por coleópteros e himenópteros [32]. Desde el punto de vista digestivo los renacuajos se comportarían como vegetarianos [15, 19], registrando cierto grado de coprofagia en los criaderos [33].

Tabla 5: diferencias según tipo de alimento y manejo del criadero (procedencia)

parámetro	tipo de alimento					Procedencia		
	1	2	3	4	5	Oberá	J. América	P. Patria
triglicéridos (g/l)	0.51 ^a	0.57 ^a	0.26 ^b	0.28 ^b	0.49 ^a	0.58 ^a	0.23 ^b	0.47 ^a
colesterol t. (g/l)	0.65 ^a	0.71 ^a	0.52 ^b	0.57 ^b	0.67 ^a	0.69 ^a	0.57 ^a	0.61 ^a
C-HDL (g/l)	0.04 ^a	0.05 ^a	0.03 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.04 ^a	0.03 ^a	0.04 ^a
C-LDL (g/l)	0.45 ^a	0.46 ^a	0.29 ^b	0.33 ^b	0.43 ^a	0.42 ^a	0.36 ^a	0.39 ^a
lipoprot. α (%)	9.6 ^a	8.7 ^a	5.8 ^a	6.6 ^a	7.1 ^a	8.6 ^a	6.4 ^a	6.7 ^a
lipoprot. β (%)	90.3 ^a	91.5 ^a	94.1 ^a	93.2 ^a	93.0 ^a	91.5 ^a	93.4 ^a	93.2 ^a

1: balanceado + lombrices, 2: natural, 3: vísceras, 4: balanceado + vísceras, 5: balanceado + larvas. En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas (test de Tukey, p < 0.05).

Una de las prioridades actuales es evaluar científicamente el tipo de alimento administrado a las ranas, pues hasta ahora las formulaciones se realizaron empíricamente a partir de la composición utilizada para peces carnívoros como las truchas. No existirían estudios que relacionen el tipo de alimento con los indicadores nutricionales del medio interno [18]. Son necesarias investigaciones que establezcan las verdaderas exigencias nutricias de esta rana, lo cual se traduciría en mayores ganancias económicas para los productores [10, 11].

Tabla 6: diferencias según época del año

parámetro	Temporada	
	invierno	resto del año
triglicéridos (g/l)	0.25 ^a	0.59 ^b
colesterol t. (g/l)	0.59 ^a	0.66 ^b
C-HDL (g/l)	0.04 ^a	0.04 ^a
C-LDL (g/l)	0.37 ^a	0.42 ^a
lipoprot. α (%)	7.1 ^a	7.5 ^a
lipoprot. β (%)	92.8 ^a	92.5 ^a

En cada fila, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La Tabla 6 indica que durante el invierno las ranas registraron valores significativamente más bajos de triglicéridos y colesterol total, con relación al resto de las estaciones del año. También fueron más bajos los niveles de C-LDL y lipoproteína α , sin significación estadística. Estos hallazgos se deberían a que durante la temporada de frío riguroso los anfibios se aletargan y dejan de alimentarse [10, 17, 19]. El ayuno prolongado provocaría disminución de la concentración plasmática de colesterol [2]. El descenso de los lípidos sanguíneos quizás deba también relacionarse al hecho que previamente a la hibernación aumentaría la síntesis de grasa de depósito [17], causando depleción de los triglicéridos plasmáticos. Las ranas regularían su tasa metabólica acorde a la temperatura ambiental [12, 13], disminuyendo los nutrientes energéticos del plasma durante la hibernación [17, 34, 35].

Tanto el clima como la alimentación provocarían variaciones hormonales en las ranas. En verano y durante el ayuno disminuiría la tasa de melatonina plasmática, sin ser afectados los niveles de cortisol ni aldosterona, en tanto que el ayuno aceleraría la metamorfosis por aumento de tiroxina [36]. Estudios efectuados en *Bufo americanus* indicaron que a temperaturas elevadas la captación de O_2 por piel sería mayor que la efectuada por pulmones, y vi-

ceversa; en cambio, para la excreción de CO_2 , siempre sería más importante la piel, a cualquier temperatura [15, 19]. Los cambios climáticos estacionales generarían respuestas de acomodación cardiorrespiratoria y afectarían marcadamente el consumo de O_2 , así como la tasa de glucosa plasmática en los anfibios [34, 35]. Algunas ranas hibernarían sumergidas, por lo que O_2 y CO_2 se intercambiarían a través de la piel. *Rana esculenta* sería capaz de sobrevivir 2-3 semanas sumergida; *Rana catesbeiana* tendría poco desarrollado este mecanismo y no sobreviviría mucho tiempo, quizás debido a su gran tamaño [17].

