



REPORTES CIENTÍFICOS

D E L A F A C E N

ISSN 2078-399X (impreso)

ISSN 2222-145X (online)

Volumen 12

Número 1

2021

Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguay.

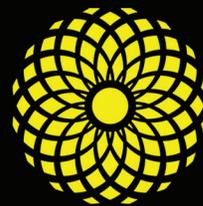
Las Zonas Sísmicas en Paraguay.

Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del chaco seco paraguayo.

Evaluación del uso de *Landoltia punctata* a escala mesocosmos en el tratamiento complementario de aguas residuales proveniente de sistema RBC a escala laboratorio.

Determinación del movimiento escolar en las instituciones educativas de la ciudad de Capiatá, Departamento Central.

Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC.



FACE N

Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales

PUBLICACIÓN CIENTÍFICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN-PARAGUAY

REPORTES CIENTÍFICO DE LA FACEN



Reportes Científicos de la FACEN, es una revista de acceso libre y gratuito y es la publicación científica oficial de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción. Es emitida semestralmente y publica artículos originales, artículos de revisión, tópicos actuales, reportes de casos, comunicaciones cortas y cartas al editor, en las áreas de Biología, Química, Física, Matemática Pura, Matemática Estadística, Geología, Biotecnología y Tecnología de Producción. Los trabajos y opiniones publicados en la revista son de exclusiva responsabilidad de los autores.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Prof. Dra. Zully Vera de Molinas
Rectora

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Prof. Constantino Nicolás Guefos Kapsalis, MAE
Decano

Dirección Web

www.facen.una.py

REPORTES CIENTÍFICOS DE LA FACEN

Dirección postal

Reportes Científicos de la FACEN, Dirección de
Investigación, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Campus Universitario, Casilla de Correo 1039, San Lorenzo,
Paraguay

Teléfono/Fax

595 21 585600 interno 237

E-mail

reportescientificos@gmail.com

Dirección web

<http://www.facen.una.py/es/publicaciones-cientificas/>

Editor en Jefe

Prof. Dr. Fernando José Méndez Gaona, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Comité Editorial Nacional

Dr. Bolívar Rafael Garcete Barrett
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Lic. Nery López
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Dra. Celeste Vega
Centro para el Desarrollo de Investigación Científica

Dra. Miriam Rolon
Centro para el Desarrollo de Investigación Científica

Dra. Antonieta Rojas de Arias
Organización Panamericana de la Salud - Paraguay

Comité Editorial Internacional

Dr. Robert Owen
Texas Tech University - Estados Unidos

Dra. Ana Honfi
Universidad Nacional de Misiones - Argentina

Dr. Julio Daviña
Universidad Nacional de Misiones - Argentina

Dr. Nicolás Niveiro
Universidad Nacional del Nordeste - Argentina

Dra. María Paula Badenes
Universidad Nacional de La Plata - Argentina

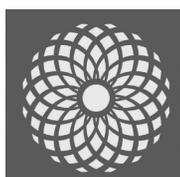
Dr. José Seguinot
Universidad de Puerto Rico - Puerto Rico

Dr. Ángel Vara Vela
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Fábio Luis Teixeira Gonçalves
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Víctor Velázquez
Universidad de São Paulo - Brasil

Dr. Sebastián Simondi
Universidad Nacional de Cuyo - Argentina



FACEN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad Nacional de Asunción

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 12, Nº 1	enero-junio de 2021	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	---------------------	---

REPORTES CIENTÍFICOS DE LA FACEN

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 12, Nº 1	enero-junio de 2021	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	---------------------	---

ARTÍCULOS ORIGINALES

- 3-9 **Tomás López, Yadira Parra, Danilo Fernández, Sandra Álvarez, Camila Ayala, Matías Policani & Gabriela Ulke.** Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguayo.
- 10-20 **Rafael Fugarazzo, Moisés Gadea, Maximiliano Caballero, Marcelo Souza de Assumpção & Vincent Figueres.** Las Zonas Sísmicas en Paraguay.
- 21-31 **Yolanda Amelia López Benítez, Leandro Marcio Moreira & Gilberto Antonio Benítez Rodas.** Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del chaco seco paraguayo.
- 32-41 **Shaun Patrick McGahan, Tomás López, Pablo Heleno Sezerino, Francisco Ferreira, Leonida Medina & Rodrigo Mohedano.** Evaluación del uso de *Landoltia punctata* a escala mesocosmos en el tratamiento complementario de aguas residuales proveniente de sistema RBC a escala laboratorio.
- 42-47 **Liz Paola Lugo, Liz Mariela Centurión & Roberto Martínez-López.** Determinación del movimiento escolar en las instituciones educativas de la ciudad de Capiatá, Departamento Central.
- 48-58 **Julio César Benítez-Villalba, Mirtha Letizia Grau-Torales, Oscar Daniel Cristaldo-López, Arturo Iván Bogado-Fernández, Liliana Antonia Arrúa-Martínez & Nadia Mabel Villalba-Villalba.** Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC.

FE DE ERRATAS

- 59 Fe de Erratas de la publicación especial “Memorias del XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental”.



Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguayo

Growth inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by lactic acid bacteria isolated from raw milk and Paraguayan cheese

Tomás López^{1,4}, Yadira Parra^{1,2}, Danilo Fernández¹, Sandra Álvarez¹, Camila Ayala^{1,3},
Matías Policani^{1,3} & Gabriela Ulke¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Itapúa, Facultad de Ciencia y Tecnología, Maestría en Biotecnología en alimentos, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Iniciación Científica, San Lorenzo, Paraguay.

⁴Email: tlopez@facen.una.py

Resumen: Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que poseen una gran capacidad para la bioconservación. Son conocidas por la producción de una variedad de compuestos antagonistas, entre ellos las bacteriocinas. Su potencial antimicrobiano está definido por la acción combinada de los metabolitos sobre bacterias no deseadas. En este trabajo se evalúa la actividad antimicrobiana de 8 cepas de BAL aisladas de leche cruda y queso Paraguayo contra *E. coli* y *S. aureus* mediante dos metodologías: antibiograma y ensayos en medio líquido. Se observó inhibición de los patógenos con ambas metodologías. Sin embargo, encontramos mejores resultados con el ensayo en medio líquido.

Palabras clave: BAL, lácteos, bioconservación, antimicrobianos, inhibición, patógenos.

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms with great potential for biopreservation. They are known to produce a variety of antagonistic compounds, among them bacteriocins, and their antimicrobial potential is defined by the combined action of metabolites on non-desired bacteria. This work evaluates the antimicrobial activity of 8 strains of LAB isolated from raw milk and Paraguayan cheese against *E. coli* and *S. aureus* by two methodologies: antibiograms and liquid medium assays. Both methodologies yielded growth inhibition against the pathogens. However, we found better results with the liquid medium assays.

Keywords: LAB, dairy, biopreservation, antimicrobials, inhibition, pathogens.

Introducción

Las bacterias ácido láctica (BAL) constituyen un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas, anaerobias, no esporuladoras, que pueden ser cocos o bacilos y que producen ácido láctico como principal producto durante el proceso de fermentación y poseen un gran potencial biotecnológico en la industria de alimentos (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Sabatini, 2010). Como cualquier BAL que participe en un proceso de fermentación puede producir una variedad de compuestos inhibidores, el potencial antimicrobiano de estas bacterias está dado por la acción combinada de sus metabolitos en bacterias indeseadas (Salomskiene et al., 2019).

La importancia de las pruebas de enfrentamiento

radica en tener resultados sobre actividad antimicrobiana de las BAL aisladas frente a patógenos comúnmente encontrados en los alimentos y que producen su deterioro o enfermedades transmitidas por los alimentos; para los cuales deben actuar como bacteriostáticos o bactericidas.

Materiales y Métodos

Obtención de cepas

Se utilizaron 8 cepas previamente aisladas de BAL: M6A, M6B, M16A, M17A, M17B, M18, M19 y M21 que posteriormente fueron depositadas al cepario del Departamento de Biotecnología de la FACEN-UNA. Como cepa control se utilizó *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™.

Recibido: 27/01/2020 Aceptado: 12/02/2021



Pruebas de actividad antimicrobiana

Antibiogramas

Se plantearon tres pruebas de enfrentamiento bacteriano independientes, cultivando las BAL en distintos periodos de incubación y con distintos procesos de tratamiento del sobrenadante con el fin de obtener resultados óptimos en cuanto a la actividad inhibitoria (Jabbari et al., 2017; Kormin et al., 2001).

Procedimiento 1

Se procedió a la activación de las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia. Pasado el periodo, se tomaron con un asa de siembra 5 µL de colonias provenientes de los cultivos, y se traspasaron a tubos que contenían 5 mL del MRSB, y se incubaron por 19 horas a 37 °C. Luego se tomaron 3 mL de las cultivos y se centrifugaron a 8290 g por 20 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 µm SFCA (Minisart, Sartorius), logrando así un sobrenadante libre de células. Posteriormente, se procedió a la realización de pocillos de 5 mm en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar. Se colocaron 25 µL del sobrenadante libre de células en cada pocillo. Una vez colocadas las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas para permitir que el sobrenadante se difundiera.

Se inocularon 100 µL cada una de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas en atmósfera de aerobiosis. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición, con ayuda de una regla de vernier. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Procedimiento 2

Se realizó primeramente la activación de las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia, pasado el periodo, tomando un

asa de siembra de 5 µL de colonias provenientes de los cultivos y se traspasaron a tubos con 5 mL de MRSB, se incubaron por 93 horas a 37 °C; se tomaron 3 mL de los cultivos y se centrifugaron los 3 mL a 8290 g por 20 minutos a 4 °C. Se filtró el sobrenadante con filtros de 0,22 µm SFCA (Minisart, Sartorius), logrando así un sobrenadante libre de células. Posteriormente se procedió a la realización de pocillos de 5 mm en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar. Se colocó 25 µL del sobrenadante libre de células en cada pocillo, una vez colocadas todas las muestras se incubaron a 4 °C durante 2 horas para permitir que el sobrenadante se difundiera.

Se inoculó 100 µL de cada una de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas en atmósfera de aerobiosis. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición, con ayuda de una regla de vernier. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Procedimiento 3

Se realizó sin tratamiento previo del sobrenadante, dejando en el mismo todas las células bacterianas presentes; primeramente, activando las bacterias en estudio por 24 horas en MRSA a 37 °C en atmósfera aerobia, pasado el periodo, se tomó un asa de siembra de 5 µL de colonias provenientes de los cultivos y se traspasaron a tubos con 5 mL del MRSB, se incubaron por 24 horas a 37 °C. Se realizaron pocillos en placas con MHA y se agregó 10 µL de MHA en cada pocillo para cerrar el fondo del mismo y se dejó gelificar, se colocó 25 µL del cultivo no tratado en cada pocillo.

Se inoculó 100 µL de las cepas patógenas de 24 horas de incubación en Agar LB, *E. coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 25922™) y *S. aureus* subsp. aureus Rosenbach (ATCC®

Tabla 1. Tratamientos utilizados en la prueba de inhibición en medio líquido.

Tratamientos		Componentes (240 µL)
1	Medio estéril	200 µL de medio LB + 40 µL de agua estéril
2	Control 1	185 µL de agua estéril + 40 µL de medio LB + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
3	Control 2	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
4	Medio + Agua	185 µL de medio MRSB + 40 µL de medio LB + 15 µL de agua estéril
5	Blanco	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de agua estéril
6	Ensayos	40 µL de medio LB + 185 µL de sobrenadante + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)
7	Control +	40 µL de medio LB + 185 µL de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC® 8014™ + 15 µL de patógeno ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL)

25923™) y se realizó el hisopado por toda la placa creando un césped homogéneo. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas. Por último, se procedió al control de los resultados midiendo el halo de inhibición; todos los ensayos se realizaron por triplicado (Kormin et al., 2001).

En los tres procedimientos se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC® 8014™), como control positivo de potencial inhibidor frente a las bacterias patógenas humanas y como control negativo se utilizó suero fisiológico al 0,9% estéril.

Prueba en medio líquido

Preparación de sobrenadantes y patógeno

Se cultivaron las cepas de BAL en medio MRSB por 24 h a 37 °C y las cepas patógenas *E. coli* y *S. aureus* en medio LB por 24 hs a 37 °C, ambas en una incubadora de CO2 serie 3 water-jacketed (Thermo Scientific™), con una atmósfera de CO2 de 0,1%. Se centrifugaron los cultivo de los patógenos a 4500 rpm por 10 min a 10 °C en una centrífuga refrigerada TGL-16M (Boyn™), se desechó el sobrenadante y se resuspendió en PBS (1X). Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 600 nm buscando llegar a una absorbancia de equivalente a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Luego, se hicieron dos diluciones seriadas 1:10. Por otra parte, se centrifugaron los cultivos de

BAL a 6000 g (7600 rpm) por 20 minutos a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. Luego se filtraron los sobrenadante con filtros de 0.22 µm (Sartorius) y se neutralizaron con hidróxido de sodio hasta un pH de 6~7 (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016).

Finalmente, se incubó en una placa multipocillo (×96) a 37 °C por 24 h en un Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Scientific™), acorde a los tratamientos presentados en la Tabla 1, y se midió la densidad óptica a 620 nm cada 30 min por espectrofotometría durante la incubación (Gellert et al., 1999; Zimina et al., 2016). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado; como control positivo se utilizó se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC® 8014™) y como controles negativos se utilizaron: medio LB y agua estéril (Control 1) y medio MRSB y medio LB (Control 2), ambas inoculadas con 15 µL de *L. monocytogenes* ($1,5 \times 10^5$ UFC/mL).

Cálculo del porcentaje de inhibición

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se procedió a utilizar la absorbancia máxima del tratamiento y del control y se utilizó la siguiente fórmula:

$$I = \frac{Abs_t - Abs_c}{Abs_c} \times 100$$

Donde:

I = Porcentaje de inhibición.

Abs_t = Absorbancia máxima del tratamiento.

Abs_c = Absorbancia máxima del control.

Resultados y discusión

Antibiogramas

En esta investigación se realizaron en total doce enfrentamientos, todos por triplicado, siguiendo las tres metodologías descritas en todos los casos. Aunque las BAL hayan tenido corto o largo periodo de incubación, los resultados arrojaron valores mínimos en cuanto a inhibición de las bacterias patógenas con las que fueron enfrentadas. Esto puede deberse a la falta de estrés de las BAL, las cuales para que liberen sus metabolitos secundarios deben tener un periodo de incubación prolongado o faltantes de nutrientes en su medio.

En todas las pruebas se detectaron zonas de inhibición mayores a 1 mm (Tablas 2-4). En la prueba del estudio de Kormin *et al.* (2001) se registró una sola zona de inhibición pequeña, indicando así un efecto inhibitorio de crecimiento frente a otras cepas; una variable de importancia fue el control

Tabla 2. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 19 horas de incubación.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	2,00	3,46
M6B	0,00	0,00	4,70	4,04
M16A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17A	0,00	0,00	6,70	0,58
M17B	1,30	2,30	7,00	0,00
M18	0,00	0,00	2,30	4,04
M19	0,00	0,00	2,30	4,04
M21	0,00	0,00	2,30	4,04
Control	0,00	0,00	5,30	1,15

Tabla 3. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 93 horas de incubación.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	0,00	0,00
M6B	0,00	0,00	0,00	0,00
M16A	0,00	0,00	2,00	3,46
M17A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17B	0,00	0,00	0,00	0,00
M18	2,00	3,46	2,67	4,62
M19	0,00	0,00	2,67	4,62
M21	2,00	3,46	0,00	0,00
Control	0,00	0,00	0,00	0,00

del pH en los ensayos, pues el mismo es un factor muy importante para la producción de agentes antimicrobianos de las BAL (Biswas *et al.*, 1991; Parente *et al.*, 1994), inhibiendo así el crecimiento bacteriano de cepas patógenas.

Procedimiento 1

Para el primer procedimiento se procedió según la metodología descrita en Jabbari *et al.* (2017), donde se enfrentaron 8 cepas de BAL aisladas y reactivadas por 19 horas. En el caso de *E. coli* solo se observó un halo de inhibición frente a M17B y en el caso de *S. aureus* se observó un halo de inhibición para todas las cepas estudiadas a excepción de M16A, los mayores halos corresponden a M17A (6,70 mm) y M17B (7,00 mm) (Tabla 2).

Procedimiento 2

En este procedimiento se cultivaron las 8 cepas de BAL aisladas por 93 horas frente a cepas patógenas alimentarias, se obtuvieron halos de inhibición en el caso de *E. coli* frente a M18 y M21, ambos de 2,00 mm y para *S. aureus* se observaron halos de inhibición frente a M16A, M18 y M19. Con este

procedimiento no se obtuvieron halos frente al control positivo (Tabla 3), por lo que no es recomendable utilizar.

Procedimiento 3

En la tercera prueba de enfrentamiento la variable principal fue la no realización de los tratamientos previos de las células bacterianas posteriores a su incubación de 24 horas, las 8 cepas de BAL fueron aisladas y reactivadas por 24 horas y enfrentadas a cepas patógenas alimentarias; no se obtuvieron halos de inhibición en el caso del enfrentamiento con *E. coli* y en el caso de *S. aureus* se observaron halos frente a M6A, M17A, M18, M19, M21 y el control (Tabla 4). Los mayores halos de inhibición corresponden a M18 (4,33 mm) y M21 (4,00 mm).

Usando como base el estudio de Jabbari *et al.* (2017), de 40 muestras de origen lácteo, se obtuvieron 11 BAL aisladas, y en el estudio de antagonismo de todas ellas frente a bacterias patógenas como son *S. tiphy*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. coli* frente a los aislados se obtuvieron valores más significativos, donde una de las variables es el periodo de incubación de las BAL en el proceso

Tabla 4. Prueba de actividad antimicrobiana en placa con cultivos de BAL de 24 horas de incubación sin tratamiento previo del sobrenadante.

Muestra	Cepa patógena			
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar (mm)
M6A	0,00	0,00	2,00	3,46
M6B	0,00	0,00	0,00	0,00
M16A	0,00	0,00	0,00	0,00
M17A	0,00	0,00	2,00	3,46
M17B	0,00	0,00	0,00	0,00
M18	0,00	0,00	4,33	3,79
M19	0,00	0,00	2,00	3,46
M21	0,00	0,00	4,00	3,46
Control	0,00	0,00	2,30	4,04

previo al enfrentamiento y la atmósfera modificada de oxígeno. En el estudio mencionado se utilizaron incubaciones de 48 y 72 horas, produciendo mayor estrés a las BAL; en cambio en las tres pruebas realizadas en este estudio, los periodos de incubación fueron sólo de 19, 24 y hasta 93 horas; sugiriendo que cuanto más estresadas se encuentran las BAL, mayor poder de inhibición tienen frente a patógenos. Otros estudios demuestran que el efecto inhibidor de BAL frente a *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*, todas ellas reconocidas patógenas de origen alimentario, que son de aún mayor relevancia ya que son las de mayor incidencia y prevalencia en los estudios referidos a enfermedades de transmisión alimentaria.

Las pruebas referidas al enfrentamiento antagónico realizadas en el presente trabajo posibilitaron determinar cuáles BAL aisladas son posibles productoras de bacteriocinas y qué enfrentamientos realizar en nuevas pruebas.

Prueba en medio líquido

Se realizaron 3 repeticiones de cada ensayo para cada uno de los patógenos, cuyos resultados se observan en la Tabla 5.

Se observaron porcentajes de inhibición de hasta 99% en algunos casos. Sin embargo, se observa que existen diferencias en el porcentaje de inhibición entre repeticiones de algunos de los sobrenadantes analizados.

Conclusión

En casi todos los estudios bibliográficos se determina que las BAL tienen varios compuestos con propiedades inhibitorias frente a bacterias patógenas y deteriorantes de alimentos, por lo que es importante en este estudio destacar que debemos proseguir con los ensayos de inhibición, con las bacterias aisladas e identificadas determinando las fuentes de actividad inhibitoria como ácidos orgánicos, peróxidos de hidrógeno y bacteriófagos.

Si bien se observaron inhibiciones de crecimiento para todos los métodos utilizados, los

Tabla 5. Porcentajes de inhibición obtenidos mediante la prueba de inhibición en medio líquido.

Muestra	Porcentaje de Inhibición					
	Cepa Patógena					
	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
M6A	14,66%	4,82%	-3,28%	-29,08%	31,17%	-44,36%
M6B	7,32%	56,84%	-7,18%	-	31,58%	-46,06%
M16A	31,34%	-0,35%	-	-	-4,32%	-99,68%
M17A	-	24,60%	18,90%	-	25,60%	-93,50%
M17B	-	0,27%	-5,89%	-	-33,44%	-61,59%
M18	10,12%	33,71%	35,93%	-99,44%	-99,68%	-
M19	4,89%	72,42%	32,21%	-99,46%	33,36%	-36,12%
M21	-99,47%	-99,78%	-	-83,62%	12,30%	-99,46%
Control	13,14%	-97,93%	-	-98,10%	-99,74%	-92,07%

métodos que mejor funcionaron en términos generales son el procedimiento 1 de antibiogramas y la prueba en medio líquido. Además, en todos los ensayos se observó que *S. aureus* fue más susceptible a los tratamientos que *E. coli*.

Para obtener mejores resultados se recomienda la estandarización y optimización de los dos métodos mencionados anteriormente para reducir la varianza que existe entre distintas repeticiones.

Por otro lado la utilización de la prueba en medio líquido es interesante no solo porque permite cuantificar la inhibición lo que hace sea más fácil de comparar los resultados sino también porque la utilización de placas multipocillos permite realizar diferentes ensayos y/o tratamiento en simultáneo por lo que permite ahorrar tiempo y reactivos debido a que se trabajan con volúmenes menores en comparación con las pruebas de antibiograma. Por lo que los posteriores ensayos de inhibición serán realizados mediante esta metodología.

Agradecimientos

El trabajo se realizó en el marco del proyecto “Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos aisladas de productos lácteos (PINV15-681)” financiado por el CONACYT a través de su programa PROCENCIA.

Literatura citada

- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7): 2939–2951.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C., & Ray, B. (1991). Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1265–1267.
- Gellert, G., Stommel, A., & Trujillano, A. B. (1999). Development of an optimal bacterial medium based on the growth inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*, 39(3), 467–476.
- Jabbari, V., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Askari, F., Ahmadi, E., Hassanzadeh, A. mohammad, Aghazadeh, S. buick, Asgharzadeh, M., & Kafil, H. S. (2017). Molecular Identification of *Lactobacillus acidophilus* as a probiotic potential from traditional doogh samples and evaluation of their antimicrobial activity against some pathogenic bacteria. *Biomedical Research*, 28(4): 1458–1463.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S., & Ling, F. H. (2001). Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented

- Food. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 8(1), 63–68.
- Parente, E., Ricciardi, A., & Addario, G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 14ONWC during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 388–394.
- Sabatini, N. (2010). A Comparison of the Volatile Compounds, in Spanish-style, Greek-style and Castelvetrano-style Green Olives of the Nocellara del Belice Cultivar. Pp. 219–231 in Preedy, V. & Watson, R. (eds.). *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Amsterdam: Academic Press. 746 pp.
- Salomskiene, J., Jonkuvienė, D., Macioniene, I., Abraitiene, A., Zeime, J., Repeckiene, J., & Vaiciulyte-Funk, L. (2019). Differences in the occurrence and efficiency of antimicrobial compounds produced by lactic acid bacteria. *European Food Research and Technology*, 245(3), 569–579.
- Zimina, M. I., Sukhih, S. A., Babich, O. O., Noskova, S. Yu., Abrashina, A. A., & Prosekov, A. Yu. (2016). Investigating antibiotic activity of the genus *Bacillus* strains and properties of their bacteriocins in order to develop next generation pharmaceuticals. *Food and Raw Materials*, 4(2), 92–100.