Los resultados obtenidos son concordantes con trabajos que reportan liberación de insulina en anfibios sometidos a baja temperatura [37]. En los mamíferos, la insulina transforma el exceso de glúcidos a triglicéridos, depositándolos en tejido adiposo e hígado; en ausencia de la hormona la grasa corporal libera ácidos grasos libres para uso energético, elevándose todos los lípidos sanguíneos [22]. En los anuros, las funciones de la insulina serían similares, liberándose por acción de carbohidratos metabolizables como glucosa, manosa y fructosa; en cambio, no provocarían secreción de insulina otros monosacáridos no metabolizables como galactosa y 2-desoxiglucosa [37]. En las ranas adultas, la reserva energética para el invierno se almacenaría en los “cuerpos grasos” contiguos a las gonadas; estos panículos lipídicos serían grandes en otoño y pequeños en primavera [19].

El lipidograma podría constituir un instrumento valioso en la detección de trastornos nutricionales y metabólicos (hepatopancreáticos) de la rana toro. Los principales problemas sanitarios de este anfibio derivarían de la malnutrición, inadecuado manejo y enfermedades transmisibles, muchas de las cuales afectarían al hepatopáncreas, el cual sería también susceptible a diversas intoxicaciones [10].

CONCLUSIONES

Se establecen valores de referencia para triglicéridos (0.43 ± 0.10 g/l), colesterol total (0.62 ± 0.14 g/l), C-HDL (0.04 ± 0.01 g/l), C-LDL (0.39 ± 0.09 g/l), lipoproteína α ($7.34 \pm 1.85\%$) y lipoproteína β ($92.65 \pm 4.62\%$) en *Rana catesbeiana*. El avance de la edad correlacionó con el aumento de peso y con las disminuciones de triglicéridos, colesterol, C-HDL y lipoproteína α , así como el aumento de lipoproteína β , sin diferencias significativas entre sexos. Los triglicéridos resultaron más bajos en el sistema de manejo que empleó la administración de alimento flotante en el agua. Colesterol, C-LDL y triglicéridos alcanzaron valores altos con dieta natural (laguna) y valo-

res bajos con alimentos no balanceados (vísceras). En invierno declinaron significativamente los niveles de triglicéridos y colesterol total.

AGRADECIMIENTOS

A los propietarios de los establecimientos de Oberá, Jardín América y Paso de la Patria, por su desinteresada colaboración. A Wiener Lab por suministrar los reactivos utilizados en el estudio.