Las Zonas Sísmicas en Paraguay

The Seismic Zones in Paraguay

Rafael Fugarazzo^{1,3}, Moisés Gadea¹, Maximiliano Caballero¹,
Marcelo Souza de Assumpção² & Vincent Figueres¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Laboratorio de Sismología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidade de São Paulo, Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas, São Paulo, SP, Brasil.

³Email: rfugarazzo@facen.una.py.

Resumen: Habiendo recurrido a una revisión de catálogos de eventos sísmicos históricos y recientes, publicados por instituciones de monitoreo regionales de Argentina, Bolivia, Brasil y los registros de la Estación Sismológica de FaCEN – UNA (CPUP) de aquellos sismos con epicentros dentro del territorio paraguayo, se reporta un inventario de sismos ocurridos en Paraguay y se proponen sus zonas sísmicas.

Palabras Clave: Sismos, Paraguay, Intraplaca, Subducción.

Abstract: Having checked catalogs of historical and recent seismic events, posted by regional monitoring stations of Argentina, Bolivia, Brazil and the seismic records of the Seismological Station at FaCEN – UNA (CPUP) of those earthquakes with epicenters in the Paraguayan territory, an inventory of earthquakes occurred in Paraguay is reported and its seismic zones are proposed.

Key Words: Earthquakes, Paraguay, Intraplate, Subduction.

Introducción

Paraguay se localiza entre los paralelos 19° y 27.7° Sur; y los meridianos 54° y 63° Oeste en el subcontinente Sudamérica, rodeado por Argentina, Bolivia y Brasil; en el centro de la Placa Sudamericana, en los márgenes nororientales de la cuenca del Chaco y suroccidentales de la cuenca del Paraná (Figura 1).

Algunos Antecedentes

Según Rengger (2010), en Paraguay los temblores son muy raros, y en caso de ocurrir, se sienten apenas. Harrington (1950), realizó consideraciones a partir de un evento percibido por la población el día 24 de diciembre de 1944 en el contexto del valle de Ypacaraí: *la sacudida fue lo suficientemente intensa para alarmar a la gente (...) y se escucharon como relámpagos distantes (brontides), lo cual prueba que el sismo fue local y que las fracturas principales aún siguen activas en la zona.*

En la bibliografía antigua se comprueba que las primeras mediciones refinadas de sismos paraguayos fueron llevadas a cabo por Assumpção & Suarez (1988), con el objeto de medir el mecanismo focal

del sismo ocurrido el 8 de abril de 1982 en el bajo Chaco. En un trabajo posterior, Assumpção (1992) determina el mecanismo focal para otro evento chaqueño acaecido el 12 de abril de 1985.

Veloso et al. (1994) realizan una evaluación de la sismicidad del Paraguay. Este se constituye en el primer trabajo de investigación de la situación sismológica propiamente de Paraguay.

La publicación de Berrocal & Fernandes (1996) se destaca como uno de los de mayor relevancia en relación a la sismología del Paraguay y sus regiones vecinas. En dicho trabajo también se proponen posibles fuentes sismogénicas y se caracterizan eventos en función de sus profundidades.

Con datos de primera mano del Observatorio Sismológico de la Universidad de Brasilia (OSB) en complemento con algunos pocos registros del catálogo de la USGS, Barros et al. (2001) realizan un historial de los sismos ocurridos en Paraguay.

La siguiente actualización del catálogo sismológico del Paraguay se presenta en el Congreso del Centro Regional de Sismología para América del Sur (CERESIS), en Lima – Perú, y en donde

Recibido: 27/11/2019 Aceptado: 26/03/2021



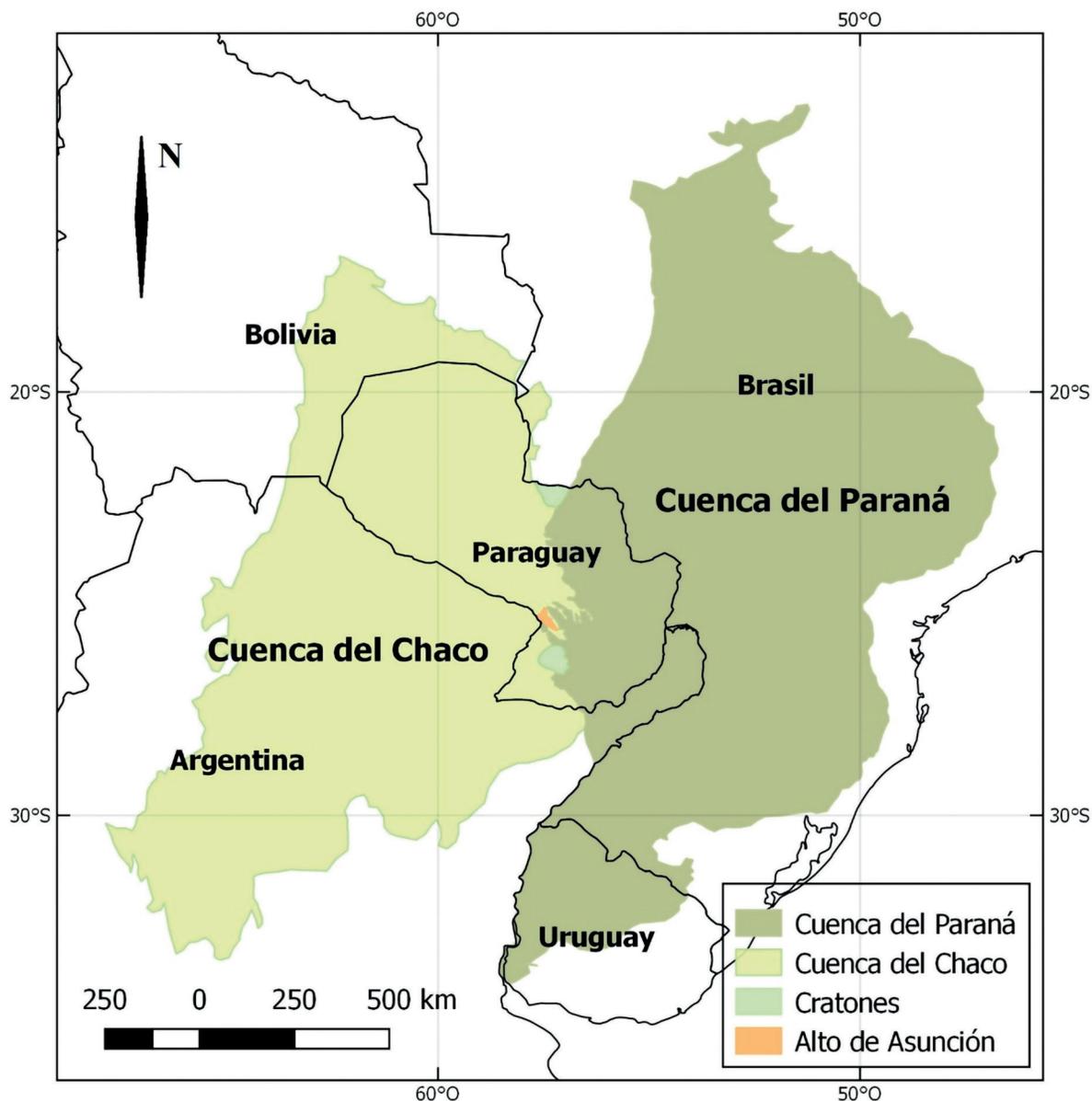


Figura 1. Paraguay en el entorno geográfico Sudamericano.

Velázquez et al. (2009) realizan un recuento de las actividades que hacen al desarrollo de la sismología en Paraguay.

El último y reciente inventario fue elaborado por Caballero (2018), en su tesis para obtención de Grado – Mención Geología: “Sismicidad del Paraguay”, en la Universidad Nacional de Asunción. En dicho trabajo, agregado al catálogo actualizado, se

mencionan y destacan diversos aspectos sismológicos observados y reportados en Paraguay.

Estaciones de Monitoreo Sísmico en Paraguay Red Sismográfica Binacional ITAIPU (ISN)

Implementada en 1980 con una estación, la red de ITAIPU se compone actualmente por seis estaciones remotas, tres de la cuales se localizan en el

territorio brasileño y tres en el paraguay. Una red telemétrica envía datos a un laboratorio central, ubicado en el dique de la represa en la cota 214.

Estación Sismológica CPUP

Perteneciente a Global Seismograph Network (GSN) envía datos en tiempo real desde el 4 de agosto de 1994. Los sismómetros se encuentran en el distrito de Montiel Potrero de Caapucú, al suroeste del departamento de Paraguari; por tal motivo fue designado el código con el acrónimo CPUP para esta estación, abreviando de: Caapucú – Paraguay.

Los datos son registrados por los sismómetros e inmediatamente digitalizados y enviados vía satélite al laboratorio de sismología, localizado en el predio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción; y luego, por el mismo método telemétrico, los datos son redirigidos a los cuarteles de la fuerza aérea (AFTAC) de los EE.UU. y a la sede de CTBTO en Viena.

CTBTO opera como un organismo internacional, cuyo interés radica en la adherencia de los países al Tratado de la Prohibición Completa de Ensayos Nucleares. Dicha entidad dispone de recursos tecnológicos capaces de monitorear pruebas de armas nucleares en cualquier geografía del globo terrestre, así como promueve el desuso de este tipo armas. Paraguay ha firmado y ratificado dicho Tratado en 1996 y el 2001 respectivamente.

El laboratorio de sismología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales sigue en plena vigencia, y los trabajos operativos de procesamiento de datos y mantenimientos son llevados a cabo por técnicos paraguayos en conjunto con los norteamericanos. Asimismo, se analizan datos sísmicos crudos para determinar algunos parámetros fundamentales de los eventos autóctonos, y que con cierta frecuencia afectan a la población civil en Paraguay.

Sismología

¿Sismo o Terremoto?

Etimológicamente, del griego, sismo significa “temblor”; y terremoto “movimiento de suelo”. Estrictamente son sinónimos, y se diferencian en

el uso en base a los efectos del evento: sismo se refiere a aquellas sacudidas que causan susto, sin ocasionar daños mayores; y terremoto para aquellos ajetreos violentos que de alguna forma han tenido incidencia social, incluso pérdidas humanas y/o daños edificios severos.

Según ciertas agencias, sismo es cualquier evento entre el rango de Magnitud del 1 al 6, y terremoto aquel evento que supera el valor de 6 (Sánchez, 2016. Comunicación personal); aunque en EE.UU. a todos los eventos sin distinción se los denomina comúnmente “*earthquake*”.

Consideraciones Preliminares

Los sismos sentidos en Paraguay son de dos tipos naturales: los autóctonos (o locales) y los alóctonos. Los sismos autóctonos son aquellos cuyos epicentros se localizan dentro del territorio paraguay. Los alóctonos son eventos percibidos por la población y que ocurren en países regionales como ser Argentina y Chile (Caballero, 2018). Si las sacudidas regionales conllevan suficiente energía son percibidas en Paraguay. De este último tipo de eventos no se consideran los detalles en el presente trabajo.

También se ha verificado en los sismogramas una infinidad de señales de eventos que no fueron reportados por la población. Son los pequeños sismos (<2 de Magnitud Richter), solamente comprobables por medio de los sismómetros, y de los cuales es posible extraer información acerca de la tectónica local. Este tipo de sismos son conocidos como los instrumentales (Kulháněk, 1990), que merece un desarrollo investigativo de carácter propio, por lo cual no ha sido incluido en este escrito. Se ha calculado la ocurrencia de los sismos instrumentales como de 600.000 veces por año en todo el mundo (Tarbuck & Ludgens, 2005).

Naturaleza de los Sismos en Paraguay

Se proponen dos fuentes sismogénicas en Paraguay: una relacionada con la subducción de la Placa de Nazca, cuyos eventos se destacan por sus magnitudes moderadas y de hipocentros profundos, preferentemente en el margen chaqueño. La otra

se asocia a sismos de bajas magnitudes y profundidades focales someras, por la tectónica activa local, especialmente en el escenario de la cuenca del Paraná (Berrocal & Fernandes, 1996) y algunos antrópicos del tipo explosiones de canteras.

Sismos Inter/Intraplacas

Los sismos pueden clasificarse por su distribución geográfica en relación a los bordes de placas tectónicas. Aquellos interplacas usualmente se manifiestan por rozamiento en los bordes de placas, y los intraplacas en lugares alejados de dichos bordes (Kulhánek, 1990). Los sismos autóctonos del Paraguay son todos del tipo intraplaca.

Existen varias hipótesis que intentan explicar las causas de los sismos intraplacas. La de mayor aceptación es aquella que propone el sismólogo norteamericano Sykes (1978. En França & Assumpção, 2008), cuando afirma que donde existe actividad sísmica es una zona débil, y cualquier cambio de esfuerzo local originaría un sismo. Otra hipótesis explica que la sismicidad intraplaca ocurre en regiones de concentración de esfuerzos (Talwani, 2014). Muchas veces la conjunción de estos factores (concentración de esfuerzos y zonas de debilidad) ocurren en una misma zona sísmica.

Assumpção et al. (2004) han reconocido por medio de tomografías sísmicas zonas en el entorno intraplaca, donde la concentración de epicentros aumenta en zonas donde la litósfera presenta menor espesor y los módulos de las velocidades de las ondas P son menores. Según ese modelo, el calor de la astenósfera aumenta la temperatura en la parte mantélica de la litósfera haciéndola más dúctil. Esto genera una concentración de esfuerzos en la corteza superior, más rígida, generando así zonas de propensión sísmica.

Los sismos intraplaca, Teixeira et al. (2009) consideran a estos sismos como reflejos de las tensiones compresivas y extensivas de los bordes y normalmente ocurren en profundidades rasas, hasta 30/40 km con magnitudes bajas a moderadas.

Tabla 1. Clases y Tipos de Magnitudes de los Sismos (USGS, 2018; Michigan Tech, 2018; Tarbuck & Ludgens, 2005).

Magnitud (Richter)	Tipo
Iguales o Superiores a 8.0	Megaterremoto/Gran Sismo
7.0 – 7.9	Sismo Mayor
6.0 – 6.9	Sismo Fuerte
5.0 – 5.9	Sismo Moderado
4.0 – 4.9	Sismo Ligero
3.0 – 3.9	Sismo Débil
2.1 – 2.9	Microsismo
Iguales o Menores a 2.0	Instrumentales

Sismos de acuerdo a sus Magnitudes

En la Tabla 1 podemos ver la clasificación de los sismos de acuerdo a sus magnitudes.

Sismos de acuerdo a sus Profundidades

Se clasifican en tres tipos: sismos someros o superficiales (80% de la actividad sísmica), en donde los focos de sismos se producen en el rango de profundidad entre 0 y 30 Km; los intermedios, cuyas profundidades ocurren entre 30 y 300 Km; y los profundos, siendo aquellos que igualen o superen el hipocentro de 300 km (Assumpção, 2018. Comunicación personal).

Métodos

Se recurre a catálogos de entidades de monitoreo sísmico regionales para realizar un recopilado de eventos que superen o igualen a las magnitudes locales y/o regionales (ml; mR; mb) de 2, cuyos epicentros se enmarcan en la superficie de Paraguay. Así mismo, se integrarán los datos del Laboratorio de Sismología de la FaCEN – UNA a los demás eventos y se establecerá otra tabla.

Los eventos recopilados se georreferenciarán en un mapa temático. Posterior a ello, se cotejarán los epicentros con el modelo de tomografía sísmica de las ondas P y S en Paraguay y se realizarán observaciones para arribar a conclusiones acerca de su sismicidad.

Tabla 2 (inicio). Catálogo de Sismos. **Referencias:** **mb**) Magnitud de onda de cuerpo. **ml**) Magnitud local. **mbR**) Promedio de magnitud de onda de cuerpo y regional. **mR**) Magnitud regional para Brasil (Assumpção, 1983). **Fuentes:** **COPEL** (Companhia Paranaense de Energia - Brasil), **IAG** (Instituto Astronómico y Geofísico - São Paulo, Brasil), **IPT** (Instituto de Pesquisas Brasileñas), **ISC** (International Seismological Centre), **INPRES** (Instituto de Prevención Sísmica, Argentina), **ISC** (International Seismological Centre, Inglaterra), **OSC** (Observatorio San Calixto, Bolivia), **RSBRA** (Rede Sismográfica Brasileña), **UNA** (Universidad Nacional de Asunción, Paraguay), **UnB** (Universidad Nacional de Brasília), **USGS**. Servicio Geológico de los Estados Unidos, **A83** (Assumpção, 1983). A regional Magnitude scale for Brazil, BSSA, 73). **B0** (Barros *et al.*, 2001. Paraguay seismicity during 2000. SBGF 2010, Extended Abstract, Salvador, BA).

#	Año	Fecha	Hora	Lat.	Lon.	Err. (km)	Magnitud	Pf. (km.)	Región/Zona	Departam.	Fuente
1	1969	15-abr	07:11:41	-21.83°	-61.67°	20	4.0 mb	550	Mcal. Estigarríbia	Boquerón	ISC.
2	1979	16-ene	05:38:24	-24.00°	-58.70°	50	4.0 mbR	0	Bajo Chaco	P.Hayes	IAG, UnB, A83;Bo
3	1979	20-jul	07:00:37	-24.00°	-57.50°	70	3.0 mbR	0	Bajo Chaco	P. Hayes	IAG, UnB, A83;Bo
4	1980	20-nov	22:29:07	-26.25°	-58.25°	50	3.8 mbR	0	SO Alberdi	-----	UnB, A83,Bo
5	1982	8-abr	05:58:52	-24.80°	-58.10°	30	5.2 mb	12	NO B. Aceval	P. Hayes	ISC, UnB, IAG, INPRES
Sentido en Asunción. Intensidad IV - V											
6	1984	7-mar	03:18:50	-24.44°	-58.19°	?	3.3?	0	Bajo Chaco	P. Hayes	UnB
7	1985	12-abr	14:34:54	-24.04°	-60.59°	30	5.3 mb	21	NO Gral. Bruguez	-----	ISC, SJA
Sentido en Asunción.											
8	1985	26-oct	14:55:15	-24.21°	-59.52°	20	3.3 mbR	0	Estero Patiño	P. Hayes	UnB
9	1986	11-dic	05:27:10	-25.39°	-57.56°	100	2.8 mbR	0	Itauguá	Central	UnB, Bo
10	1988	7-jun	06:33:14	-24.32°	-58.12°	100	3.0 mbR	0	Bajo Chaco	P.Hayes	UnB, IAG
11	1988	24-jun	10:01:44	-20.66°	-57.97°	?	3.9?	?	Fuerte Olimpo	A. Parag.	USGS, UnB, IAG
12	1988	15-oct	07:18:57	-22.52°	-58.82°	100	2.6 mbR	0	P.J.Caballero	Amambay	UnB, Bo
13	1988	17-oct	06:27:47	-23.10°	-60.50°	300	2.8 mbR	0	Fuerte Olimpo	A.Parag.	UnB, Bo
14	1988	17-oct	07:51:28	-21.60°	-59.12°	300	3.9 mbR	0	NO C. Peralta	A.Parag.	UnB, Bo
15	1989	28-feb	13:01:56	-23.09°	-61.44°	30	5.6 mb	547	Pilcomayo Norte	Boquerón	USGS, IAG, UnB
Sentido en Asunción											
16	1989	21-sep	02:59:19	-26.59°	-55.74°	100	2.7 mbR	0	NE Alto Verá	Itapua	UnB, Bo
17	1989	21-oct	02:58:55	-26.55°	-55.70°	30	2.8 mbR	0	Cord. S. Rafael	Itapua	UnB, IAG

Tabla 2 (continuación). Catálogo de Sismos. **Referencias:** **mb** Magnitud de onda de cuerpo. **ml** Magnitud local. **mbr** Promedio de magnitud de onda de cuerpo y regional. **mR** Magnitud regional para Brasil (Assumpção, 1983). **Fuentes:** **COPEL** (Compañía Paranaense de Energía - Brasil), **IAG** (Instituto Astronómico y Geofísico - São Paulo, Brasil), **IPT** (Instituto de Pesquisas Brasileñas), **ISC** (International Seismological Centre), **INPRES** (Instituto de Prevenção Sísmica, Argentina), **ISC** (International Seismological Centre, Inglaterra), **OSC** (Observatorio San Calixto, Bolivia), **RSBRA** (Rede Sismográfica Brasileira), **UNA** (Universidad Nacional de Asunción, Paraguay), **UnB** (Universidad Nacional de Brasilia), **USGS**. Servicio Geológico de los Estados Unidos, **A83** (Assumpção, 1983. A regional Magnitude scale for Brazil, BSSA, 73). **B0** (Barros *et al.*, 2001. Paraguay seismicity during 2000. SBGF 2010, Extended Abstract, Salvador, BA).

#	Año	Fecha	Hora	Lat.	Lon.	Err. (km)	Magnitud	Pf. (km.)	Región/Zona	Departam.	Fuente
18	1990	20-sep	20:54:27	-26.61°	-56.94°	100	2.8 mbr	0	SE. S. Miguel	Misiones	UnB, Bo
19	1990	13-nov	08:42:41	-25.48°	-57.47°	100	2.9 mbr	0	Guarambaré	Central	UnB, Bo
20	1994	9-feb	12:15:38	-22.76°	-56.71°	90	3.0 mbr	0	Yby Yajú	Concepción	IPT, UnB, COPEL, IAG
21	1994	6-abr	20:41:17	-25.51°	-56.10°	50	2.1 mbr	0	Caaguazú	Caaguazú	UnB
22	1994	19-abr	15:00:36	-25.60°	-56.05°	50	2.3 mbr	0	Repatriación	Caaguazú	UnB
23	1995	4-oct	18:43:12	-26.06°	-56.62°	100	3.4 mbr	0	Iturbe	Guairá	UnB, Bo
24	1996	27-jul	23:34:37	-23.88°	-57.02°	50	3.0 mbr	0	S. Pedro	S. Pedro	IPT, COPEL
25	1998	6-may	04:27:41	-26.24°	-57.00°	50	2.6 mb	0	Quyquyho	Paraguari	UnB
26	2000	28-abr	03:15:00	-26.83°	-56.35°	50	3.9 mbr	0	S. Pedro del Paraná	Itapua	UnB,UNA,INPRES, Bo
Sentido en San Pedro del Paraná y alrededores											
27	2000	1-dic	00:28:42	-26.93°	-56.53°	50	2.5 mbr	0	SO S.P. del Paraná	Itapua	UnB, Bo
28	2000	18-dic	01:31:40	-27.22°	-57.55°	50	2.8 mbr	0	Laureles	Ñeembucú	UnB, Bo
29	2000	21-dic	04:43:34	-26.15°	-58.12°	50	2.8 mbr	0	NO Alberdi	-----	UnB, Bo
30	2005	1-mar	16:11:31	-26.57°	-57.13°	50	3.5 ml est.	0	San Miguel	Misiones	UNA, IAG, IPT
Sentido en Villa Florida, San Miguel, Caapucú y alrededores.											
31	2005	20-ago	11:07:00	-25.90°	-56.73°	20	2.7 ml	0	SE La Colmena	Paraguari	UNA
Sentido en La Colmen, Ybycui y alrededores.											
32	2009	21-jun	23:11:00	-27.10°	-58.08°	20	2.8 ml	0	Desmochados	Ñeembucú	UNA

Sentido en Pilar.

Tabla 2 (final). Catálogo de Sismos. **Referencias:** **mb** Magnitud de onda de cuerpo. **ml** Magnitud local. **mbr** Promedio de magnitud de onda de cuerpo y regional. **mR** Magnitud regional para Brasil (Assumpção, 1983). **Fuentes:** **COPPEL** (Companhia Paranaense de Energia - Brasil), **IAG** (Instituto Astronómico y Geofísico - São Paulo, Brasil), **IPT** (Instituto de Pesquisas Brasileñas), **ISC** (International Seismological Centre), **INPRES** (Instituto de Prevención Sísmica, Argentina), **ISC** (International Seismological Centre, Inglaterra), **OSC** (Observatorio San Calixto, Bolivia), **RSBRA** (Rede Sismográfica Brasileña), **UNA** (Universidad Nacional de Asunción, Paraguay), **UnB** (Universidad Nacional de Brasília), **USGS**. Servicio Geológico de los Estados Unidos, **A83** (Assumpção, 1983. A regional Magnitude scale for Brazil, BSSA, 73). **B0** (Barros *et al.*, 2001. Paraguay seismicity during 2000. SBGF 2010, Extended Abstract, Salvador, BA).

#	Año	Fecha	Hora	Lat.	Lon.	Err. (km)	Magnitud	Pf. (km.)	Región/Zona	Departam.	Fuente
33	2009	10-nov	17:40:52	-27.27°	-56.31°	20	3.5 ml	15	Ayolas	Misiones	UNA, INPRES
Sentido en Ayolas e Ytuzaingó, Argentina.											
34	2009	29-nov	22:05:15	-26.46°	-57.66°	30	4.0 ml	32	NE Ciervo Blanco	Ñeembucú	UNA, INPRES
35	2010	10-dic	13:44:38	-20.69°	-59.37°	30	3.9 mb	0	SE Madrejón	A Paraguay	IDC, ISC
36	2011	28-feb	14:05:30	-20.66°	-61.90°	30	3.9 ml	0	NO Tte. Enciso	Boquerón	UNA, OSC
37	2013	25-oct	12:01:14	-25.97°	-57.36°	20	3.3 mbR	10	Zona Lago Ypoá	Paraguari	UNA, IAG, INPRES
Sentido en Quindy, Carapeguá, Roque González y alrededores.											
38	2015	17-jun	16:44:07	-25.98°	-56.28°	10	3.2 mbR	0	Caazapá	Caazapá	UNA, IAG
39	2015	14-dic	07:19:55	-26.04°	-57.10°	10	2.7 mbR	0	Ybycuí	Paraguari	UNA, IAG, RSBRA
Sentido en Ybycuí y Quindy.											
40	2016	25-mar	19:35:40	-26.52°	-57.84°	20	2.5 ml	21	SO Ciervo Blanco	Ñeembucú	UNA, INPRES
41	2017	27-feb	07:05:40	-26.93°	-56.79°	10	3.5 mbR	15	SE San Ignacio	Misiones	UNA, IAG, INPRES
42	2017	15-oct	06:00:42	-27.09°	-58.24°	20	2.9 mbR	15	General Díaz	Ñeembucú	UNA, IAG.
Sentido en General Díaz											
43	2018	17-jun	00:55:10	-27.19°	-58.15°	20	2.3 mbR	0	SE May. Martínez	Ñeembucú	UNA, IAG
Sentido en General Díaz											
44	2018	14-sep	13:58:30	-25.89°	-56.99°	30	2.8 mbR	0	NE Ybycuí	Paraguari	UNA, IAG
45	2018	28-sep	01:41:51	-25.92°	-56.98°	20	2.3 ml	0	NE Ybycuí	Paraguari	UNA, IAG
Sentido en Ybycuí											

Resultados y discusión

Sismicidad del Paraguay en sus principales cuencas.

Ocurrencia

La mayor cantidad de sismos, según el catálogo actualizado (Tabla 2), se distribuyen principalmente al sur de la Región Oriental, en los márgenes occidentales de la cuenca del Paraná, y en la cuenca del río Pilcomayo en el Chaco. Existen zonas en donde no se han reportado eventos notables o de relevancia hasta el presente; a tales lugares, aquí se los denomina zonas asísmicas, como ser en la cuenca del río Paraná en su margen oeste, Amambay, Canindeyú, y al norte del Chaco (Figura 2).

Magnitud

Los sismos de mayor violencia se manifiestan en el Chaco paraguayo. Estos eventos históricos (de 1982, 1985 y 1989) fueron percibidos en Asunción y se los considera como moderados. El sismo de

1982 (mb 5.2) tal vez sea el de mayor relevancia; por su efecto notable en la ciudad capital y alrededores debido a su cercanía. En la cuenca del Paraná los eventos suelen ser de los tipos ligeros, débiles o microsismos (ver Tabla 1).

Profundidad

Según los registros, los sismos profundos se localizan preferentemente en la Región Occidental (Chaco) del Paraguay. Los eventos en la cuenca del Paraná se destacan por ser someros, y las personas en algunos casos reportan los “sonidos sísmicos” (*earthquake sound*) asociados.

Es de considerar que no todos los sismos inventariados y tabulados presentan sus datos respectivos de profundidad, por lo cual este despliegue resulta de utilidad para conocer regiones epicentrales dentro de geografía del Paraguay en relación a sus profundidades. Los eventos cuyas profundidades no fueron calculadas se los considera como sismos corticales (someros).

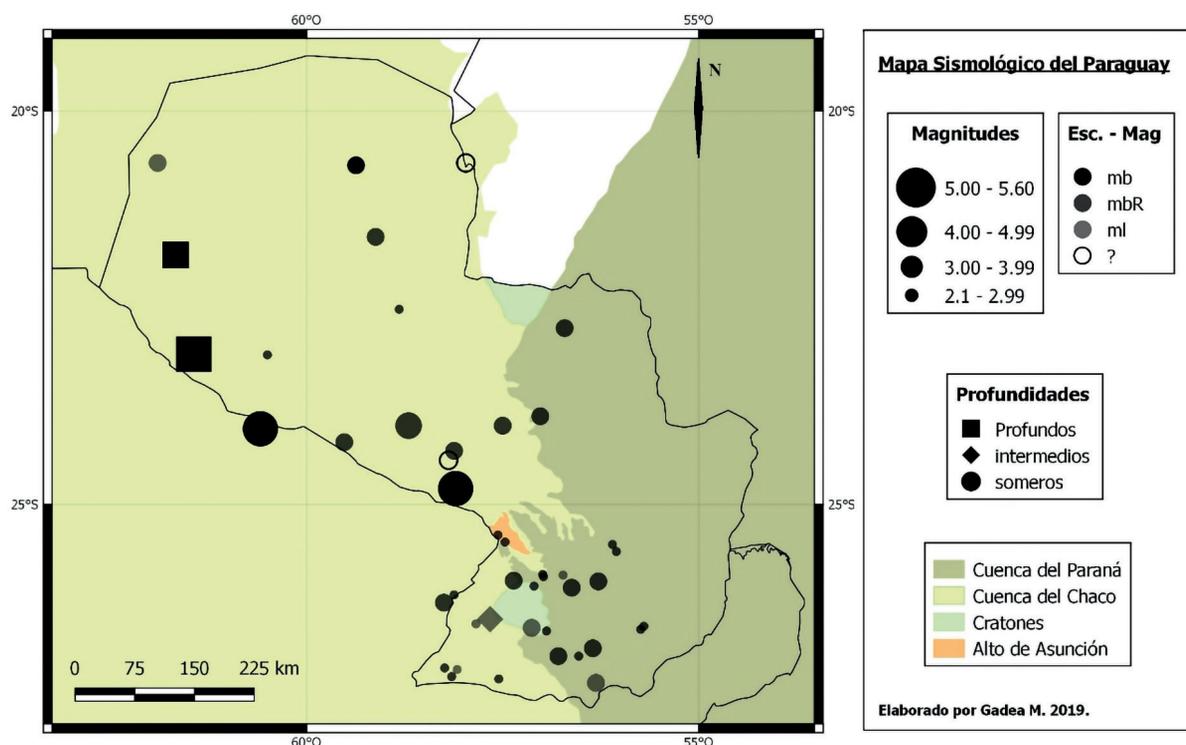


Figura 2. Sismos en Paraguay. Las figuras geométricas aumentan de tamaño con relación a las medidas de magnitud. Sus formas señalan profundidades, y las tonalidades clasifican las diferentes escalas de magnitudes.

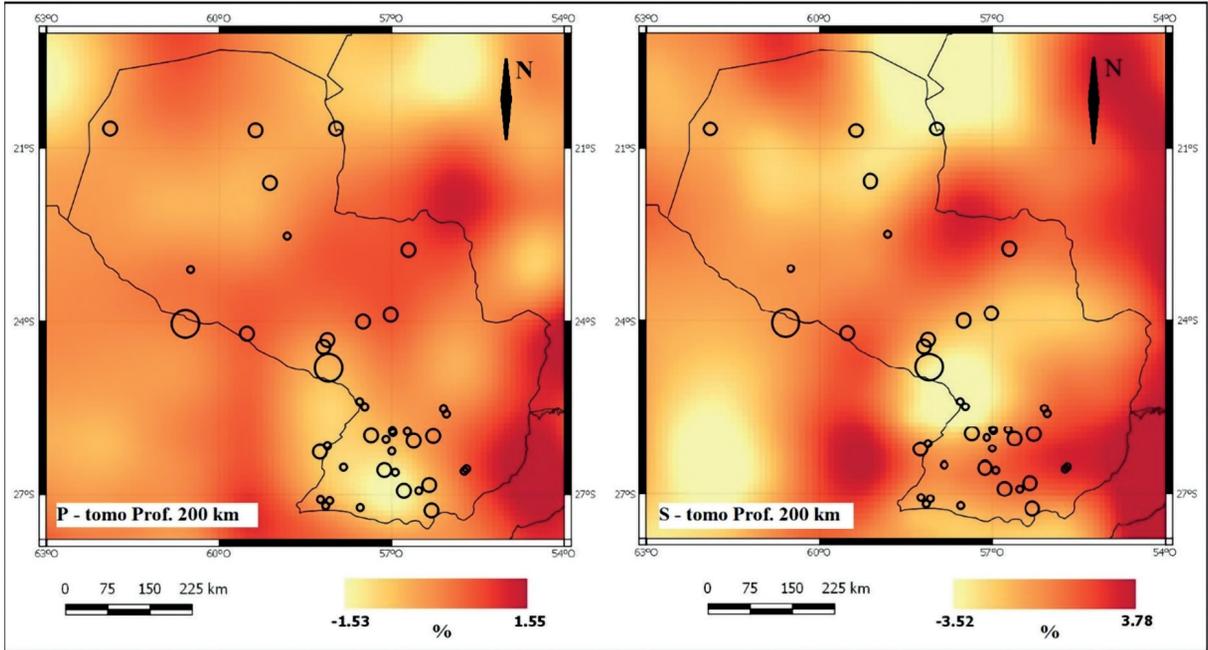


Figura 3. Epicentros del catálogo de sismos someros representados en círculos con relación a las anomalías de ondas P (Portner et al., 2018. En AGU 2018); y anomalías de ondas S (Rodríguez et al., 2018. En AGU 2018). Las velocidades de las ondas se expresan en %, con relación al modelo de velocidades del IASP91.

Sismogénesis

Se estima que los sismos profundos (en el Chaco paraguayo) se relacionan con la subducción de la Placa de Nazca por debajo de la Placa Sudamericana, por el avance del frente (*front slab*) de la placa de Nazca en desplazamiento en dirección a la astenósfera. Los eventos cuyos epicentros se sitúan en la cuenca del Paraná, debido a zonas de debilidad cortical y/o acumulación de esfuerzos ((Assumpção, 2004).

Tomografía Sísmica

Las velocidades más bajas de las ondas P y S de la tomografía sísmica indican menor espesor de la litósfera, lo cual concentra esfuerzos en la corteza superior. En el sur de Paraguay, según se ha comprobado, existe una zona con sismicidad atípica, coincidente con una litósfera más delgada (Figura 3).

Así también, en la misma región se han reconocido anomalías gravimétricas isostáticas positivas, lo cual puede señalar una contribución de esfuerzos flexurales (semejante a la parte central de Brasil)

para explicar esta zona sísmica (Assumpção et al., 2019).

Por otra parte, según el catálogo propuesto en este trabajo, se ha comprobado una zona estable, asísmica, al este de la Región Oriental del Paraguay. Cotejando la distribución de epicentros con los datos tomográficos, se propone que dicha región presenta mayor estabilidad relativa por su mayor espesor, por lo cual no han sido reportados sismos.

Conclusiones

Los sismos autóctonos en Paraguay son del tipo intraplaca, por encontrarse alejados de los bordes de las placas tectónicas.

De acuerdo a lo revisado en los registros históricos de diferentes agencias, y las señales de los eventos del laboratorio local en los últimos años, se establece determinísticamente que en Paraguay ocurren sismos con características muy propias. No es posible realizar estimaciones estadísticas debido a la inexistencia del total de los registros sísmicos, y en este estudio se comprueban tendencias.

La ocurrencia de sismos no reviste peligrosidad teniendo en consideración los antecedentes. No se han reportado víctimas fatales o perjuicios económicos importantes luego de algún evento a lo largo de la historia del Paraguay.

Atendiendo a lo anteriormente expresado, en términos de nomenclatura, en el Paraguay son frecuentes las manifestaciones sísmicas, o los sismos, y hasta el presente no se han reportado terremotos. Los eventos, considerando sus tamaños, son moderados a bajos.

Se reconoce que los epicentros de los sismos tabulados se localizan en la Región Oriental del país en su porción centro sur-occidental, en los departamentos de Paraguari, Ñeembucú, Misiones, Caazapá, Caaguazú, Guairá, Itapúa, San Pedro y Concepción. Algunos de estos sismos son precedidos o acompañados por sonidos sísmicos.

En la Región Occidental, coincidente con la cuenca del Chaco, se comprueba sismicidad en la cuenca del río Pilcomayo a lo largo de su cauce, en los departamentos de Presidente Hayes y Boquerón. El en departamento de Alto Paraguay también se verifica sismicidad, especialmente en el trecho del cauce del río Paraguay.

El reciente inventario de sismos señala mayor cantidad de ocurrencias de eventos en la cuenca del Paraná en relación a la cuenca del Chaco. Asimismo, los sismos de mayor energía y profundidad ocurren en la cuenca del Chaco. Hasta este tiempo, no se ha comprobado algún evento que supere la magnitud 5.0 y o de carácter intermedio/profundo en la cuenca del Paraná.

Según los modelos tomográficos sísmicos, esta concentración de eventos en el sur de Paraguay responde a una litósfera delgada, por lo cual con mayor debilidad y a su vez genera concentración de esfuerzos en la corteza superior.

Se verifica sismicidad en el cratón del Río Tebicuary en su contacto oriental con la cuenca del Paraná. En dicha cuenca, no existen los reportes macrosísmicos o registros digitales de eventos en dirección a su depocentro, en los departamentos de Alto Paraná, Canindeyú y Amambay, por lo cual, actualmente se considera a ésta región como

asísmica.

Es de tenerse en cuenta que en el pasado no se contaba con el instrumental apropiado para el registro de señales sísmicas, por lo cual los datos son incompletos y el mapa sismológico podría encontrarse con cierta distorsión. Los futuros registros complementarán a los datos ya conocidos, y de ese modo se comprenderá mejor el comportamiento sismológico nacional.

Bibliografía

- AGU (American Geophysical Union) (2018). *Advanced Earth and Space Science: Fall Meeting*. Washington D.C. 10-14 December 2018. [Consultado 27.viii.2019] <<https://agu.confex.com/agu/fm18/meetingapp.cgi/Home/0>>.
- Assumpção, M. (1983). A regional magnitude scale for Brazil. *Bulletin of the Seismological Society of America*, 73 (1): 237–246.
- Assumpção, M. & Suárez, G. (1988). Source mechanisms of moderate size earthquakes and stress orientation in mid-plate South America. *Geophysical Journal*, 92: 253–267.
- Assumpção, M. (1992). The Regional Intraplate Stress Field in South America. *Journal of Geophysical Research*, 97(B8): 11889–11903.
- Assumpção, M., Schimmel, M., Escalante, C., Barbosa, J., Rocha, M. & Barros, L. (2004). Intraplate Seismicity in SE Brazil: Stress Concentration in Thin Spots. *Geophysics Journal International*, 159: 390–399.
- Assumpção, M., Gadea, M., Caballero, M., Portner, D., Rodríguez, E. & Rocha, M. (2019). The Seismic Zone of Southern Paraguay with a Revised Catalog: Another Example of Intraplate Activity in a Lithospheric Thin Spot? P. 73 in Bienchi, M.B., Assumpção, M.S. & Chaves, C.A.M. (eds.). *Reports from the 3rd Brazilian Seismology Symposium*. 15-17th Abril 2019. Vinhedo - SP / Brazil. 120 pp.
- Barros, L., Marza, V., Chimpliganond, C. & Cai-xeta, D. (2001). Paraguay Seismicity During 2000. Pp. 1312 – 1315 in *Conference Pro-*

- ceedings of the 7th International Congress of the Brazilian Geophysical Society*. 2001. Salvador - BA / Brazil.
- Berrocal, J. & Fernandes, C. (1996). Seismicity in Paraguay and Neighbouring Regions, Pp. 57–66 in Comin-Chiaramonti P. & Gomes C.B. (eds.). *Alkaline Magmatism in Central Eastern Paraguay: Relationships with Coeval Magmatism in Brazil*. São Paulo: Editora da USP. 458 pp.
- Caballero, M. (2018). *Sismicidad del Paraguay*. San Lorenzo: FACEN-UNA. Trabajo de Grado. 29 pp.
- França, G. & Assumpção, M. (2008). Reflexos no Brasil de terremotos distantes. *Ciência Hoje*, 42(249): 21–25.
- Harrington, H.J. (1950). *Geología del Paraguay Oriental*. Buenos Aires: FACENA-UBA. 82 pp. + 3 lams. + 2 mapas.
- Investigación para el Desarrollo. (2017). *Evaluación de vulnerabilidad e impacto del cambio climático en el Gran Chaco Americano*. Asunción: PNUMA / REGATTA. 248 pp.
- Kulhánek, O., (1990). *Anatomy of Seismograms*. Developments in Solid Earth Geophysics 18. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 178 pp.
- Mateus, A., Riccomini, C., Ezequiel, J., Ferreira, B., Colombo, C. & Tassinari, G. (2014). Maturação permotriássica e os vários estágios de migração de hidrocarbonetos na Formação Assistência (Subgrupo Irati), Bacia do Paraná: implicações para os modelos exploratórios. *Brazilian Journal of Geology*, 44(3): 355–360.
- Rengger, J. (2010). *Viaje al Paraguay en los años 1816 a 1826*. Editado según el manuscrito del autor por A. Rengger, con un mapa y tres páginas de ilustraciones, Aarax, 1835 en la editorial de H.R. Sauerlaender. Traducido al castellano, prologado y anotado por Alfredo Tomasini y José Braunstein. Asunción: Editorial Tiempo de Historia. 358 pp.
- Talwani, P. (2014). Unified model for intraplate earthquakes. Pp. 275–302 in Talwani, P. (ed.). *Intraplate Earthquakes*. Cambridge: Cambridge University Press. 332 pp. + 16 pls.
- Tarbut, E. & Ludgens, F. (2005). *Ciencias de la Tierra*. 8ª Ed. Madrid: Editorial Prentice Hall. 686 pp.
- Teixeira, W., Fairchild, T., Motta De Toledo, C. & Taioli, F. (2009). *Decifrando a Terra*. 2ª Ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 624 pp.
- Velázquez, J.C., Gadea, M., Fugarazzo, R. & Campos Cervera, A.M. (2009). Desarrollo de la Sismología en Paraguay. In Huaco, D. (ed.). *La Sismología en Sudamérica y los Mecanismos de Prevención y Mitigación del Peligro y Riesgo Sísmico*. Lima: CERESIS. 263 pp.
- Veloso, J., Soares, J. & Velázquez, J.C. (1994). Earthquakes in Paraguay: An Appraisal. Regional Seismological Association in South America. Brasilia.

Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del chaco seco paraguayo

Bacteria associated with *Sarcocornia neei* (Lag.) With apparent hydrolytic activity and biological control from the Paraguayan dry Chaco

Yolanda Amelia López Benítez^{1,4}, Leandro Marcio Moreira² & Gilberto Antonio Benítez Rodas³

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Federal de Ouro Preto, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Ouro Preto, MG, Brasil.

³Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), San Lorenzo, Paraguay.

⁴Email: yamelopez@gmail.com.

Resumen: Las plantas halófitas muestran un nicho perfecto para aislar bacterias de interés, pues están adaptadas a ambientes extremos, estas bacterias podrían ser analizadas y explotadas por sus capacidades enzimáticas en la investigación y en diversas industrias. En este trabajo analizamos la actividad enzimática de las bacterias endofíticas y la rizosfera de *Sarcocornia neei*, una halófitas que se desarrolla en los saladares chaqueños. La actividad enzimática se determinó mediante placas de Petri, que contenían medio base, suplementado con 2 g / l (almidón, carboximetilcelulosa, pectina y caseína). Se determinó degradación enzimática por la formación de halos. Se obtuvieron un total de 83 aislamientos bacterianos, siendo Gram positivas 80 (96,3%) y Gram negativas 3 (3,6%). En los ensayos cualitativos de producción de enzimas hidrolíticas, se determinaron productores de amilasas 50,6%, celulasas 40,9%, pectinasas 36,1% y proteasas 10,8%. Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticas, de los cuales siete aislados fueron capaces de producir simultáneamente amilasas, celulasas y pectinasas.

Finalmente, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *F. solani* fueron 13,8%, mientras que el 4,6% de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento de *K. pneumoniae* y solo el 0,6% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Palabras Clave: *Sarcocornia neei*, halófitas, enzimas hidrolíticas.

Abstract: Halophyte plants show a perfect niche to isolate bacteria of interest, as they are adapted to extreme environments, these bacteria could be analyzed and exploited for their enzymatic capacities in research and in various industries. In this paper we analyze the enzymatic activity of endophyte bacteria and the rhizosphere of *Sarcocornia neei*, a halophyte that develops in the Chaco salt marshes. Enzyme activity was determined using Petri dishes, containing base medium, supplemented with 2 g / l (starch, carboxymethylcellulose, pectin and casein). Enzymatic degradation was determined by the formation of halos. A total of 83 bacterial isolates were obtained, 80 being Gram positive (96.3%) and 3 Gram negative (3.6%). In qualitative tests for the production of hydrolytic enzymes, producers of amylases 50.6%, celluloses 40.9%, pectinases 36.1% and proteases 10.8%. The bacterial isolates capable of producing hydrolytic enzymes were mainly endophyte bacteria, of which seven isolates were capable of simultaneously producing three hydrolytic enzymes amylases, celluloses and pectinases. Finally, the bacteria capable of inhibiting the growth of *F. solani* were 13.8%, while 4.6% of the isolates were capable of inhibiting the growth of *K. pneumoniae* and only 0.6% showed antimicrobial activity against *S. aureus*.

Keywords: *Sarcocornia neei*, halophytes, hydrolytic enzymes.

Introducción

Por lo general el chaco paraguayo se caracteriza en presentar una superficie plana, y pendientes suaves en algunas regiones y relieves poco ondulados en otras. El ambiente adverso y la evaporación a través

del tiempo, en gran manera, produjo formaciones de evaporitas, haciendo así que el suelo sea halófito y xerofítico, ocasionando la formación de los saladares (Gómez Duarte, 1986).

Los vegetales adaptados a este tipo de ecosistema halófito tienen mecanismos adaptativos para

Recibido: 25/03/2021 Aceptado: 26/04/2021



resistir los factores abióticos. Este es el caso de *Sarcocornia neei* (Lag.) M.Á. Alonso & M.B. Crespo (basionimo: *Salicornia neei* Lag.) un vegetal halófito, ampliamente distribuido, puede soportar altas concentraciones de sal acumulándola, además, es empleada en la gastronomía y se ha reportado cualidades farmacéuticas (Patel, 2016).