REFERENCIAS

1. Coppo, J. A. *Fisiología Comparada del Medio Interno*. Ed. Dunken, Buenos Aires, p. 205-294, 2001.
2. Gómez Piquer, J. *Manual Práctico de Análisis Clínicos*, Ed. Mira, Zaragoza, p. 97-417, 1992.
3. Kalinov, A. *El Laboratorio, Interpretación Semiológica*, Ed. López, Buenos Aires, p. 553-568, 1984.
4. Bauer, J. E. *Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas*. *Pet's Cienc.* 13: 362-376, 1997.
5. Kaneko, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Academic Press, San Diego, p. 54-90, 1989.
6. Tavella, M. *Partículas lipoproteicas*. *Acta Bioq. Clín. Latin.* 27: 75-85, 1993.
7. Coppo, J. A.; Coppo, N. B. *Nutritional indicators changes and organic damages in cottonseed supplemented steers*. *Facena* 14: 1-6, 1999.
8. Coppo, J. A. *Effect of dietary lipidic charge in the concentration of bovine plasmatic lipids and lipoproteins*. *Acta Physiol. Pharm.* 40: 289-297, 1990.
9. Pavan, M. *Carne de rana toro. El batracio versus la merluza*. *Vet. Arg.* 13: 741-742, 1996.
10. Lima, S. L.; Agostinho, C. A. *A Criação de Rás*, Ed. Globo, Río de Janeiro, p. 5-188, 1988.
11. Longo, A. D. *Manual de Ranicultura*, Ed. Icone, Sao Paulo, p. 58-201, 1985.
12. Roman, L. R. *Ranicultura. Nueva tecnología de la cría de rana toro*. *Anales VII Congreso Argentino de Ciencias Veterinarias*, Buenos Aires, p. 190-198, 1994.
13. Eckert, R.; Randall, D.; Augustine, G. *Fisiología Animal*, Interamericana, Madrid, p. 35-596 1992.
14. Werner, E. E.; Wellborn, G. A.; McPeck, M. A. *Diet composition in postmetamorphic bullfrogs: implications for interspecific predation and competition*. *J. Herpetol.* 29: 600-607, 1995.
15. Goldstein, L. *Fisiología Comparada*. Interamericana, México, p. 176-436, 1982.
16. Hourdry, J.; Lhermite, A.; Ferrand, R. *Changes in the digestive tract and feeding behavior of anuran amphibians during metamorphosis*. *Physiol. Zool.* 69: 219-251, 1996.
17. Hill, R. W. *Fisiología Animal Comparada*, Ed. Reverté, Barcelona, p. 18-179, 1980.
18. Carnevia, D. *Ranicultura, estado actual de la explotación y comercialización de ranas para consumo*. *Anales de las VIII Jornadas Veterinarias de Corrientes*, p. 18-22, 1995.
19. Vilee, C. A. *Biología*. McGraw-Hill, México, p. 275-472, 1997.
20. Pesce, A. J.; Kaplan, L. A. *Methods in Clinical Chemistry*. Mosby, St. Louis, p. 1149-1223, 1990.
21. Busk, M.; Jensen, F. B.; Wang, T. *Effects of feeding on metabolism, gas transport, and acid-base balance in the bullfrog, Rana catesbeiana*. *Am. J. Physiol.* 278: 185-195, 2000.
22. Guyton, A. C.; Hall, J. E., *Fisiología y Fisiopatología*. McGraw-Hill, México, p. 545-617, 1999.
23. Coles, E. H. *Veterinary Clinical Pathology*, Saunders, Philadelphia, p. 114-166, 1986.
24. Kolb, E. *Fisiología Veterinaria*, Acribia, Zaragoza, p. 426-442, 1987.
25. Baba, K.; Abe, T. K.; Tsunasawa, S.; Odani, S. *Characterization and primary structure of a fatty acid-binding protein of the Amphibia, Rana catesbeiana*. *J. Biochem.* 125: 115-122, 1999.
26. Suzuki, N.; Deguchi, K.; Ueta, N.; Nagano, H.; Shukuya, R. *Chemical characterization of the serum VLDL and HDL from bullfrog, Rana catesbeiana*. *J. Biochem.* 80: 1241-1246, 1976.
27. Saunders, D. K.; Fowler, O.; Smalley, K. N. *The effects of estradiol treatment on the blood viscosity of the bullfrog Rana catesbeiana*. *Trans. Kansas Acad. Sci.* 10: 38-45, 2000.
28. Coppo, J. A.; Coppo, N. B. *Evolución de valores de la bioquímica clínica conforme avanza el envejecimiento. Estudio en población del nordeste argentino*. *Prensa Méd. Arg.* 87: 717-727, 2000.
29. Coppo, J. A.; Coppo, N. B.; López, J. J.; Jovanovics, L. *Modificaciones de los analitos sanguíneos en el perro ovejero alemán provocadas por la edad avanzada*. *Selecc. Vet.* 6: 540-544, 1998.
30. Boonman, C.; Kaewmanee, C.; Kaewluan, W.; Jiewprasat, K. *Study on dietary protein requirement*

- for bullfrog (*Rana catesbeiana*). Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Fishery Station, Mae Hong Son. <http://www.agri.ubu.ac.th/research/bullfrog.html>, 2002.
- 31. Albinati, R. C.; Lima, S. L.; Donzele, J. L.** *Níveis de energia digestível na ração de girinos de rã-touro*. Rev. Bras. Saúde Prod. An. 2: 48-52; 2001.
- 32. Duré, M. I.; Kehr, A. I.** *Explotación diferencial de los recursos tróficos en cuatro especies de bufonidos del nordeste argentino*. Actas Cienc. & Técn.UNNE 6: 17-20, 1999.
- 33. Hoffmann, D. F.; Leboute, E. M.; Souza, S. M.** *Performance of bullfrogs tadpoles (*Rana catesbeiana* Shaw 1802) at 20°C*. Rev. Soc. Bras. Zoot. 19: 321-325, 1990.
- 34. Bicego, K. C.; Branco, L. G.** *Seasonal changes in the cardiorespiratory responses to hypercarbia and temperature in the bullfrog, *Rana catesbeiana**. Comp. Biochem. Physiol. 124: 221-229, 1999.
- 35. Rocha, P. L.; Branco, L. G.** *Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature in the bullfrog *Rana catesbeiana**. J. Exp. Biol. 201: 761-768, 1998.
- 36. Wright, M. L.; Proctor, K. L.; Alves, C. D.** *Hormonal profiles correlated with season, cold, and starvation in *Rana catesbeiana* tadpoles*. Comp. Biochem. Physiol. 124: 109-116, 1999.
- 37. Francini, F.; Gagliardino, J. J.** *Carbohidratos y secreción de insulina in vitro en el páncreas de *Bufo arenarum**. Anales del III Congreso Argentino de Herpetología, Corrientes, p. 37, 1997.