A las plantas se asocian bacterias que pueden ser endofíticas y rizobacterias (bacterias del interior del tejido vegetal y bacterias del suelo circundante a las raíces de las plantas) estos microorganismos pueden establecer asociaciones simbióticas con las plantas, son benéficas ya que estimulan el crecimiento vegetal, produciendo una variedad de sustancias, como las enzimas hidrolíticas en defensa contra patógenos protegiendo a la planta y adaptándola al ambiente (Ryan *et al.*, 2008).

Estas enzimas hidrolíticas que producen las bacterias son de gran importancia comercial con aplicaciones biotecnológicas en las industria alimenticia, agroindustrial y farmacéutica (Olanrewaju *et al.*, 2017; Amoozegar *et al.*, 2019; Corral *et al.*, 2019).

Las bacterias son fuentes ideales para producir enzimas hidrolíticas, debido a su fácil producción, por requerir poco espacio para el cultivo, creci-

miento rápido, escalable en la industria y flexibilidad muchas veces para la manipulación genética (Sivakumar *et al.*, 2009). Algunas de las enzimas hidrolíticas producidas por las bacterias son celulasa, pectinasa, proteasa, amilasa entre otras. Las celulasas, proteasas y amilasas se utilizan para la preparación de detergente para acelerar el proceso limpieza.

Las celulasas microbianas se producen comercialmente, pues estas se complementan con los detergentes para la eliminación de la suciedad sin dañar y aumentar la suavidad de los tejidos. Las bacterias, especialmente las del genero *Bacillus*, secretan enzimas extracelulares como amilasas, proteasas y lipasas con potenciales valores comerciales (Mukesh *et al.*, 2012).

Las proteasas de los microbios son enzimas industriales importantes y representan aproximadamente el 40–60% de las ventas totales de enzimas en todo el mundo (Vijay *et al.*, 2011; Ramkumar *et al.*, 2018).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas mediante la adición de agua a través de los enlaces peptídicos, y se encuentran ampliamente en plantas,

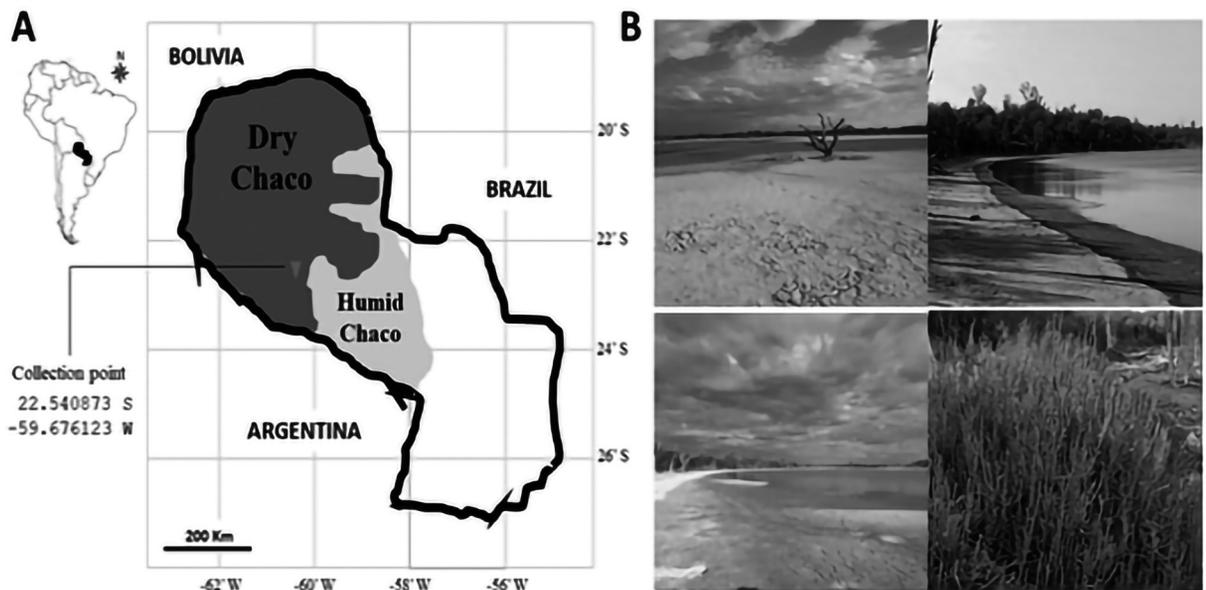


Figura 1. Localidad de muestreo. **A)** Ubicación geográfica del sitio de muestreo. **B)** Saladares del Chaco Seco Laguna Capitán (imágenes propias).

animales y microorganismos (Niyonzima & More, 2015). Debido a sus amplias aplicaciones, muchas proteasas de microorganismos se han estudiado en las últimas décadas, la mayoría de ellas se encuentran en cepas de *Bacillus* y *Pseudomonas* (Rahman *et al.*, 2010).

Otra enzima de importancia industrial con varias aplicaciones biotecnológica es la pectinasa, se emplea en la industria de producción de biocombustibles, papel de pulpa, alimentos para animales, textiles, fibra (Rebello *et al.*, 2017).

Los microorganismos han proporcionado una variedad de metabolitos secundarios con interesantes actividades biológicas notables que actúan como biorreguladores, moléculas de señalización / detección de quórum, fármacos antimicrobianos entre otros beneficios industrial, debido a todas estas cualidades este trabajo tuvo como objetivo analizar el potencial biotecnológico que pudieran tener las bacterias de la rizosfera y raíces de *Sarcocornia neei* aisladas de los saladares chaqueños.

Métodos

Zona de muestreo, aislamiento bacteriano y condiciones de cultivo

El muestreo se realizó en el Departamento de Boquerón Chaco, en las cercanías de la Laguna Capitán, en las coordenadas -22.540873 S, -59.676123 W. Se escogió este sitio de muestreo por la ubicación de las lagunas saladas y por ser un ambiente halófito y xerófito (Figura 1). Para el aislamiento de bacterias de la rizosfera, las muestras de raíces y suelo circundante fueron colectadas por conveniencia durante períodos comprendido entre abril y agosto de 2019.

Para cumplir con la cantidad de muestra representativa se decidió colectar de manera aleatoria 10 plantas de *Sarcocornia neei*, según el recorrido de cuadrícula a 17 metros de las orillas de la laguna salada (Atlas *et al.*, 1998).

Muestras provenientes de la Rizosfera

Se utilizó 0,1 g de suelo provenientes de la rizosfera, se agregó agua estéril, se procedió a

mezclar de forma enérgica y constante por unos segundos, siendo el procedimiento con modificaciones propuestas por Felestrino *et al.* (2013), luego se tomó 100 µl de esta solución y se introdujo en medio líquido Luria-Bertani (LB), se incubó por 24 horas. Posterior a la incubación con el método de dilución 10^{-1} a 10^{-4} , se tomó 100 µl de la dilución 10^{-4} y se plaqueó en cajas de Petri 90x15 mm con medio Luria-Bertani Agar (LBA). A continuación, se incubaron a 28 °C por 10 días. Las colonias que se desarrollaron con diferentes formas y tamaños fueron transferidas en nuevas placas de Petri con medio LBA, para su posterior aislamiento. Posteriormente a cada aislado se le realizó la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron conservados en glicerol al 15% y almacenados a -20 °C.

Muestras de Raíces Provenientes de *S. neei*

Se tomaron cinco fragmentos de las raíces de plantas *S. neei*, de aproximadamente 1,0 - 0,5 cm. Las muestras de raíces fueron desinfectadas mediante una secuencia de soluciones: 9 g/L NaCl – 2 min, 70% de alcohol – 2 min, 2,5%, ácido clorhídrico (HCl) - 2 min y tres lavados de agua destilada, se tomó una raíz para control de esterilidad en medio líquido.

Las raíces fueron maceradas en un mortero, para depositar en un medio líquido LB, se incubó a 28 °C durante 24 horas (Felestrino, 2013).

A continuación, una alícuota de 100 µl, se inoculó en medio selectivo LBA que contenía clotrimazol, para evitar la formación de hongos. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante un período de hasta 10 días, las bacterias que fueron desarrollándose durante los días de crecimiento fueron aislados en nuevas placas con LBA selectivo. Las bacterias aisladas fueron teñidas según el procedimiento para la tinción de Gram. Todos los aislamientos fueron catalogados, conservados en glicerol al 15% y almacenados en -20 °C (Figura 2).

Producción de Enzimas hidrolíticas

La actividad enzimática se determinó en placas de Petri 90x15 mm, que contenían medio base con

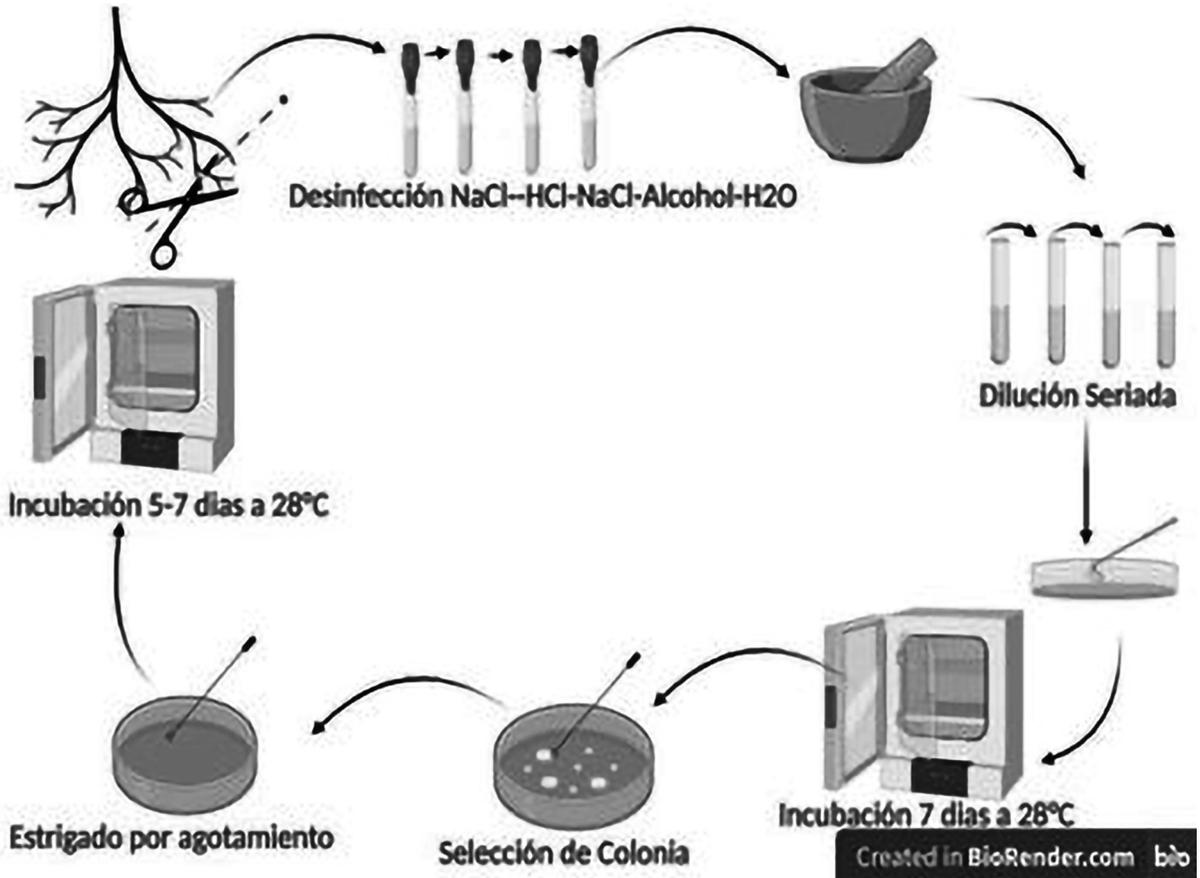


Figura 2. Resumen representativo de la metodología empleada en el aislamiento bacteriano de las raíces de *Sarcocornia neei*.

(K_2HPO_4 2 g/l, $KHPO_4$ 2g/l, agar 15 g/l, extracto de levadura 1 g/l) suplementado con 2 g / l (carboximetilcelulosa, almidón, pectina y caseína) con el pH ajustado a 6,0. Para la visualización de la degradación enzimática se empleó el rojo congo y lugol para la determinación de la producción de amilasas, celulasas, pectinasas y proteasas, por triplicado para cada uno de los ensayos (Feoli *et al.*, 1997).

Antagonismo microbiano

Para el ensayo de inhibición del crecimiento de patógenos, se realizaron pruebas con los siguientes microorganismos *Fusarium solani* (Cepa no referenciada, identificada y aislada), *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (ATCC 43300) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), utilizando el método de arrastre, en placas de Petri con medio

YPD agar (Yeast extract peptone dextrose), donde el patógeno se agregó en el centro de la placa y por el método de arrastre a las bacterias en estudio, luego se incubó a 28°C, y 37°C para *Klebsiella pneumoniae*, luego del 6to día hasta el 12mo día se observó el crecimiento de ambos organismos, las bacterias de interés frente a los patógenos (Tabla 1).

Tabla 1. Microorganismos de referencia utilizados para el ensayo de antagonismo, que provocan daños a su hospedador.

Organismo	Hospedador
<i>Fusarium Solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Homo sapiens</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Homo sapiens</i>

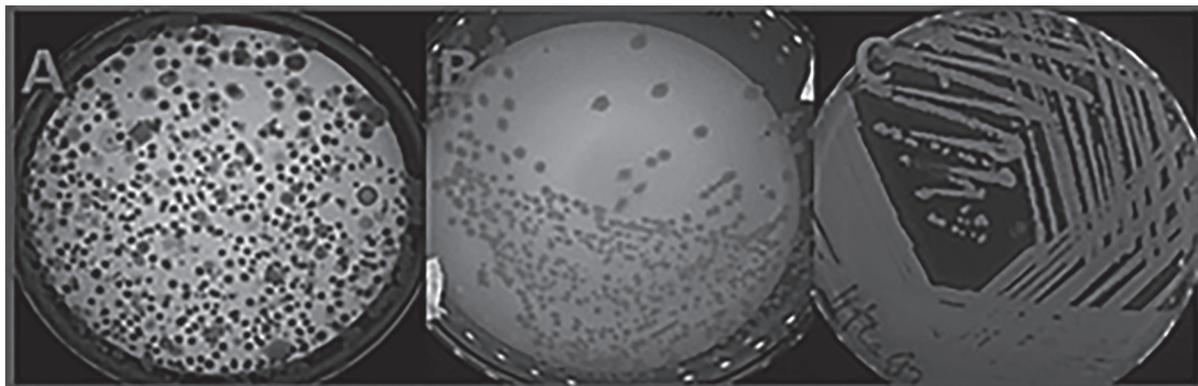


Figura 3. Aislamiento bacteriano. **A)** Aislamiento bacteriano por extensión en p. **B)** Aislamiento bacteriano por agotamiento. **C)** Colonias puras por estriado para obtención de biomasa.

Resultados y discusión

Tinción de Gram y morfología bacteriana

A partir de las raíces de *S. neei* y el suelo circundante a las raíces, se obtuvo un total de 83 aislados bacterianos, fueron aislados en medio LBA por agotamiento de asa, hasta obtener cultivos puros a partir de colonias basados en la variedad de formas y tamaño (Figura 3).

La morfología celular se observó al microscopio óptico, mediante tinción de Gram, las bacterias aisladas de las raíces como de la rizosfera se dividieron en Gram positivas con un total de 80 (96,3%) y Gram negativas solo 3 (3,6%) aislados, de las cuales 50 (60,2%) corresponde al suelo circundante (rizosfera) de las raíces de las plantas y 33 (39,7%) de las raíces (endófitas) de *S. neei*, mientras que el trabajo publicado por Szymańska *et al.* (2016), encontraron un 77,3%-87,5% de los aislados eran Gram positivos, de igual manera reportaron que el 50% de los aislados bacterianos cultivables pertenecían a las rizobacterias y el otro 50% a los endófitos proveniente de *Sarcocornia sp.*

Passari *et al.* (2017) reportaron que el número máximo de aislados bacterianos endófitos de una planta con propiedades medicinales fue de 46,7%. En el trabajo de Huang *et al.* (2019) encontraron mayor número de aislados en la rizosfera, con un 63,3%, mientras que el 36,3% provenían del interior de las raíces de *Platycodon grandiflorum*.

Rodríguez *et al.* (2020) reportaron que *Pseudomonas segetis* proveniente de *Salicornia europea*,

producen compuestos que aumentan la capacidad para defenderse contra patógenos y capaces de producir enzimas hidrolíticas: Celulasas, pectinasas, amilasas y proteasas (Figura 4).

Una de las enzimas hidrolíticas que producen las bacterias son las celulasas, las celulasas representan el grupo más destacado a nivel mundial en cuanto a enzimas, ya que tienen varias aplicaciones industriales (Kuhad *et al.*, 2011).

En los aislados obtenidos en este trabajo (Figura 5) fueron capaces de formar halos que evidencia producción de celulasas 34 (40,9%), de las cuales el 82,3% son bacterias endófitas, el 17,6% de los aislados provienen de la rizosfera (Figura 5B).

Szymańska *et al.* (2016) reportaron que el 50% fueron endófitos y el 36,8% fueron rizobacterias provenientes de *Salicornia sp.*, en el estudio de Pereira & Castro (2014), encontraron que el 62,5%

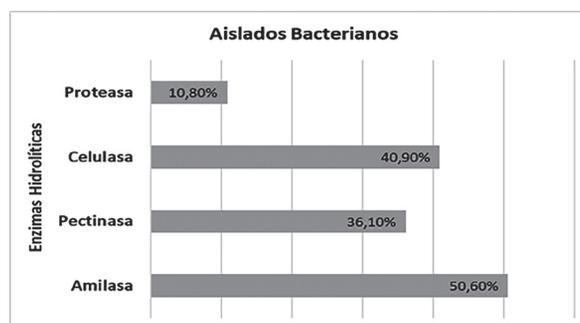


Figura 4. Representación porcentual de los aislados bacterianos que demuestran la capacidad de producción de enzimas hidrolíticas.

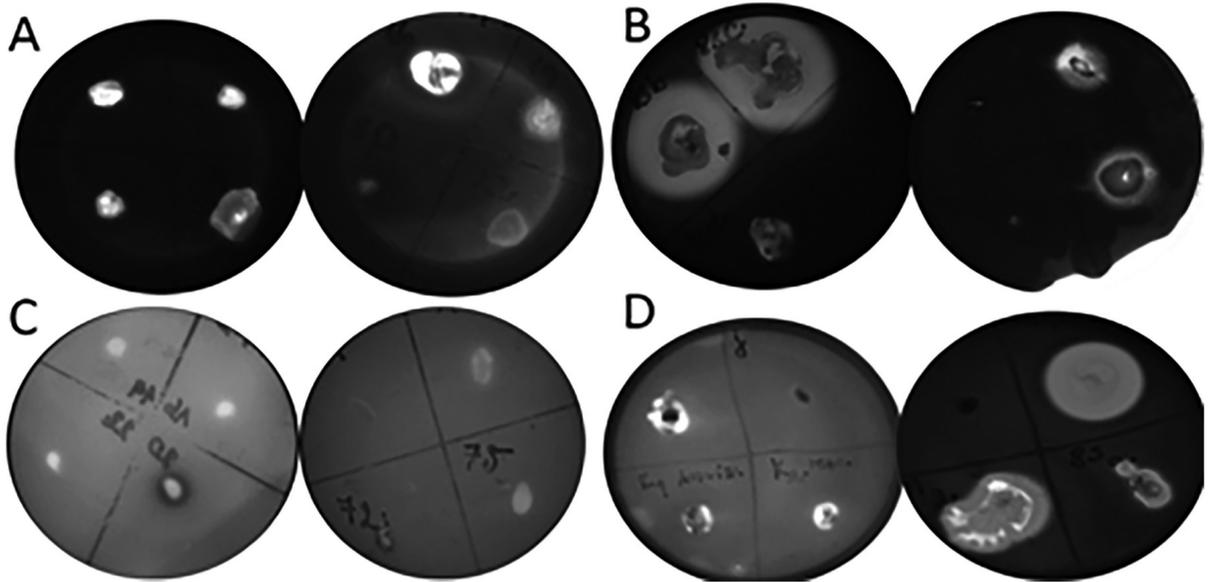


Figura 5. Aislamiento bacteriano: **A)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de amilasa. **B)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de celulasa. **C)** Aislados con capacidad de producción de pectinasa. **D)** Aislamiento bacteriano con capacidad de producción de proteasas.

de los aislados presentaron actividad endocelulítica.

Liu *et al.* (2019), demostraron que un grupo diverso de bacterias coloniza el tejido interior de la planta *L. ruhenicum* una halófito medicinal, donde el 32,1% de endófitos presentaron capacidad celulolíticas.

Mientras que en el estudio de Mukhtar *et al.* (2019), obtuvieron más del 40% de sus aislados con capacidad hidrolítica, provenientes de la rizosfera de un vegetal halófito.

Los resultados obtenidos en este trabajo, en relación con la producción de celulasas en condiciones de ensayo cualitativo, se obtuvo aislados bacterianos con producción de celulasas, esto es corroborado por Menéndez *et al.* (2016), donde han identificado genes relacionados con la actividad celulósica en cepas pertenecientes al género *Rhizobium*, así como en numerosas actinobacterias de los géneros *Actinosynnema*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*, entre otros (Koeck *et al.*, 2014).

Otra enzima producida por las bacterias son las pectinasas, estas son empleadas para producción de jaleas, zumo de frutas, jugos de frutas y vino, pues mejora la extracción, la filtración y la clarificación del zumo de frutas, mejorando las cualidades del

producto final, (Kashyap *et al.*, 2001).

También las industrias de biocombustibles demandan esta enzima junto con las xilanasas, pues mejorar la sacarificación de la biomasa vegetal, durante la producción de biocombustible (Thite & Nerurkar, 2019).

En este ensayo cualitativo los aislados bacterianos que presentaron un halo visible de hidrólisis, fueron un total de 30 (36,1%), dato similar al trabajo de Hasan *et al.* (2020), encontraron que el 37,2% de los aislados bacterianos proveniente de *Corchorus olitorius*, con capacidad de producir pectinasa y xilanasas de manera conjunta. En cuanto al origen de los aislados según relación con *S. neei* se obtuvieron endofíticas 76,6%, las bacterias aisladas provenientes de la rizosfera 23,3% (Figura 5C).

En la literatura varias bacterias producen simultáneamente xilanasas y pectinasas como *Bacillus* sp. y *Streptomyces* sp., que son empleadas para la producción industrial (Kashyap *et al.*, 2001).

La aplicación de enzimas pectinolíticas crudas en diversos procesos industriales hace que estas enzimas sean comercialmente valiosas y un proceso de producción sea rentable, las cepas de *Bacillus safensis* y *Bacillus altitudinis* se estudiaron para la

producción de pectinasas (Thite *et al.*, 2020).

Para determinar la actividad proteolítica se empleó la técnica cualitativa de difusión en placas de agar y caseína, los aislados que producen proteasas presentan un halo visible de hidrólisis. Del total de los aislados fueron capaces de formar halos 9 (10,8%) aislados (Figura 5D).

El 77,7% de las bacterias con actividad de hidrólisis fueron endofíticas y el 22,2% fueron bacterias provenientes de la rizosfera, en el trabajo de Mukhtar *et al.* (2019), encontraron que el 47% de las bacterias aisladas presentaron actividad proteolítica y amilolítica de la rizosfera de *Atriplex amnicola* una planta halófila.

Encontramos que el 50,6% de los aislados bacterianos presentaron actividad amilolítica (Figura 5A), cifras similares a la encontrada en este estudio fueron reportados también por Carrim *et al.* (2006), donde el 60% de los aislados producían amilasa, también en el trabajo de Caneschi *et al.* (2018), encontraron que el 55% de las bacterias producían amilasas, aisladas de diferentes plantas.

En este estudio 7 aislados fueron capaces de producir las tres enzimas hidrolíticas estudiadas, mientras que Ben *et al.* (2019), lograron aislar 12 bacterias endofíticas capaces de producir siete enzimas probadas (proteasa, gelatinasa, quitinasa, celulosa, amilasa, pectinasa y glucanasa) [Tabla 2].

Existen aún pocos trabajos en la literatura sobre

bacterias productoras de enzimas en nuestro país, provenientes de plantas xerofíticas y halófitos, este es nuestro aporte a la información, que puede ser punta pie para futuras investigaciones enfocadas a la producción de enzimas y escalabilidad en la industria. La mayoría de los reportes de estas enzimas son observados en aislados bacterianos como fúngicos, (Oumer, 2017).

En estudios anteriores, sugieren que las bacterias halófitas producen enzimas con aplicaciones industriales y de investigación, debido a su naturaleza termoestable y tolerante a la sal, características óptimas para aplicaciones como producción de biocombustible, aditivos, detergentes (Corral *et al.*, 2019; Amoozgar *et al.*, 2019).

Las bacterias que crecen en simbiosis a *S. neei* podría ser explotadas por sus capacidades enzimáticas en la industria textil, biocombustible, biofertilizantes y agentes de biocontrol frente a una amplia variedad de tensiones abióticas y bióticas.

Antagonismo microbiano

A lo largo de los años se han ido encontrando bacterias que producen metabolitos secundarios, antibióticos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos, entre las bacterias más estudiadas se encuentran *Bacillus*, *Streptomyces* ssp, *Pseudomonas* spp., (Rojas Badía *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2019). El sistema inmune de los vegetales tiene un

Tabla 2. Capacidad de producción de los aislados, con producción (+) y sin producción (-).

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS			ACTIVIDAD HIDROLÍTICA			
Aislados	Morfología	Gram	Amilasa	Pectinasa	Celulítica	Proteasa
5R	Bacilo	+	+	-	+	-
18E	Bacilo	+	+	+	+	-
58E	Bacilo	+	+	+	+	-
64E	Bacilo	+	+	+	+	-
70E	Bacilo	+	+	+	+	-
75E	Bacilo	+	+	+	+	-
80E	Bacilo	+	+	+	+	-
83E	Bacilo	+	+	+	+	-



Figura 6. Inhibición del crecimiento de patógeno a 37°C de incubación. **A)** Inhibición en el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* de las bacterias aislada. **B)** Observación de halos en la inhibición en el crecimiento contra *Fusarium solani*. **C)** Inhibición del crecimiento en *S. aureus*.

sistema complejo de producción de metabolitos que proporciona una defensa aumentando la capacidad para expresar una resistencia, lo que permite una respuesta más rápida y fuerte frente a los patógenos. Las rizobacterias y endofíticas promotoras del crecimiento vegetal inducen la resistencia sistémica frente a los patógenos del suelo (D'Alessandro *et al.*, 2014; Lioussanne, 2010).

Los aislados que formaron un halo inhibitorio frente a *Fusarium solani* fueron unas 9 (13.8%). Mientras que frente a *Klebsiella pneumoniae* 3(4.61%) de los aislados fueron capaces inhibir el crecimiento del patógeno (Figura 6).

En el trabajo realizado por Sharma *et al.*, (2019) identificaron una rizobacteria halotolerante que tiene efecto de estimulación de crecimiento en el maní, en los ensayos *in vitro* demostraron la activación de genes involucrados en la producción de etileno y la señalización de defensa contra *Aspergillus flavus*, esto demuestra que podría existir bacterias que resisten concentraciones elevadas de NaCl que están asociadas con plantas capaces de inhibir patógenos, es por esta razón se escogió trabajar con una planta halotolerante como *S. neei*.

En trabajos similares realizados por Cao *et al.*, (2018), caracterizaron dos aislados de *Bacillus velezensis* asociados a la rizosfera que producen tres compuestos de lipopéptidos responsables de la actividad antimicrobiana frente a *Fusarium*

oxysporum y *Ralstonia solanacearum*, diversos autores reportan actividad antimicrobiana frente a *Fusarium solani* por parte de bacterias aisladas como por ejemplo *Streptomyces sp.* (Ezra *et al.*, 2004; El-Gendy & El-Bondkly, 2010).

En otro estudio realizado por Passari *et al.*, (2017), el 47% de los aislados de una planta medicinal mostraron actividad antimicrobiana contra diversos patógenos como *E. coli*, *C. albicans*, solo el 0.59% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, muy diferente al este ensayo realizado donde se obtuvo 7.8% (Figura 7), de los aislados demostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* con características meticilino resistente, lo cual demuestra que estos aislados podrían tener una gran perspectiva en las industrias agrícola y farmacéutica.

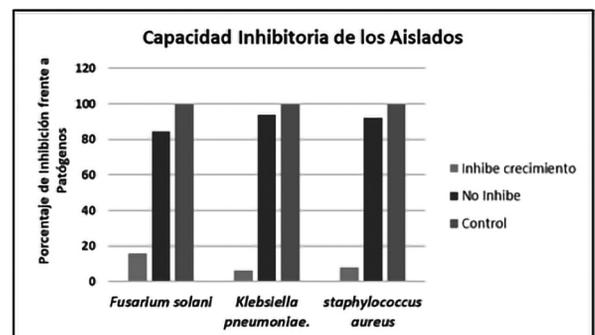


Figura 7. Representación porcentual de inhibición del crecimiento de los aislados frente a patógenos.

Conclusión

En el análisis de la actividad enzimática, se obtuvieron un total de 83 aislados, siendo Gram positivas mayoritariamente, las cuales provienen del suelo circundante (rizosfera) 60,2% y de las raíces de las plantas 39,7% (endófitas) de *S. neei*.

Los aislados capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron para celulasas 40,9%, amilasas 50,6%, pectinasas 36,1% y proteasas 10,8% aislados.

Los aislados bacterianos capaces de producir enzimas hidrolíticas fueron mayoritariamente bacterias endofíticas, de los cuales siete aislados fueron capaces de producir tres enzimas hidrolíticas de las cuatro enzimas estudiadas.

Por último, las bacterias capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* fueron 13,8%, el 4,6% de los aislados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* y solo el 0,6% mostró actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Finalmente creemos que este tipo de trabajos puede contribuir a la investigación, en la búsqueda de nuevas fuentes de enzimas, sustancias o metabolitos con potencial biotecnológico y valor económico.

Agradecimientos

Prociencia- CONACYT, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales- Universidad Nacional de Asunción.

Literatura citada

- Amoozegar, M.A., Safarpour, A., Noghabi, K.A., Bakhtiary, T. & Ventosa, A. (2019). Halophiles and Their Vast Potential in Biofuel Production. *Frontiers in microbiology*, 10(1895): 1–17.
- Atlas, R., Bartha, R. & Atlas, D. (1998). *Microbial Ecology-Fundamentals and Applications*. 4th edition. Redwood City, USA: Benjamin-Cummings. 694 pp.
- Caneschi, W.L., Felestrino, E.B., Fonseca, N.P., Villa, M.M., Lemes, C.G.C., Cordeiro, I.F., Assis, R.A.B., Sanchez, A.B., Vieira, I.T., Kamino, L.H.Y., Carmo, F.F., Garcia, C.C.M. & Moreira, L.M. (2018). Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 9(1638): 1–17.
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D. & Ca, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(4360): 1–14.
- Carrim, A.J.I., E.C. Barbosa & J.D.G. Vieira. (2006). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3): 353–359.
- Corral, P., Amoozegar, M.A., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their biomolecules: recent advances and future applications in biomedicine. *Marine drugs*. 18(33): 1–33.
- D'Alessandro, M., Erb, M., Ton, J., Brandenburg, A., Karlen, D., Zopfi, J. & Turlings, T.C. (2014). Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant, Cell & Environment*, 37(4): 813–826.
- El-Gendy, M.M.A. & El-Bondkly, A.M.A. (2010). Production and genetic improvement of a novel antimycotic agent, saadamy-cin, against dermatophytes and other clinical fungi from endophytic *Streptomyces* sp. Hedaya48. *Natural Products, an Indian Journal*, 16(1): 61–73.
- Ezra, D., Castillo, U.F., Strobel, G.A., Hess, W.M., Porter, H., Jensen, J.B., Condrón, M.A.M., Teplow, D.B., Sears, J., Maranta, M., Hunter, M., Weber, B. & Yaver, D. (2004). Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology*, 150(4): 785–793.
- Felestrino, E.B. (2013). *Isolamento e caracterização bioquímica e molecular de microrganismo associados à interação Langsdorffia hypogaea-hospedeira-rizósfera*. Dissertação de Mestrado. Ouro Preto, Brasil: Universi-

- dade Federal de Ouro Preto. 88 pp.
- Feoli, M., Gómez, Z. & Muñoz, A. (1997). Aislamiento y caracterización de microorganismos con actividad pectinolítica a partir de *Mangifera indica*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, (26): 33-37.
- Gómez Duarte, D.R. (1986). *Contribución al conocimiento geológico del Chaco Paraguayo*. Asunción, Paraguay: Impresión privada. 31 pp.
- Hasan, R., Aktar, N., Kabir, T., Honi, U., Halim, A., Islam, R., Sarker, M.D.H., Haque, S., Alam, M. & Islam, S. (2020). Pectinolytic Bacterial Consortia Reduce Jute Retting Period and Improve Fibre Quality. *Scientific Reports*, 10(5174): 1–9.
- Huang, C.M., Chen, W.C., Lin, S.H., Wang, Y.N. & Shen, F.T. (2019). Exploración de bacterias asociadas a raíces de la planta medicinal *Platycodon grandiflorum*. *Microbes and Environments*, 34(4): 413–420.
- Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3): 215–227.
- Koeck, D.E., Pechtl, A., Zverlov, V.V. & Schwarz, W.H. (2014). Genomics of cellulolytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 29:171–183.
- Kuhad, R.C., Gupta, R. & Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011(280696): 1–10.
- Lioussanne, L. (2010). Review. The role of the arbuscular mycorrhiza associated rhizobacteria in the biocontrol of soilborne phytopathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(S1): S51–S61.
- Liu, Y.H., Wei, Y.Y., Mohamad, O.A.A., Salam, N., Zhang, Y.G., Guo, J.W., Li, L., Egamberdieva, D. & Li, W.J. (2019). Diversity, community distribution and growth promotion activities of endophytes associated with halophyte *Lycium ruthenicum* Murr. *Biotech*, 9(144): 1–12.
- Menéndez, E., Díez-Méndez, A., Marcos-García, M., Celador-Lera, L., Flores-Félix, J.D., Rivera, L., Robledo, M., Velázquez, E., Martínez-Molina, E., Rivas, R. & Mateos, P.F. (2016). *Rhizobium* Symbiotic Enzyme Cellulase CelC2: Properties and Applications. Pp. 81–89 in Gupta, V.K. (Ed.). *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier. xiii + 286 pp.
- Mukesh Kumar, D.J., Poovai, P.D., Kumar, P.C.L., Saroja, Y.S., Manimaran, A. & Kalaichelvan, P.T. (2012). Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its biostoning activity. *Der Pharmacia Lettre*, 4(3): 881-888.
- Mukhtar, S., Mehnaz, S., Mirza, M.S., & Malik, K.A. (2019). Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 85–97.
- Niyonzima, F.N. & More, S.S. (2015). Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. *3 Biotech*, 5: 61–70.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R., & Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal Of Microbiology and Biotechnology*, 33(197): 1–16.
- Oumer, O.J. (2017). Pectinase: Substrate, production and their biotechnological applications. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(3): 1007–1014.
- Passari, A.K., Mishra, V.K., Singh, G., Singh, P., Kumar, B., Gupta, V.K., Sarma, R.K., Saikia, R., Donovan, A.O. & Singh, B.P. (2017). Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary

- metabolites production. *Scientific Reports*, 7(11809): 1–17.
- Patel, S. (2016). *Salicornia*: evaluating the halophytic extremophile as a food and a pharmaceutical candidate. *3 Biotech*, 6(104): 1–10.
- Pereira, S.I.A. & Castro, P.M.L. (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environmental Science and Pollution Research International*, 21(24): 14110–14123.
- Rahman, R.N.Z.A.R, Geok, L.P., Wong, C.F., Basri, M. & Salleh, A.B. (2010). Molecular investigation of a gene encoding organic solvent-tolerant alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Journal of Basic Microbiology*, 50(2): 143–149.
- Ramkumar, A., Sivakumar, N., Gujarathi, A. M., & Victor, R. (2018). Production of thermotolerant, detergent stable alkaline protease using the gut waste of *Sardinella longiceps* as a substrate: Optimization and characterization. *Scientific reports*, 8(12442): 1–15.
- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E.M., Sindhu, R., Binod, P. & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(5): 381–394.
- Rodríguez, M., Torres, M., Blanco, L., Béjar, V., Sampedro, I. & Llamas, I. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific reports*, 10(4121): 1–12.
- Rojas Badía, M.M., Sánchez Castro, D., Rosales Perdomo, K. & Lugo Moya, D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2)5: 1–9.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 1–9.
- Sharma, S., Chen, C., Navathe, S., Chand, R. & Pandey, S.P. (2019). A halotolerant growth promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. *Scientific reports*, 9(4054): 1–17.
- Sivakumar, N., Remya, R. & Al Bahry, S. (2009). Partial characterization of proteases produced by three fungal isolates from the rhizosphere of wild yam *Dioscorea wallichii*. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(3): 71–75.
- Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., & Hryniewicz, K. (2016). Endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Salicornia europaea* L. - community structure and metabolic potential. *Microbiological research*, 192: 37–51.
- Thite, V. S. & Nerurkar, A. S. (2019). Crude Xylanases and Pectinases from *Bacillus* spp. Along with Commercial Cellulase Formulate an Efficient Tailor-Made Cocktail for Sugar-cane Bagasse Saccharification. *BioEnergy Research*, 13: 286–300.
- Thite, V.S., Nerurkar, A.S. & Baxi, N.N. (2020). Optimization of concurrent production of xylanolytic and pectinolytic enzymes by *Bacillus safensis* M35 and *Bacillus altitudinis* J208 using agro-industrial biomass through Response Surface Methodology. *Scientific reports*, 10(3824): 1–12.
- Vijay, K. E., Srijana, M., Kiran, K. K., Harikrishna, N., Reddy, G. (2011). A novel serine alkaline protease from *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application as a dehairing agent. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(4): 403–409.

Evaluación del uso de *Landoltia punctata* a escala mesocosmos en el tratamiento complementario de aguas residuales proveniente de sistema RBC a escala laboratorio

Evaluation of the use of *Landoltia punctata* on a mesocosm scale in the complementary treatment of wastewater from a laboratory-scale RBC system

Shaun Patrick McGahan^{1,5}, Tomás López¹, Pablo Heleno Sezerino², Francisco Ferreira³, Leonida Medina³ & Rodrigo Mohedano⁴

¹Universidad Nacional de Asunción, Departamento de Biotecnología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Federal de Santa Catarina, Grupo de Estudios en Saneamiento Descentralizado (GESAD). Florianópolis, SC, Brasil.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química. San Lorenzo, Paraguay.

⁴Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Florianópolis, SC, Brazil

⁵Email: smcgahan@facen.una.py.

Resumen: La descarga de contaminantes de origen antropogénico con presencia de nutrientes como Nitrógeno (N) y fósforo (P), pueden desencadenar la eutrofización de cuerpos de agua, debido a que el exceso de nutrientes causa un desequilibrio en ecosistemas acuáticos. La implementación de sistemas de tratamiento basados en procesos biológicos surge como una alternativa económicamente rentable, con la posibilidad de generar subproductos de valor agregado en el proceso. En el presente trabajo se evaluó la aplicabilidad del uso de la lenteja de agua en el tratamiento complementario de efluentes provenientes de sistemas Reactores Biológicos Rotativos de Contacto (RBC) con el objetivo de reducir la concentración de nutrientes y generar biomasa enriquecida. Se trabajó con agua residual sintética tratada inicialmente en un sistema RBC a escala laboratorio, el efluente de posteriormente se utilizó para el crecimiento durante 96 horas de la especie *Landoltia punctata*, a escala mesocosmos. Los resultados indican que se obtuvieron porcentajes de remoción superiores a 50% y 70% para el N-NH₃ y PO₄ respectivamente. En cuanto a la valorización de la biomasa generada poscosecha de *L. punctata*, el porcentaje de proteínas totales en promedio fue de 29,2% y para lípidos totales se obtuvo en promedio 9,8%. Los resultados obtenidos indican la aplicabilidad de la especie *L. punctata* para el pulido de efluentes, demostrando su eficacia en la remoción de nutrientes y en la generación de biomasa con alto valor nutritivo pudiendo ser implementadas en nutrición animal.

Palabras claves: eutrofización, RBC, *Landoltia punctata*, remoción, biomasa, proteínas.

Abstract: The discharge of pollutants of anthropogenic origin with the presence of nutrients such as Nitrogen (N) and phosphorus (P), can trigger the eutrophication of bodies of water, due to the fact that excess nutrients cause an imbalance in aquatic ecosystems. The implementation of treatment systems based on biological processes emerge as an economically profitable alternative, with the possibility of generating value-added by-products in the process. In the present work, the applicability of the use of duckweed in the complementary treatment of effluents from Rotary Contact Biological Reactors (RBC) systems was evaluated with the aim of reducing the concentration of nutrients and generating enriched biomass. We worked with synthetic wastewater initially treated in a laboratory-scale RBC system. The effluent was subsequently used for the 96-hour growth of the *Landoltia punctata* species, on a mesocosm scale. The results indicate that removal percentages higher than 50% and 70% were obtained for N-NH₃ and PO₄ respectively. Regarding the valuation of the biomass generated postharvest of *L. punctata*, the percentage of total proteins on average was 29.2% and for total lipids it was obtained on average 9.8%. The results obtained indicate the applicability of the species *L. punctata* for the polishing of effluents, demonstrating its effectiveness in the removal of nutrients and in the generation of biomass with high nutritional value, which can be implemented in animal nutrition.

Key words: eutrophication, RBC, *Landoltia punctata*, enriched biomass, proteins.

Recibido: 05/03/2021 Aceptado: 30/03/2021



Introducción

Toda actividad humana tiene asociada una generación de aguas residuales que deben ser sometidas a un tratamiento que garantice la continuidad del ciclo de consumo del recurso (Fernández González *et al.* 2000; Martelo & Lara, 2012).

La eliminación de nutrientes de las aguas residuales es uno de los mayores desafíos para las plantas de tratamientos, en donde la mayoría de los sistemas de tratamientos están diseñados en función de la carga orgánica, por lo que a menudo se descuidan las eliminaciones de nitrógeno y fósforo (Metcalf & Eddy Inc., 2013).

Los reactores biológicos rotativo de contacto (Rotating Biological Contactor o RBC por sus siglas en inglés) o Biodiscos, son sistemas de tratamiento de aguas residuales basadas en biopelícula que se forman en las superficies de los discos, su bajo costo operativo y estructura simple son algunas de las ventajas que presenta este sistema, aparte de una pequeña huella ecológica, siendo ampliamente utilizados para la estabilización de la materia orgánica y eliminación de nitrógeno principalmente (Alemzadeh *et al.* 2002; Hewawasam *et al.* 2018).

La eliminación de nutrientes a través de sistemas convencionales, generan gastos de energía y económica al agregar agentes químicos para disminuir nutrientes, situación que es planteada y aplicada en zonas urbanas, no así en zonas rurales o municipios pobres (Kneese *et al.* 2015). El exceso de nutrientes, principalmente nitrógeno antropogénico (N) y fósforo (P), es una de las principales causas de eutrofización en los cuerpos de agua. La necesidad de reducir los nutrientes antropogénicos en los ecosistemas acuáticos para prevenir la eutrofización del agua ha sido ampliamente reconocida (Conley *et al.* 2009; Liu *et al.* 2017).

Las lentejas de agua, son pequeñas macrófitas flotantes que tienen la alta capacidad de remoción de nutrientes disueltos del agua, como compuestos nitrogenados y fosforados, así como para reducir materia orgánica y sólidos suspendidos (Landolt and Kandeler, 1987; Skillicorn *et al.* 1993; Alaerts *et al.* 1996). Una de las ventajas más aprovechables de este grupo de macrófitas sobre otras utilizadas

en el tratamiento de efluentes es la generación de biomasa de alto valor nutricional, que alcanza en algunos casos niveles de proteínas totales (PT) de más de 40% (Cheng *et al.* 2002). Debido a esto, además de reducir el nivel de contaminantes y carga orgánica de los efluentes, el uso de lenteja de agua puede generar una biomasa rica en proteína, minimizando costos en ración animal, y generando ahorro de costos en la producción animal.

En los últimos años, la taxonomía de este grupo de macrófitas flotantes ha experimentado algunos cambios, solían pertenecer a la familia *Lemnaceae*, pero actualmente están enmarcadas en la subfamilia *Lemnoideae* dentro de la familia *Araceae*, con aproximadamente 40 especies en 5 géneros (APG II, 2003).

Entre las especies de lentejas de agua, no todas son efectivas en el tratamiento de efluentes y para la producción de proteínas. Luego de la evaluación de 41 especies de lenteja de agua, aisladas geográficamente para determinar la especie con mayor potencial en el tratamiento de desechos porcinos y en la producción de proteínas se demostró que la especie *Landoltia punctata* era la ideal y la que cumplía con los criterios Bergmann *et al.* (2000). Varios investigadores han realizado estudios sobre el uso potencial de la lenteja de agua en el tratamiento de aguas residuales, especialmente para la eliminación de nutrientes.

Debido a estos antecedentes, surge la necesidad de desarrollar sistemas alternativos de pulido de aguas residuales con el fin de reducir la carga de nutrientes antropogénicos y obtención de biomasa valorizada rica en proteínas.

Materiales y métodos

Sistema de tratamiento mediado por Reactores Biológicos Rotativos de Contacto

El sistema RBC fue construido para operar con un caudal (Q) de 55 L/d, con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de aproximadamente 3,5 horas, en la Tabla 1 se muestra las especificaciones técnicas y variables teóricas asumidas para la construcción (Ayala, 2016). Los RBC poseen una serie de discos que están parcialmente sumergidos en el agua

Tabla 1. Especificaciones técnicas y variables teóricas asumidas para la construcción (Fuente: Ayala, 2016).

Características	Valor
Área total de formación de biopelícula	0,85 m ²
Cantidad de discos	14
Número de etapas	2
Caudal de trabajo	55 L/d (38 mL/min)
DBO ₅ del afluente (de diseño)	350 g/m ³
DBO ₅ del efluente (de diseño)	40 g/m ³
Volumen efectivo del reactor	8 L
TRH	3,5 h
Carga orgánica aplicada	15,27 g DBO ₅ m ² .d
Velocidad de giro del eje	8,5 rpm

residual los mismos fueron construidos en acrílico transparente, esquematizados en la Fig. 1.

Laguna de *Landoltia punctata* a escala mesocosmos

Para el período de adaptación, se utilizaron ejemplares de lentejas de agua (*L. punctata*) del cultivo stock mantenido en el invernáculo del Departamento de Biotecnología, las mismas fueron colectadas de zonas naturales, específicamente del Banco San Miguel en la costanera de la Ciudad de Asunción (agregar ubicación geográfica). La biomasa utilizada se dispuso en frascos (Fotobiorreactores) con una capacidad máxima de 3 litros, que fueron utilizados como unidades experimentales para el desarrollo del experimento (Fig. 2). Las dimensiones de los mismos fueron claves para conocer el área a ser

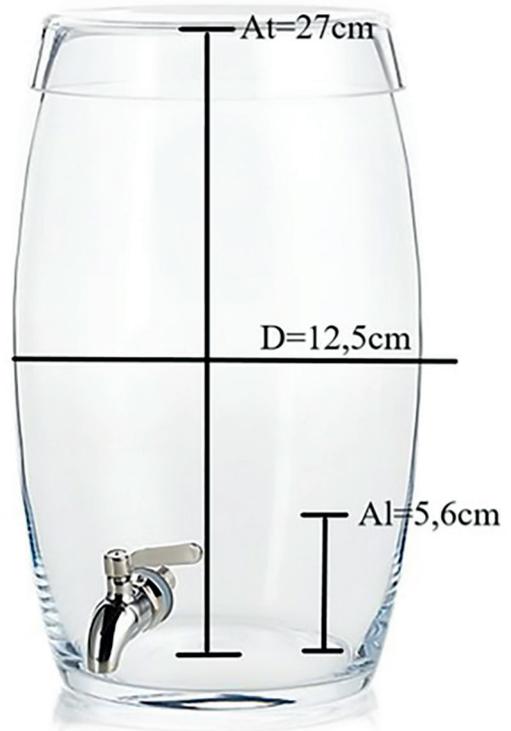


Figura 2. Dimensiones del FBR, Altura total ($A_t=27$ cm), diámetro ($D=12,5$ cm) y altura del líquido (5,6 cm).

dispuesto por las macrófitas a ser empleadas (1.225 cm², que corresponde a 8 g. de biomasa fresca). Las dimensiones del FBR se muestran en la Tabla 2. Cada FBR fue cargado con 600 mL de efluente previamente depurado tratado en el sistema RBC.

Control de calidad de efluentes

Se utilizó agua residual sintética (ARS), sugerido por Metcalf y Eddy Inc. (1991), para ser introducido al sistema RBC. Se procedió a realizar la medida de los parámetros como pH, temperatura,

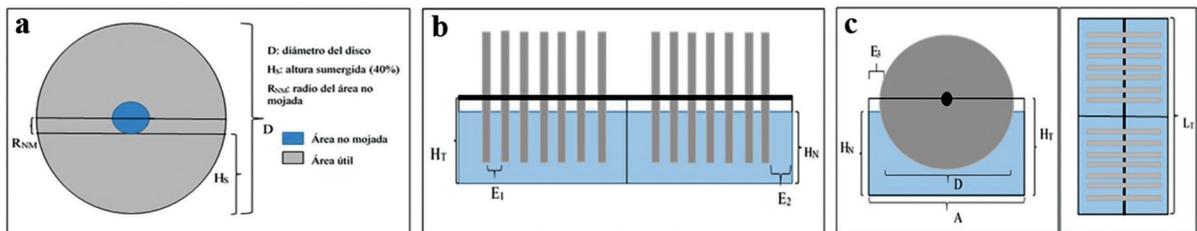


Figura 1. Plano del Reactor Biológico de Contacto. a. plano frontal de los discos. b. Perfil del sistema c. Frente y superior del sistema (Fuente: Ayala, 2016).

Tabla 2. Dimensiones del FBR utilizado en el ensayo.

Características	Valor
Altura externa	0,27 m
Altura interna	0,25 m
Diámetro interior	0,125 m
Área superficial interno	0,123 m ²
Altura del líquido	0,056 m

oxígeno disuelto, así como nitrógeno amoniacal y ortofosfato a la entrada y salida del sistema RBC. Los mismos parámetros fueron registrados en los fotobiorreactores con *L. punctata*. Esto se realizó a efectos de observar la variación de los parámetros y control de los nutrientes en estudio. Los parámetros se midieron con un equipo multiparamétrico TOA DKK y los análisis fisicoquímicos del ARS que se realizaron fueron el Método de la Nesslerización, para nitrógeno amoniacal y el Método colorimétrico del Ácido Vanadato Molibdato-Fosfórico para ortofosfato (Clesceri *et al.*, 1999).

Monitoreo de biomasa

Posterior al periodo de adaptación, se dispuso 8 g de biomasa húmeda, la misma fue implementada debido a que cubría en su totalidad el área superficial del FBR utilizado. Se procedió a pesar 6

muestras de biomasa húmeda, 3 fueron utilizadas y expuestas al efluente proveniente del sistema RBC, y 3 fueron llevadas a la estufa a 60 °C por 24 horas de manera a tener un control de peso seco inicial pre tratamiento. La biomasa dispuesta y expuesta al efluente proveniente del sistema RBC, fue tratada de la misma forma que la biomasa inicial, una vez finalizado el ensayo. Los datos de los monitores de biomasa se presentan en la tabla 4.

Evaluación de la biomasa generada

La biomasa inicial y biomasa post tratamiento, fueron evaluadas de manera a conocer el porcentaje de proteínas totales y lípidos totales. Esta comparación fue muy importante para saber si existe diferencia en cuanto al tenor de las biomásas post tratamiento, y si será viable la implementación de esta biomasa generada como producto de alto valor nutricional. La determinación de proteínas totales se realizó mediante el Método de Kjendall modificado a partir del cual se obtuvo la cantidad de nitrógeno total contenido en la biomasa y luego a partir de un factor de conversión proporcionado por Tacon para la FAO (1987) y García & Fernández (2012), se obtuvo el porcentaje de proteínas totales. La determinación de lípidos totales se realizó mediante extracción con hexano. Los resultados de la evaluación se presentan en la Tabla 5.

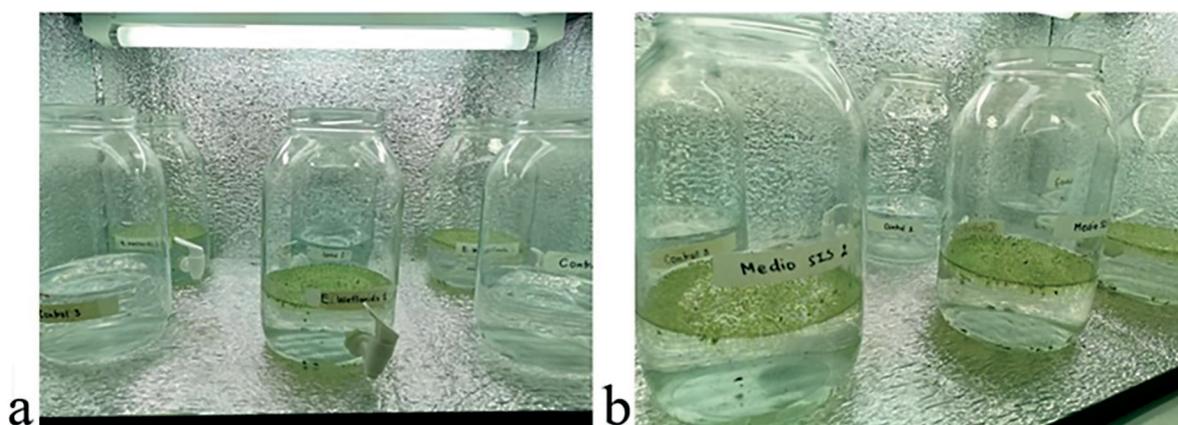


Figura 3. Fotobiorreactores utilizados en los ensayos, distribuidos de forma aleatoria. a. vista frontal de la incubadora junto con el sistema de iluminación, b. vista en diagonal de la incubadora con los FBR.

Diseño experimental

En una incubadora con fotoperiodo (14/10hs de luz/oscuridad) se dispusieron de forma aleatoria 6 FBRs, 3 correspondientes al control, que contenía 600mL de ARS proveniente del sistema RBC y 3 correspondientes al tratamiento, que contenía 600mL de ARS proveniente del sistema RBC y 8 g de biomasa húmeda en cada FBR (Fig. 3). El experimento duró 96 horas, con una temperatura promedio de 24 °C criterio que se estableció debido a las condiciones en las que se operó el ensayo (volumen, temperatura, fotoperiodo, tiempo).

Resultados

Eficiencia del sistema de tratamiento mediado por *Landoltia punctata*

En la Tabla 3 se muestran los datos obtenidos correspondiente al ARS, al inicio del sistema RBC, al final del sistema RBC, valor similar correspondiente al inicio del sistema mediado por *L. punctata* y al final del sistema mediado por la especie *L. punctata*.

En la etapa que corresponde al sistema de tratamiento mediado por RBC, se puede observar que la concentración de NH_3 disminuyó bastante a la salida del sistema RBC, con una concentración de 41,2 mg/L en la entrada y 27,0 mg/L a la salida, con un porcentaje de remoción de 34,3%. En la Fig. 4 se muestra la variación de la concentración de N-NH_3 durante las 96 horas de desarrollo del

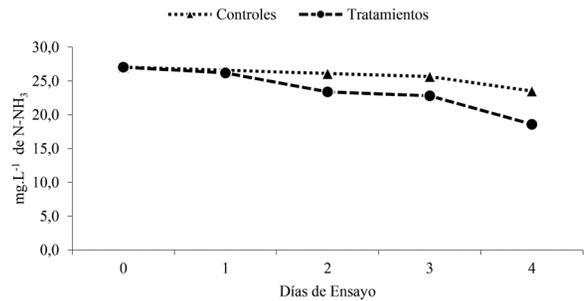


Figura 4. Variación de la concentración de Nitrógeno amoniacal durante los 4 días de ensayo con efluente de RBC.

ensayo, se puede observar que la concentración de partida fue de 27,0 mg/L en promedio, luego del tratamiento mediado por *L. punctata*, la concentración de N-NH_3 fue de 18,6 mg/L, representando el 31% de remoción del compuesto en esta etapa. .

Con respecto al ortofosfato, en la etapa correspondiente al tratamiento mediado por RBC la concentración del compuesto al ingresar al sistema fue de 12,3mg/L, y la concentración de salida de 10,1 mg/L, representando aproximadamente un 18% de remoción, En la Fig. 5 se muestra la variación de la concentración de ortofosfato durante las 96 horas que duró el ensayo de remoción en sistema mediado por *L. punctata*, en donde la concentración inicial fue de 10,1 mg/L, una vez finalizado el ensayo, la concentración del compuesto en el ARS fue de 2,1 mg/L representando una remoción del 75%.

Con respecto a uno de los parámetros que fue controlado de forma diaria durante las 96 h. En la

Tabla 3. Resumen de datos colectados durante los días que duró el ensayo. *) Entrada al sistema RBC. **) Salida del sistema RBC / Inicio del sistema mediado por *Landoltia punctata*. ***) Término del Control (sin *Landoltia punctata*). ****) Término del sistema mediado por *Landoltia punctata*.

Parámetros	*E. RBC	**S. RBC / I. <i>L.p.</i>	*** T. C	**** T. <i>L.p.</i>
Nitrógeno amoniacal	41,2	27,0	23,5	18,6
Ortofosfato	12,3	10,1	6,8	2,1
pH	5,87	7,34	7,33	7,25
Oxígeno Disuelto (mg.L ⁻¹)	1,01	4,29	3,50	2,70
Conductividad (mS.m ⁻¹)	103,4	55,13	33,9	53,75
Turbidez (NTU)	141,4	128,7	136,3	83,10
Temperatura (°C)	24,2	22,51	20,9	20,45

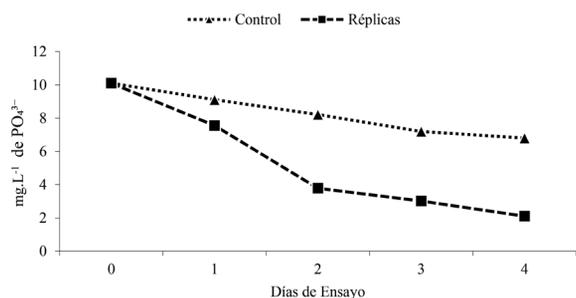


Figura 5. Concentración de Ortofosfato durante 4 días de ensayo con efluente de RBC.

Fig. 6, se puede observar el gráfico de variación de pH, dicho parámetro no sufrió una variación muy brusca durante las 96 h. de ensayo, manteniéndose casi constante durante todo el tiempo. Al igual que la temperatura, el mismo no varió bastante, manteniéndose dentro de los parámetros establecidos (24 ± 2 °C). Ambos parámetros se mantuvieron constantes, el pH, dependiente del sistema y ambiente determinado, y la temperatura que fue un parámetro establecido.

Variación de la biomasa

Debido a las condiciones de desarrollo del ensayo, así como la cantidad de biomasa inicial implementada, el aumento de biomasa no fue tan elevado, atribuyendo esto principalmente a la saturación del área superficial que fue recubierto completamente por la especie implementada. En la Tabla 4 se muestra el peso seco inicial, y el peso seco post tratamiento, implementando el mismo procedimiento antes de pesar y procedimiento de secado.

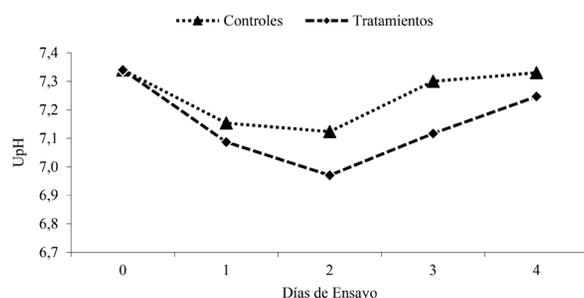


Figura 6. Variación del pH durante 4 días de ensayo con efluente de RBC.

Tabla 4. Resumen de peso seco inicial y final, junto con el incremento de biomasa al finalizar el ensayo en gramos.

Tratamientos	Peso seco I (g)	Peso seco F (g)	Incremento (g)
R 1.	0,301	0,362	0,061
R 2.	0,309	0,379	0,070
R 3.	0,316	0,381	0,065

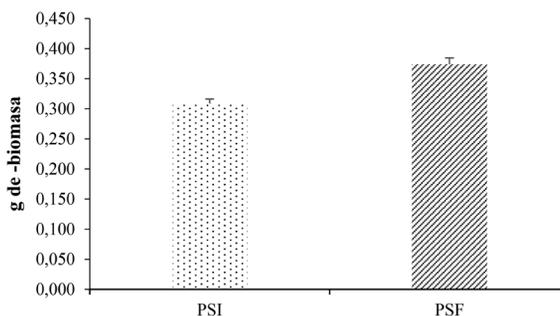


Figura 7. Barra de error de gramos de biomasa generada, al inicio y final del tratamiento.

Valorización de biomasa generada

Una vez cosechada y secada la biomasa se procedió a realizar la valorización de manera a conocer la concentración de proteínas totales y lípidos totales, tanto de la biomasa de control (que se pesó y secó al inicio del ensayo), como de la biomasa obtenida post tratamiento. En la Fig. 7 se puede observar el gráfico de barra de error por SD tanto de la biomasa inicial como de la biomasa post tratamiento del ARS. En la Tabla 5, se muestra un resumen del porcentaje de proteínas y lípidos del Peso Seco Inicial y Peso Seco Final.

Se puede ver que la concentración de proteínas totales aumentó una vez finalizado el tratamiento, atribuyendo el aumento de la biomasa, junto con

Tabla 5. Promedio del porcentaje de proteína y lípido de la biomasa inicial y final posttratamiento.

Tratamiento	% Proteína total	%Lípidos totales
<i>L. punctata</i> crecidas en efluentes del RBC	29,2	9,8
Peso seco inicial de <i>L. punctata</i>	18,0	5,0

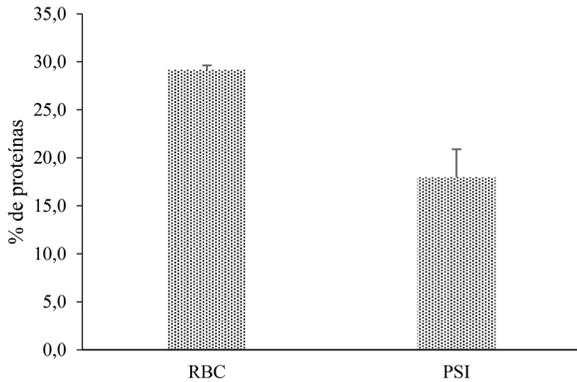


Figura 8. Barra de error del porcentaje de Proteínas totales por tratamiento.

la disminución del compuesto nitrogenado, al aumento del porcentaje de proteínas totales en comparación al porcentaje del mismo en la biomasa mantenido en stock., en la Fig. 8 se puede observar el gráfico de barra de error por SD. Mientras que el porcentaje de lípidos totales una vez finalizado el tratamiento aumentó casi al doble en comparación al valor de la biomasa inicial, en la Fig. 9 se puede observar un gráfico con error por SD tanto inicial como post tratamiento del ARS para los lípidos. Con los resultados obtenidos se puede atribuir que tanto el consumo de compuestos nitrogenados, como fosforados mejoran la biomasa de *L. punctata*, incrementando el tenor de proteínas como de lípidos.

Discusión

A nivel regional, Brasil ha demostrado excelentes resultados en su uso, como para tratar efluentes de

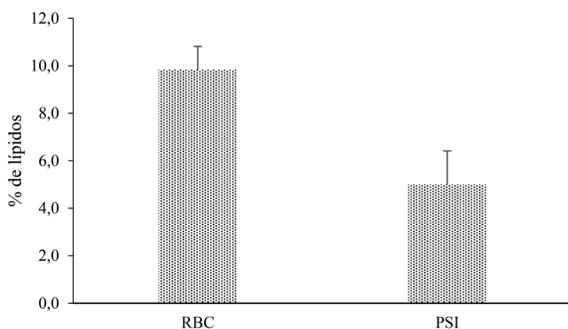


Figura 9. Barra de error de del porcentaje de Lípidos totales por tratamiento.

ganado en zonas rurales, a nivel nacional no existen estudios que se basen en la implementación de estos sistemas, conjugándolos con otros sistemas biológicos de tratamiento de aguas residuales, como el modelo utilizado en este trabajo (RBC).

En los resultados obtenidos en la Figura 4, con respecto a la variación de la concentración de $N-NH_3$ queda demostrando la eficiencia del sistema para disminuir la carga de nutrientes, en relación a lo obtenido por otros autores, el porcentaje de remoción se encuentra por debajo del 50%, valores obtenidos empleando otras especies de la misma sub-familia. Con los resultados obtenidos se puede indicar que hubo 31% de remoción del compuesto, valor inferior a los obtenidos por Nassar *et. al.* (2015), y Toyama *et. al.* (2017) con un porcentaje de remoción del 60% utilizando la misma especie, mientras que otro autores como Roman & Brennan (2019) obtuvieron porcentajes de remoción similares a los obtenidos en este ensayo o inclusive menores, empleando otras especies de la misma familia.

En relación a la disminución del ortofosfato en el sistema mediado por *L. punctata*, que se muestra en la figura 5, el porcentaje fue elevado y comparable con valores obtenidos por varios autores. Tonon (2014), implementó la misma especie para la remoción de nutrientes de aguas residuales domésticas, obtuvo una eficiencia de remoción de ortofosfato del 89,49%, mientras que Nassar, *et. al.* (2015), obtuvieron porcentajes similares a los obtenidos en este ensayo, para la remoción de fósforo total, utilizando especies de la misma familia (*Lemna gibba* y *Lemna minor*), igualmente, Chen *et. al.* (2019) utilizando la especie *Lemna japonica* en su estudio obtuvieron una eficiencia en la remoción entre 22.35% y 60.11%.

En la Tabla 5 se resume el porcentaje de proteínas totales y lípidos totales de la biomasa inicial así como la obtenida post tratamiento. Primeramente el porcentaje de proteínas totales para el PSI fue de 18%, con una $SD=2,92$, el mismo nos demuestra el porcentaje de proteínas totales de la biomasa tomada del cultivo mantenido en condiciones de invernáculo,, igualmente el porcentaje de proteínas

totales es elevado, considerando que el mismo no fue obtenido postratamiento, en comparación con la biomasa analizada postratamiento en lagunas que presentó un porcentaje elevado de proteínas totales, siendo el mismo 29,2%, con un SD= 0,47, resultados comparables con lo obtenido por Nassar, *et. al.* (2015), quienes trabajaron con las especies *Lemna gibba* y *Lemna minor*, pertenecientes a la subfamilia de la especie en estudio, el porcentaje de proteínas obtenido fue de 28,1%, con esto concluyeron que la biomasa generada, puede ser empleada como proteína vegetal para ganado y piscicultura, debido al potencial que presentan. De igual forma, Chen *et. al.* (2019), utilizaron la especie *Lemna japonica*, y obtuvieron como promedio máximo de proteínas totales 25,89% en sistemas acoplados, otros autores como Rusoff *et. al.* (1980) reportaron un porcentaje de 28,7% de proteínas totales utilizando la misma especie.

En relación al porcentaje de lípidos totales, se puede observar (Figura 9) el aumento del contenido de lípidos totales post tratamiento del ARS proveniente del sistema RBC, en comparación con la biomasa inicial. El porcentaje de lípidos totales inicial fue de 5,0% con un SD = 1,41, mientras que el porcentaje post tratamiento fue de 9,8%, siendo el doble del inicial, con una SD = 0,98. Porcentajes similares a los obtenidos post tratamiento obtuvieron Verma & Suthar (2016), quienes expresaron que la biomasa seca de lentejas de agua muestran un elevado contenido de moléculas de energía, entre ellos, los lípidos, los mismos reportaron un contenido de 9,3% de lípidos, otros estudios, donde analizaron el contenido de lípidos de totales de la especie *Azolla Filiculoides*, perteneciente a la familia de la especie en estudio.

Brouwer *et. al.* (2016), obtuvieron un porcentaje de 7,92%; por otro lado, Gaur & Suthar (2017) trabajaron con la especie *Spirodela polyrhiza* utilizando agua residual urbano, los mismos registraron una acumulación de 46,36% de lípidos crudos. Otros estudios utilizando solución nutritiva Hoagland como la desarrollada por Miranda *et. al.* (2018), reportaron una acumulación de 5% de lípidos totales, valor por debajo a lo obtenido post

tratamiento. Con estos resultados se

Los resultados demuestran que la biomasa obtenida postratamiento puede ser empleada como fuente de nutrición animal, debido al alto contenido de proteínas totales. Mientras que el bajo rendimiento de lípidos, nos demuestra que la biomasa no puede ser destinada para la producción de biodiesel (Miranda *et. al.* 2020)

Según Iqbal (1999), las lentejas de agua pueden presentar la mayor tasa de crecimiento entre los vegetales superiores, cuando se desarrollan en condiciones ideales, debido a eso, la biomasa generada puede ser destinada a la producción de biocombustibles, siempre que el porcentaje de lípidos sea mayor, ya que los mismos requieren principalmente fuentes de nitrógeno y fósforo, y con las experiencias reportadas y la obtenida en el presente trabajo sugiere que esta tecnología es muy prometedora debido al bajo costo del tratamiento (Beims, 2017).

Conclusión

La especie *Landoltia punctata*, presenta resultados prometedores como sistema de tratamiento terciario o complementario a sistemas de tratamiento biológico descentralizado, demostrando el potencial para eliminar contaminantes a fin de realizar un pulido final a efluentes líquidos. Los resultados demostraron la eficiencia en eliminar N-NH₃, P-PO₄, dejando los mismos dentro de los valores admitidos por la legislación Nacional, así mismo la disminución de la conductividad, turbidez, no así el oxígeno disuelto que debido al estancamiento del sistema pudo influir en su leve disminución.

En relación a la generación de biomasa enriquecida, a pesar de obtener una baja producción en la misma, posiblemente limitada por el espacio, el leve incremento es un indicativo de que la especie *L. punctata* aprovechó los nutrientes disponibles y aparte de aumentar su biomasa, pudo aumentar su tenor nutritivo demostrado en los resultados de proteínas totales y lípidos totales.

Con estos resultados, se podría concluir que la especie utilizada puede ser implementada como sistema de tratamiento terciario de aguas residuales,

en zonas rurales donde la biomasa generada pueda ser nuevamente introducida a la cadena de producción, destinando la misma al consumo animal.

Agradecimientos

A la FACEN por la oportunidad de realizar la Maestría en Biotecnología Industrial, al CONACYT por el financiamiento a dicha Maestría. A los profesionales que me orientaron en el proceso de desarrollo del trabajo final de Tesis.

Literatura citada

- Alemzadeh, I., Vossoughi, F., & Houshmandi, M. (2002). Phenol biodegradation by rotating biological contactor. *Biochemical Engineering Journal*, 11(1): 19–23.
- Alaerts, G.J., Mahbubar, M.R. & Kelderman, P. (1996). Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon. *Water Research*, 30(4): 843–852.
- Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. & Eaton, A.D. (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. (20th ed.). Nueva York: APHA / AWWA / WEF.
- APG II. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141(4): 399–436, 20.
- Ayala, P.R. (2016). *Eficacia de un Reactor Biológico Rotativo de Contacto a escala Laboratorio para la remoción de contaminantes de un agua residual*. Tesis de grado. San Lorenzo: Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Asunción.
- Beims, A.M. (2017). *Acúmulo de amido em lemnas (Landoltia punctata) através do enriquecimento de CO₂, visando à produção de bioetanol*. Tesis de grado. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 136 pp.
- Bergmann, B.A., Cheng, J., Classen, J., & Stomp, A.M. (2000). Nutrient removal from swine lagoon effluent by duckweed. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 43(2): 263–269.
- Brouwer, P., van der Werf, A., Schlupepmann, H.; Reichart, G.J.; Nierop, K.G.J. (2016). Lipid yield and composition of *Azolla filiculoides* and the implications for biodiesel production. *Bioenergy Research*, 9: 369–377.
- Chen, G., Huang, J., Fang, Y., Zhao, Y., Tian, X., Jin, Y. & Zhao, H. (2019). Microbial community succession and pollutants removal of a novel carriers enhanced duckweed treatment system for rural wastewater in Dianchi Lake basin. *Bioresource Technology*. 276: 8 – 17.
- Cheng, J., Landesman, L., Bergmann, B.A., Classen, J.J., Howard, J.W., Yamamoto, Y.T. (2002). Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 45(4): 1003–1010.
- Conley, D. J., Paerl, H. W., Howarth, R. W., Boesch, D. F., Seitzinger, S. P., Havens, K. E., Lancelot, C., & Likens, G. E. (2009). Controlling eutrophication: phosphorus and nitrogen. *Science*, 323(5917): 1014–1015.
- Fernández González, J., de Miguel Beascochea, E., de Miguel Muñoz, J., & Curt Fernández de la Mora, M. D. (2000). *Manual de Fitodepuración: Filtros de macrofitas en flotación*. Macrid: EDITAN. 128 pp.
- García, E.M. & Fernández, I. (2012). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl: Valoración con un ácido fuerte*. Artículo docente. Valencia: Universitat Politècnica de València. 5 pp. [Consultado: 14.v.2020]. <<http://hdl.handle.net/10251/16338>>.
- Gaur, R.Z., Khan, A.A. & Suthar, S. (2017). Effect of thermal pre-treatment on co-digestion of duckweed (*Lemna gibba*) and waste activated sludge on biogas production. *Chemosphere*, 174: 754–763.
- Hewawasam, C., Matsuura, N., Takimoto, Y., Hatamoto, M., & Yamaguchi, T. (2018). Optimization of rotational speed and hydraulic retention time of a rotational sponge reactor for sewage treatment. *Journal of Environmental Management*, 222: 155–163.

- Iqbal, S. (1999). Duckweed aquaculture: potentials, possibilities and limitations for combined wastewater treatment and animal feed production in developing countries. *SANDEC Report*, 6(99): 1–91.
- Landolt, E., & Kandeler, R. (1987). Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae): Vol. 4: The family of Lemnaceae - a monographic study; Vol. 2: Phytochemistry, physiology, application, bibliography. *Veröffentlichungen des Geobotanischen Institutes der Eidgenössische Technische Hochschule Stiftung Rübel im Zürich*, 95: 1–638.
- Liu, C., Dai, Z., & Sun, H. (2017). Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. *Journal of Environmental Management*, 187(2): 497–503.
- Martelo, J., & Lara, J. (2012). Macrófitas flotantes en el tratamiento de aguas residuales: una revisión del estado del arte. *Ingeniería y Ciencia*, 8(15): 221–243.
- Metcalf and Eddy, Inc. (1991). *Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse*. (3rd ed.). New York: McGraw-Hill. xvi + 1334 pp.
- Miranda, A.F., Liu, Z.Q., Rochfort, S. & Mouradov, A. (2018). Lipid production in aquatic plant *Azolla* at vegetative and reproductive stages and in response to abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 124: 117–125.
- Miranda, A. F., Kumar, N. R., Spangenberg, G., Subudhi, S., Lal, B., & Mouradov, A. (2020). Aquatic plants, *Landoltia punctata*, and *Azolla filiculoides* as bio-converters of wastewater to biofuel. *Plants*, 9(437): 1–18.
- Nassar, H. F., Shaban, A., d M., Bassem, S. M., & Abdel-Gawad, F. K. (2015). Utilization of duckweed (DW) in nutrient removal from agricultural waste water and producing alternative economic animal fodder. *Der Pharma Chemica*, 7(12), 280–285.
- Rusoff, L.L., Blackeney, E.W. & Culley, D.D. (1980). Duckweeds (Lemnaceae Family): a potential source of protein and amino acids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 28(4): 848–850.
- Skillicorn, P., Spira, W., & Journey, W. (1993). *Duckweed aquaculture: a new aquatic farming system for developing countries*. Washington: The World Bank. x + 76.
- Tacon, A.G.J. (1987). *Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados: manual de capacitación*. Brasilia: FAO. 483 pp.
- Tonon, G. (2016). *Avaliação de lagoas de lemnas para o polimento de esgoto doméstico: emissões de GEE e valorização de biomassa na produção de biometano*. Disertación de Maestría. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina. 154 pp.
- Verma, R., & Suthar, S. (2015). Utility of duckweeds as source of biomass energy: a review. *Bioenergy Research*, 8(4): 1589–1597.

Determinación del movimiento escolar en las instituciones educativas de la ciudad de Capiatá, Departamento Central

Determination of the school movements in the educational institutions of Capiata, Central Department

Liz Paola Lugo^{1,2,5}, , Liz Mariela Centurión¹,  & Roberto Martínez-López^{1,3,4}, 

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. San Lorenzo, Paraguay.

²Ministerio de Educación y Ciencias. Asunción, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. San Lorenzo, Paraguay

⁴Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Veterinarias. San Lorenzo, Paraguay.

⁵E-mail: *paolugo16@gmail.com.

Resumen: la educación constituye un área de preponderancia en nuestro país, en ese contexto, el estudio del movimiento escolar de una ciudad es primordial por la información que puede ser generada a partir del mismo, incidiendo positivamente en la toma de decisiones sobre las prioridades en cada distrito. En este contexto, se consideró los registros de los estudiantes de dos niveles de instrucción, el tercer ciclo y la educación media en un período de 10 años (2008 - 2017) utilizando los datos pertenecientes al Ministerio de Educación y Ciencias, Paraguay. El objetivo de esta investigación consistió en determinar el número de matriculados y egresados en las instituciones de enseñanza básica y media en el municipio de Capiatá analizando un total de 1012 instituciones del sector oficial, 236 instituciones privadas y 133 instituciones privadas subvencionadas. Se encontró que en este período de tiempo fueron matriculados en el tercer ciclo de la educación escolar básica 113553 estudiantes y 88758 estudiantes en la educación media. En lo concerniente al número de egresados, 28807 correspondió al tercer ciclo y 20442 estudiantes egresados en la educación media. Se constató que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el número de matriculados y número de egresados según del nivel de instrucción en el municipio de Capiatá.

Palabras clave: educación, matriculaciones, egresos.

Abstract: The study of the school movement of a city is important, because it affects decision-making about priorities in each district and education constitutes an area of preponderance at the country level. In this context, the records of students of two levels of instruction in the third cycle and secondary education in a period of 10 years (2008 - 2017) using data belonging to the Ministry of Education and Science, Paraguay, were considered. The objective of this research was to determine the number of enrolled and graduates in the institutions of basic and secondary education in the municipality of Capiatá analyzing a total of 1012 institutions of the official sector, 236 private institutions and 133 subsidized private institutions. It was found that in this period of time 113553 students and 88758 students in secondary education were enrolled in the city in the third cycle of basic education, there were also 28807 graduates in the third cycle and 20442 students graduated in education half. It was found that there is a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the number of enrolled students and the number of graduates according to the level of education in the municipality of Capiatá.

Key words: Education, enrollment, graduates.

Introducción

A nivel nacional el Ministerio de Educación y Ciencias (MEC) ha invertido en infraestructura o primeras necesidades de las instituciones del sector público por medio del Fondo Nacional de Inversión

Pública y Desarrollo (FONACIDE) y a su vez por los propios municipios quienes se encargan de analizar las realidades de las instituciones educativas y de asistir a aquellas con necesidades mayores.

La educación en el Paraguay es un área que

Recibido: 09/08/2019 Aceptado: 13/04/2021



necesita de mejoras en cuanto a la inversión, en el sentido del uso racional de los recursos disponibles ya que existe una desproporción en cuanto a las inversiones hechas en los diferentes departamentos del país y por ende en las zonas de bajas y altas condiciones socioeconómicas, a eso se le puede agregar el crecimiento demográfico en las diferentes ciudades ya sean en la zona urbana o rural, que por diferentes motivos que obligan a los ciudadanos a migrar en busca de mejoras en su calidad de vida. Por lo expuesto se pueden observar dinámicas educativas relacionadas a la matriculación en las instituciones educativas, tanto del sector oficial como en las privadas y privadas subvencionadas, que requieren de políticas públicas para mejorar la gestión.

A pesar de la importancia socio-económica que se atribuye a la educación para el desarrollo, la formulación de políticas y estrategias educativas por departamento, actualmente, los municipios no cuentan con un plan estratégico en el sector educativo, por lo que el análisis es fundamental para su elaboración, este estudio contribuirá a la actualización del diagnóstico en busca de la garantía de la educación en el tercer ciclo y nivel medio de los estudiantes de la ciudad.

A los efectos de aportar a la descripción de la realidad educativa a nivel distrital, se realizó esta investigación, mediante el análisis de las estadísticas de distintas fuentes secundarias. Se espera que con este estudio se genere una reflexión sobre las políticas educativas vigentes en los distritos, especialmente en la ciudad de Capiatá y por ende al MEC, dado que los indicadores educativos componen una herramienta fundamental para la toma de decisiones en cuanto a las políticas, estrategias y acciones que se manifiestan en un plan estratégico a nivel departamental y distrital.

Materiales y métodos

El trabajo de investigación se llevó a cabo en la República del Paraguay, en el departamento Central, en donde la ciudad de Capiatá fue el área de interés, la misma comprende una extensión territorial de 83 km² y actualmente cuenta con aproximadamente

260.000 habitantes, lo cual la convierte en la tercera más poblada del departamento y la quinta en la Gran Asunción. Fueron consideradas específicamente las instituciones públicas, privadas y privadas subvencionadas que se encuentran en la ciudad.

Para la obtención de los datos fueron considerados los registros del Ministerio de Educación y Ciencias, en ese contexto se presentaron solicitudes de acceso a los mismos a través de portal unificado de información pública del país. Una vez accedido a esos registros, los datos fueron asentados en planillas electrónicas de Excel y clasificados conforme a las variables establecidas, cabe mencionar que el banco de datos constaba de una serie de características referente a las unidades educativas que no eran de interés en la presente investigación, también fueron evidenciadas unidades. Finalizado el proceso de depuración, los datos fueron analizados primeramente con el empleo de la estadística descriptiva, para las variables de tipo cualitativo fueron calculadas las frecuencias absolutas y porcentuales y, para las cuantitativas, se determinaron las medidas de tendencia central y de dispersión. En ese contexto, se destaca la utilidad y la relevancia de esta herramienta estadística debido a su contribución en el conocimiento y en la detección primaria del patrón de comportamiento de las variables consideradas sobre las unidades de interés, en este caso, instituciones educativas oficiales, privadas y privadas subvencionadas. En el estudio de la posible asociación entre las variables: tipo de institución y años en cuanto al número de matriculados, egresados e instituciones se empleó el análisis de correspondencia simple. Se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la comparación entre los distintos sectores educativos y para la identificación de los pares disimiles, se empleó el test de Dunn bajo un nivel de significancia del 5%. Los análisis fueron realizados en el lenguaje de programación R-project (R Core Team, 2018) y en plantillas de cálculos del Excel

Resultados y discusión

En la Tabla 1, se observa los resultados obtenidos mediante una prueba estadística, considerando el

Tabla 1. Análisis de Kruskal Wallis para la variable número de instituciones según tipo de instituciones.

Variable	Estadístico de contraste	gl	Significancia (5%)
Nro. de instituciones	25,91	2	0,000*

número de instituciones habilitadas y el sector al cual pertenecen.

Al aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para la comparación entre los tres sectores del cual provienen las instituciones, se pudo constatar existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto al número de instituciones dependiendo del sector al cual pertenecen. Con base en el análisis a posteriori utilizando el test de Dunn estas diferencias fueron evidenciadas entre los tres sectores: público, privado y subvencionado ($p < 0,05$).

Como se puede visualizar en la Tabla 2, en lo referente a la medida de dispersión de los datos con respecto al promedio de cada estrato, los valores obtenidos fueron muy bajos, lo cual indica que la cantidad de instituciones para cada año no fueron muy disímiles entre sí y sus valores se posicionaron muy cerca de la medida de tendencia central. En el sector oficial se puede decir que en el 50% de las observaciones, la cantidad de instituciones está por encima de 104 habilitadas; en el sector privado por encima de 23 y las subvencionas por debajo de 13; además, también se puede destacar que la variabilidad intra grupal fue mínima en el intervalo de tiempo considerado.

A continuación, se observa en la Tabla 3 las

cantidades totales de matriculados por sector educativo considerando los inscriptos en el TC y EM.

Se observa que el número de matriculados en el sector oficial fue aumentando, contrariamente a lo que ocurrió en el sector privado, en donde la cantidad de matriculados decreció, menos en el año 2014, en donde se observó una diferencia positiva con relación al año precedente. Sin embargo, en las unidades subvencionadas se visualiza un aumento exceptuando los años 2015 y 2016; en ese contexto se puede decir que esto pudo deberse al cierre de algunas instituciones privadas debido al costo que implica estudiar en este tipo de institución, como por ejemplo: la matriculación, los derechos de exámenes finales por cada etapa, los materiales

Tabla 3. Distribución de frecuencias absolutas del número de matriculados por tipo de institución según años evaluados. **OF** oficial. **PR** privado. **PS** privado subvencionado.

Años	Tipo de institución			Total gral
	OF	PR	PS	
2008	13290	4056	1262	18608
2009	13696	4260	1267	19223
2010	14297	3929	1610	19836
2011	14940	3767	1810	20517
2012	15402	3694	1831	20927
2013	15353	3491	1857	20701
2014	15010	3640	1834	20484
2015	15245	3408	1581	20234
2016	15790	3124	1348	20262
2017	16518	3106	1895	21519

Tabla 2. Comparación entre sectores del cual provienen las instituciones. *) Letras diferentes en la misma columna, indican diferencias significativas a una probabilidad del 5% según el test de Dunn.

Tipo de institución	N	Mediana	Media	Desviación típica	Significancia (*)
Oficial	10	104,00	101,20	5,24	a
Privado	10	23,50	23,60	2,06	b
Privado-Sub	10	13,00	13,30	1,70	c

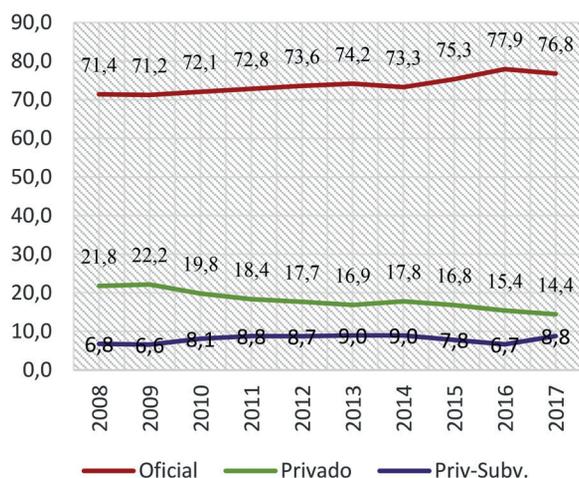


Figura 1. Porcentaje de alumnos matriculados por sector, según años evaluados.

y en algunos casos incluso las actividades extra-curriculares planificadas por la dirección de estos establecimientos.

Por su parte, Leivas (2016) confirma que las matriculaciones en instituciones públicas en la Argentina a nivel país tuvo una caída a partir del 2003 al 2014, al contrario de las privadas que aumentaron en su número de matriculaciones en el mismo período. Resultados que difieren de lo constatado en el presente trabajo.

Sin embargo, el estudio realizado por Verger et al (2016), muestran que en las últimas tres décadas la matrícula de las escuelas privadas subvencionadas y no subvencionadas, había aumentado más del doble, superando la matrícula de las instituciones públicas de Chile.

En la Figura 1, se muestran los porcentajes de la escolarización en los tres sectores considerando ambos niveles de instrucción el TC y EM, los mismos han registrado cierto aumento en los sectores oficial y privado subvencionado durante el período estudiado, sin embargo, en las instituciones privadas se visualiza un declive en la cantidad de matriculados al año, hecho que pudiera atribuirse a una migración institucional.

Se observa que existe una alta matriculación en instituciones educativas del sector oficial, y esa tendencia se mantuvo hasta el último año de estudio alcanzando el 76,8% del total de matricu-

lados en el último año en el distrito de la ciudad de Capiatá. A partir de estos resultados, se constata que la mayor población escolar de jóvenes de 12 a 17 años se concentra en instituciones públicas. En lo concerniente a unidades académicas subvencionadas, las matriculaciones también han aumentado en el último año habiendo alcanzado valores más elevados en los años 2012 y 2013 con un 9% del total de matriculaciones registradas.

La cantidad de matriculados en las diferentes instituciones de la ciudad tienen una tendencia al alta hasta el 2017 en los diferentes sectores educativos. El proceso de matriculación se realiza inicialmente al término del año escolar y en periodo de preclase, el cual se corresponde con el mes de febrero del año *a posteriori*, generalmente los primeros días. Sin embargo, el cierre de las inscripciones no se efectúa en ese mes, algunas instituciones continúan con ese proceso hasta unos meses antes de las evaluaciones finales. Las mismas no tienen límites en cuanto a la cantidad a matricular por curso o grado en cada año, pero, sí en cuanto a la cantidad mínima de matriculados para la habilitación de los grados o cursos, la cual oscila alrededor de los 15 estudiantes.

Tabla 4. Distribución de frecuencias absolutas y porcentuales de la cantidad de egresados por tipo de institución según años evaluados. **OF)** oficial. **PR)** privado. **PS)** privado subvencionado.

Años	Tipo de institución						Suma
	OF		PR		PS		
	Total	%	Total	%	Total	%	
2008	3553	70,6	1073	21,3	408	8,1	5034
2009	3460	68,8	1221	24,3	348	6,9	5029
2010	3466	69,8	1050	21,1	453	9,1	4969
2011	3730	70,4	1045	19,7	522	9,9	5297
2012	4044	71,8	1048	18,6	543	9,6	5635
2013	4088	70,8	1037	18,0	647	11,2	5772
2014	3918	70,9	1072	19,4	538	9,7	5528
2015	4309	74,8	980	17,0	469	8,1	5758
2016	4692	75,3	1091	17,5	444	7,1	6227

En la Tabla 4, se visualiza la distribución de egresados en los últimos años en las diferentes instituciones de la ciudad de Capiatá en forma global, es decir, sin discriminar por nivel de instrucción.

Con base en lo expuesto, se puede apreciar que en las instituciones oficiales se tuvieron mayores cantidades de egresos en comparación con los otros sectores, además se observa que el porcentaje de egresados más elevado aconteció en el año 2016, representando el 75.3% del total de egresados en ese año. Por otra parte, en las instituciones privadas se constató una mayor cantidad de egresados en el año 2009, representando el 24,3% del total de egresados y la menor cantidad en el 2015, registrándose en ese año 980 estudiantes. En lo concerniente a las instituciones subvencionadas, las cantidades de estudiantes que egresaron fueron mínimas en comparación con las demás, alcanzando valores máximos de 647 estudiantes.

Del total de egresados podría decirse que la relación de egresos en las oficiales en forma general en comparación a las privadas fue de 4 a 1, es decir por cada alumno egresado en las privadas 4 egresaban en las oficiales y, 8 alumnos egresados en las oficiales por cada alumno egresado en una institución subvencionada, en valores promedios

En la Figura 2, se visualiza una representación de datos multivariantes en un espacio bidimensional, la cual fue obtenida a partir del análisis de correspondencia con la finalidad de exponer una posible asociación entre el tipo de institución y los años evaluados en cuanto al número de egresados.

En ese contexto, teniendo en cuenta los posicionamientos de las categorías de las variables de interés, existiría una posible asociación entre los años 2009-2008-2010 y las instituciones del sector privado; los años 2015-2016 y las unidades académicas oficiales y finalmente, los años 2011-2014-2012-2013 y las privadas subvencionadas en cuanto al número de egresados. Una vez más se enfatiza que a partir de este análisis solo se expone una relación aparente entre las variables mencionadas, llevando en consideración que

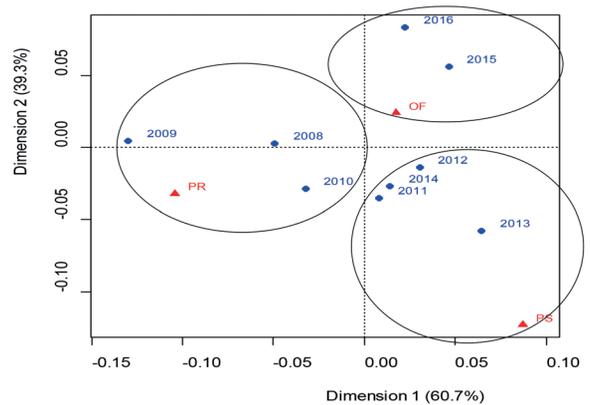


Figura 2. Biplot. Análisis de correspondencia para las variables tipo de institución y años evaluados en cuanto al número de egresos.

existen varios elementos y factores socioeconómicos y políticos que pueden intervenir fuertemente en estas asociaciones; y estos elementos o factores no son abordados profundamente en este trabajo.

Conclusión

En el periodo de tiempo considerado para el estudio, se observó que en la ciudad de Capiatá existieron mayor cantidad de instituciones educativas del sector oficial que tuvieron un crecimiento en cada año.

Mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se pudo constatar que existe una diferencia significativa entre el número de instituciones habilitadas en la ciudad de Capiatá y el sector educativo a la cual pertenecen

En cuanto a las matriculaciones, se evidenció que en ese periodo la mayor proporción se registró en el sector oficial y en segundo lugar en las instituciones privadas, siendo en su mayoría estudiantes de sexo femenino dentro del sistema educativo en el distrito y existiendo una brecha importante entre la cantidad de inscriptos en el tercer ciclo y en la educación media.

Asimismo, la mayor cantidad de egresos en ambos niveles de instrucción se registró en el sector oficial, además fueron las mujeres quienes egresan en mayor proporción en cada sector educativo de la ciudad.

Referencias

- Leivas, M. (2017). Educación secundaria, desigualdad educativa y nuevo desarrollismo en la Argentina pos 2001: estructuras que perduran y tendencias que se modifican. *Revista Mexicana de Investigación Educativa*, 22(72): 57–88.
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Version 3.5.0. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing. [Consultado: 30/04/2018] <<https://www.r-project.org>>.
- Verger, A., Bonal, X. & Zancajo, A. (2016). Recontextualización de políticas y (cuasi) mercados educativos. Un análisis de las dinámicas de demanda y oferta en Chile. *Archivos Analíticos de Políticas Educativas*, 24(27): 1–23.

Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC

Validation of two analytical methods for the determination and quantification of caffeine in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) commercial, UV-visible and HPLC

Julio César Benítez-Villalba^{1,2} , Mirtha Letizia Grau-Torales¹ 
, Oscar Daniel Cristaldo-López¹ , Arturo Iván Bogado-Fernández¹ ,
Liliana Antonia Arrúa-Martínez¹  & Nadia Mabel Villalba-Villalba¹ 

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay.

²Email: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: Se ha desarrollado y validado dos metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína presente en un producto de yerba mate comercial tradicional, este compuesto es el responsable de la acción estimulante del mate, tereré y mate cocido; la técnica analítica utilizada para la extracción del analito de la matriz fue la de sólido-líquido a reflujo con Soxhlet y posterior separación de la fase acuosa por extracción líquido-líquido obteniendo recuperaciones entre el 80% y el 84%; se determinó y cuantificó por las técnicas cromatográfica (HPLC) y espectrofotométrica (UV-Visible) teniendo en cuenta la exactitud y precisión de los métodos empleados. El límite de detección para la técnica de UV-Visible fue de 0,101 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ mientras que para el HPLC fue de 0,092 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. El límite de cuantificación en ambas técnicas fue de 0,307 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. Se ha demostrado que los dos métodos analíticos son precisos, sensibles, selectivos y exactos, con límites de detección y cuantificación suficientemente bajos para emplearlos en la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras comerciales de yerba mate. Finalizada la validación de los métodos analíticos se procedió a su aplicación analizando muestras reales de 45 g de yerba, masa estándar contenida en una guampa promedio de tereré, obteniendo como resultado para la técnica de UV-Visible 127,6 mg/45g de muestra mientras que para el HPLC 121,2 mg/45 g de muestra, obteniendo un promedio para ambas técnicas 124,4 mg en 45 gramos de muestra de yerba.

Palabras clave: yerba mate, cafeína, validación, espectrofotometría, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Abstract: Two analytical methodologies have been developed and validated for the determination and quantification of the caffeine present in a traditional commercial yerba mate product, this compound is responsible for the stimulating action of mate, tereré and cooked mate; The analytical technique used to extract the analyte from the matrix was the solid-liquid reflux with Soxhlet and subsequent separation of the aqueous phase by liquid-liquid extraction, obtaining recoveries between 80% and 84%; It was determined and quantified by chromatographic (HPLC) and spectrophotometric (UV-Visible) techniques, taking into account the accuracy and precision of the methods used. The detection limit for the UV-Visible technique was 0.101 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ while for HPLC it was 0.092 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. The limit of quantification in both techniques was 0.307 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. The two analytical methods have been shown to be precise, sensitive, selective and accurate, with limits of detection and quantification low enough to be used in the determination and quantification of caffeine in commercial samples of yerba mate. After the validation of the analytical methods, they were applied by analyzing real samples of 45 g of yerba, standard mass contained in an average tereré guampa, obtaining as a result for the UV-Visible technique 127.6 mg/45 g of sample while than for the HPLC 121.2 g of sample, obtaining an average for both techniques 124.4 mg in 45 grams of yerba sample.

Keywords: yerba mate, caffeine, validation, spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC).

Recibido: 27/04/2021 Aceptado: 18/05/2021



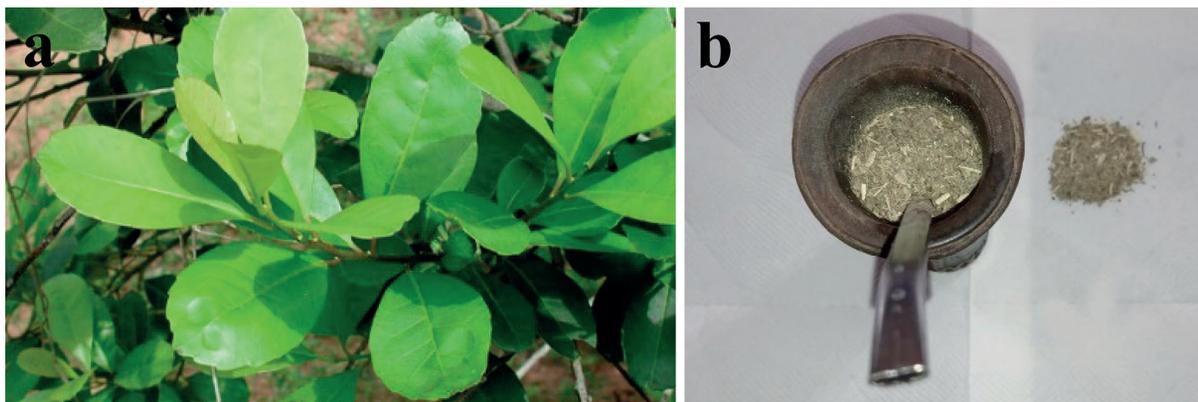


Figura 1. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **a)** Hojas de la planta. **b)** Yerba comercial.

Introducción

La yerba mate es una especie vegetal denominada *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Grigioni *et al.*, 2004), reconocida por el botánico francés Auguste François César Prouvençal de Saint-Hilaire (Gugliucci, 1996). Pertenece a la clase de las dicotiledóneas, dialipétalas corolianas, familia Aquifoliáceae, del género *Ilex* que comprende casi toda la familia (175 de las 181 especies) que se encuentran dispersas en toda Sudamérica. Sus hojas son alternas, coriáceas, de forma obovada, elípticas, con borde aserrado, resolutivo. Sus dimensiones difieren entre 5 y 15 centímetros (cm) de largo por 2 a 5 de ancho que perduran en la planta unos tres años.

En estado de plena madurez las hojas son espesas, duras y lucen como enceradas (Fig. 1a), de color verde más intenso en su cara superior que en la inferior presentando un corto pecíolo de color claro verdoso, a veces ligeramente rosado. La floración tiene lugar entre los meses de octubre a diciembre, es de tipo racimosa, en forma de falsas panojas, desarrollándose en las axilas de las hojas y en la base de las ramitas en número de 40 a 50 flores por racimo. Sus flores son pequeñas, dioicas, con cáliz y corola de constitución tetrámera. La raíz de color marrón es de tipo pivotante, con raíces secundarias que se insinúan en el mismo sentido (Zelada Cardozo & González Villalba, 2019).

El proceso de elaboración de la yerba mate comercial puede dividirse en dos grandes etapas: la primera que va desde la cosecha de yerba mate

verde, que llega hasta la obtención la yerba mate canchada y estacionada y la otra que se inicia en el molino llegando a las distintas presentaciones de los productos para consumir de diferentes maneras (Arbiser, J.L. *et al.*, 2005; Gugliucci, 1996). La yerba mate comercial (Fig. 1b) se utiliza para hacer una bebida refrescante cuando hace calor, denominada tereré que se sirve con agua fría. Servida con agua caliente la bebida es conocida como mate (Arcari *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2006). Otra bebida muy consumida en nuestro país y producida a base de yerba mate es el mate cocido que es una infusión típica de la gastronomía. Por su valor nutricional y energizante propio, y por brindar sensación de saciedad se lo suele beber en el desayuno o merienda, acompañado con un alimento sólido como pan u otros productos de confitería. Estas bebidas mencionadas se consumen tradicionalmente en las regiones centro y sur de Sudamérica, principalmente en Paraguay, Argentina, Uruguay, sur y centro oeste de Brasil, la región del Chaco de Bolivia y

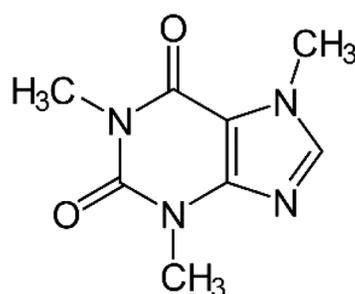


Figura 2. Estructura de la molécula de la cafeína.

el sur de Chile (Barchuk R.D. *et al.*, 1998; Zelada Cardozo & González Villalba, 2019).

Unos de los componentes más importantes que contiene la yerba mate es la cafeína (Fig. 2) que es el responsable de la acción estimulante de estas bebidas, los taninos le dan el sabor astringente, y la espuma producida al cebar principalmente en el mate es debida a las saponinas triterpénicas (matesaponinas) (Cardozo *et al.*, 2007; Isolabella *et al.*, 2010). La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, que actúa como droga estimulante y psicoactiva. Su fórmula química es $C_8H_{10}N_4O_2$, con una masa molecular de 194,19 g/mol. Es una molécula química aquiral, y, por lo tanto, no tiene enantiómeros ni tiene estereoisómeros (Bertoni *et al.*, 1992; Bracesco *et al.*, 2003).

Su nombre sistemático es 1,3,7-trimetilxantina, 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona. También es conocida como trimetilxantina, teína, mateína, guaranína, metilteobromina o metilteofilina, ya que también se obtiene por extracción de materiales vegetales como el café, té, guaraná, chocolate, yerba mate o la nuez de cola (Clifford *et al.*, 1990; Heck & Mejía, 2007; Carini *et al.*, 1998).

En esta investigación se ha desarrollado y validado dos técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate comercial, indicando la cantidad de cafeína que contiene la yerba mate por kilogramo, utilizando como medida de cantidad una guampa, que es el recipiente tradicional para el consumo del mate y tereré. En esta guampa se agregó la yerba mate a analizar, se pesó la muestra y a partir de ahí se desarrolló la técnica de extracción. En este trabajo se pretende conocer cuanta cafeína se puede extraer utilizando la técnica de extracción sólido – líquido a reflujo con un extractor de Soxhlet y posterior separación del analito de la fase acuosa por extracción líquido-líquido.

Materiales

Productos químicos y reactivos

Se han utilizados reactivos de grado analítico. El patrón de cafeína fue suministrado por Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO). La solución madre del analito fue preparada una sola vez a una concentración de $400 \mu\text{g. mL}^{-1}$ y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ en botella de vidrio oscuro. El acetoneitrilo que se utilizó para la preparación de la fase móvil fue de grado cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemania), al igual que el ácido clorhídrico y el cloroformo utilizadas en la extracción del analito. Los reactivos carbonato de sodio y sulfato de sodio empleados fueron de calidad analítica (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua destilada se obtuvo en un equipo (QUIMIS, Brasil) y posteriormente purificada en un equipo Barnstead™ MicroPure™.

Instrumentación y Software

Para la extracción de la cafeína de la matriz estudiada se utilizó un equipo de extracción Soxhlet, un embudo de decantación para la separación líquido-líquido y una variedad de materiales de vidriería. Para su cuantificación se empleó primeramente un espectrofotómetro Thermo Scientific™ UV-Visible Genesys™ 10S equipado con una lámpara de Xenón de alta intensidad y una geometría óptica de doble haz utilizando un software VISIONlite™ (versión 5.0).

Las muestras se colocaron en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y 2,5 mL de volumen útil con adaptador para porta cubetas. Posteriormente los ensayos se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC Shimadzu (Japón) modelo DGU-20A5 E con una bomba cuaternaria, inyector automático y detector de fotodiodos PDA y/o de fluorescencia FLD. La separación cromatográfica del analito se obtuvo utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm x 4.6 mm; 5 μm).

El control del instrumento, la detección del pico y la integración del mismo se llevaron a cabo utilizando el software LCsolution.exe (versión 1.0) (Shimadzu, Japón). Para las pesadas de los reactivos y las muestras se empleó una balanza analítica RADWAG 310.R2 (Polonia). Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU., 2000) y Microsoft® Office 2010.

Materiales y métodos

Preparación de las soluciones patrones

Primeramente, se ha preparado una disolución patrón de cafeína, a partir de 40 mg de cafeína previamente secada que se disolvieron en un matraz aforado de 100 mL en agua destilada ($400 \mu\text{g. mL}^{-1}$). Seguidamente se traspasaron con ayuda de una pipeta aforada 10 mL de esta disolución a otro matraz aforado de 100 mL y se llevó a enrase con agua destilada ($40 \mu\text{g. mL}^{-1}$). A partir de esta última disolución patrón de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$, se prepararon 5 disoluciones más diluidas de concentraciones de 4, 8, 16, 24, y 32 μg de cafeína por cada mL de solución:

(5 mL de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 2 mL de HCl 0,01 M) en 50 mL con agua destilada ($4 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(5 mL de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL 0,01 M) en 25 mL con agua destilada ($8 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(10 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml con agua destilada ($16 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(15 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml de agua destilada ($24 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

(20 ml de solución patrón de cafeína de $40 \mu\text{g. mL}^{-1}$ + 1 mL HCl 0,01 M) en 25 ml de agua destilada ($32 \mu\text{g. mL}^{-1}$).

Extracción de la muestra

Las muestras de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) fueron adquiridas de un centro comercial de la ciudad de Asunción, dichas muestras fueron de un producto tradicional sin aditivos. Se analizaron por triplicado; se pesaron 45 gramos de yerba mate comercial que es el peso aproximado que contiene una guampa promedio de tereré (se utilizó una guampa para medir el peso aproximado y por triplicado), y se llevó a reflujo con 400 mL de agua durante 15 minutos en un equipo de reflujo Soxhlet. Seguidamente, se filtró la solución en caliente y se añadió

5 gramos de Na_2CO_3 hasta la total disolución. Se dejó enfriar y se agregaron 30 mL de cloroformo que se extrajeron agitando suavemente durante 3 a 5 minutos en un embudo de decantación y se repitió la operación una vez más.

Después de la separación de las dos fases, se añadieron pequeñas cantidades de Na_2SO_4 para absorber el agua, se filtró la fase clorofórmica haciéndola pasar por lana de vidrio y posteriormente por filtración al vacío con papel de filtro en un embudo de Büchner, el filtrado se colocó en un vaso de precipitado y se dejó evaporar hasta sequedad. Una vez eliminado el cloroformo, se añadió al mismo vaso 50 mL de agua destilada y se agitó bien hasta disolver totalmente. Posteriormente se trasvaso el líquido disuelto a un matraz aforado de 100 mL y se llevó a enrase. Finalmente, se tomaron 1 mL de esta última solución, se añadió 4 mL de la solución de ácido clorhídrico 0,01 M y se enrasó a 100 mL con agua destilada. Para los ensayos en el UV-visible las muestras y patrones fueron utilizadas de manera directa mientras que para el HPLC fueron filtradas previamente por filtro de membrana de Nylon (Poliamida), Whatman, $0.45 \mu\text{m}$ utilizando una jeringa.

Medidas espectroscópicas, UV-Visible

Primeramente, se realizó un barrido espectral de 200 a 400 nm teniendo en cuenta las características químicas de la molécula, con una solución patrón de $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de cafeína, descrita su preparación en el apartado de Preparación de las soluciones patrones, y una vez obtenida la longitud de onda de absorbancia máxima para el analito se procedió a la validación y su cuantificación. En todo momento se empleó un blanco de disolvente para realizar la corrección de la línea de base.

Condiciones cromatográficas, HPLC

Las condiciones cromatográficas del HPLC fueron optimizadas. Para la optimización del método cromatográfico se empleó una disolución acuosa que contenía la cafeína a una concentración de $32 \mu\text{g L}^{-1}$. Dadas las características del analito, en el desarrollo de la metodología propuesta se ha empleado la cromatografía en fase reversa (fase estacionaria menos

polar que la fase móvil). Se seleccionó de acuerdo a las características fisicoquímicas del analito una columna con relleno C_{18} ZORBAX Eclipse XDB (150 mm x 4.6 mm; 5 μ m) de dimensiones y tamaño de partícula. Se estudiaron las principales variables que afectan a la separación cromatográfica y la intensidad de la señal, se evaluaron diferentes fases móviles de acuerdo a la naturaleza del analito, se ensayaron la mezcla Agua: Acetonitrilo a diferentes proporciones (70:30), (80:20) y (90:10). También se evaluó el efecto del caudal, la temperatura de la columna y volúmenes de inyección. Se ensayaron velocidades de flujo de 0,5 a 1,5 mL.min⁻¹. Se ensayaron temperaturas de la columna de 30 °C a 50 °C. Finalmente se evaluó el volumen de inyección desde 5 a 30 μ L.

Validación de los métodos analíticos de cuantificación

Los parámetros de validación evaluados fueron: linealidad, límites de detección y cuantificación, rango dinámico lineal, sensibilidad analítica y exactitud del método expresada en términos de precisión y veracidad (USP 29, 2005). Los requisitos de la validación del método analítico se establecieron de la siguiente manera: (a) Linealidad, el coeficiente de determinación (R^2) debe ser igual o mayor que 0,999 y la desviación residual máxima debe ser menor al 25%. (b) La precisión, expresada como desviación estándar relativa DER (precisión entre días) debe ser \leq 30%. (c), la veracidad, expresada como recuperación media, debe estar en el rango 70 a 120%. (d) El límite de cuantificación (LC) debe cumplir con los requisitos (b) y (c). Estos requisitos se ajustan a la Decisión 2002/657 / CE de la Comisión de la Comunidad Europea (14).

Linealidad

Para el establecimiento de esta función de calibrado, se prepararon patrones conteniendo cantidades crecientes del analito correspondiente 4, 8, 16, 24, 32 μ g. mL⁻¹ (3 réplicas por cada nivel). Se realizó la estimación de la ecuación de la recta, bajo condiciones de reproducibilidad y se determinó el valor del coeficiente de correlación lineal que considera

un criterio de aceptabilidad igual o superior a $r \geq 0,999$. La ecuación que se utilizó para determinar la linealidad del método es la siguiente, $y = mx+b$, donde y = Área que representa la señal analítica; x = concentración del estándar de la cafeína (μ g. mL⁻¹), m = pendiente de la recta, b = ordenada al origen (Analytical Methods Committee, 1994; IUPAC, 1978; Dean & Dixon, 1951; Blanco & Cela, 1994).

Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LD) es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. Para la determinación de dicho parámetro se ha calculado en función de la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra en blanco (S_o) (Currie, 1999). Primeramente, para estimar S_o se recurrió a la ecuación escrita del modo siguiente:

$$S_o = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}};$$

y partir de ahí se calculó el límite de detección que es el resultado de la multiplicación de S_o por 3. Mientras que el límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Que se tomó como la concentración correspondiente a 10 veces la desviación estándar (en unidades de concentración) del blanco (S_o por 10). (González *et al.*, 1996; Cuadros Rodríguez *et al.*, 1993)

Rango Dinámico Lineal.

El Rango Dinámico Lineal (RDL) fue establecida como el intervalo de concentraciones que comprende entre el límite de cuantificación de los métodos y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado a los métodos estudiados (IUPAC, 1978).

Sensibilidad Analítica.

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de la calibración mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibración (González *et al.*, 1996). Para este trabajo

de investigación se propuso que la sensibilidad analítica ($S_{\text{Analítica}}$) está definida por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (b), según la ecuación $S_{\text{Analítica}} = S_{y/x} / b$ (Mandel & Stiehler, 1954).

Exactitud del Método: Precisión y Veracidad.

Para establecer la exactitud de los métodos propuestos, se han estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación con muestras dopadas y su precisión en términos de variabilidad inter e intra-día. Para el estudio de **exactitud del método, en términos de veracidad**, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación a tres niveles de concentración (16, 24, 32 $\mu\text{g. mL}^{-1}$).

Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento operatorio descrito a lo largo del artículo y la concentración en la muestra se determinó por interpolación a la curva de calibración dentro del rango dinámico lineal. Los valores de recuperación se obtuvieron por comparación con las cantidades de analito conocidas que fueron añadidas previamente a las muestras en blanco (los disolventes utilizados para la extracción durante el reflujo fueron dopadas con las concentraciones mencionadas y se realizó todo el procedimiento de extracción) (Benítez-Villalba *et al*, 2018)

Para evaluar la **exactitud del método en términos de precisión**, se estudió la repetibilidad (precisión “intra-día”) y la reproducibilidad (precisión “inter-día”). Para ello, se realizaron diversas réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, durante un mismo día y durante tres días consecutivos. Cada muestra dopada en blanco fue extraída y analizada por triplicada, es decir tres réplicas de cada punto en el mismo día para evaluar la variabilidad “intra-día” y se repitió en tres días consecutivos para evaluar la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) (ISO/TC 69/SC 6, 1994a & 1994b; Commission of the European Communities, 2002; Massart *et al.*, 1997).

Aplicación de los métodos analíticos (identificación y cuantificación)

Una vez finalizada la validación de los métodos

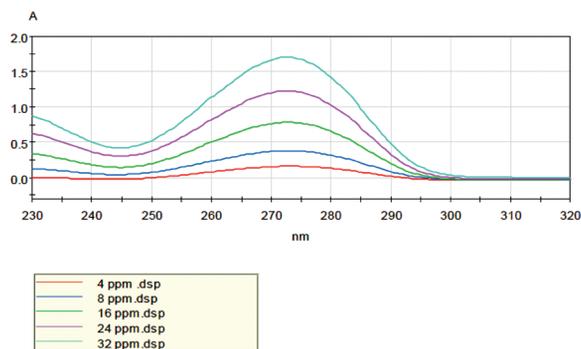


Figura 3. Espectros de absorción obtenida de la linealidad empleando la técnica de análisis espectrofotométrico de UV-visible.

analíticos se procedió a la determinación y cuantificación de la cafeína en las muestras de yerba mate utilizando la curva de calibrado descrito en la metodología para las dos técnicas analíticas en estudio, el espectrofotométrico y cromatográfico. Primeramente, las muestras fueron cuantificadas con la técnica espectrofotométrica (UV-visible). Subsiguientemente se han cuantificadas las mismas muestras en el cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) y posteriormente se promediaron los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Resultados y discusión

UV-Visible

Para el método espectrofotométrico UV-visible se determinó la longitud de onda de máxima absorción del analito que fue de 273 nm. Este valor de la longitud de onda también fue utilizado para la determinación y cuantificación de cafeína por HPLC. En la Fig. 3 se representan los espectros de absorción de las soluciones patrones de cafeína en agua destilada.

HPLC

De las condiciones cromatográficas que fueron optimizadas en el HPLC la fase móvil tuvo un óptimo que fue el **Agua: Acetonitrilo** en una proporción **(80:20)** por dar una mejor señal analítica; el óptimo para la velocidad de flujo fue de **1 mL.min⁻¹** que mejoró significativamente la resolución, la forma del pico, la intensidad de respuesta y el tiempo de

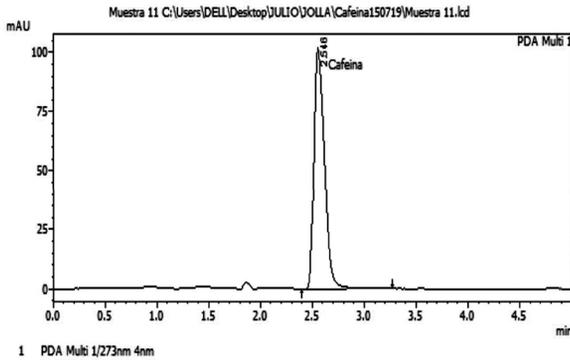


Figura 4. Cromatograma obtenido para la muestra de yerba mate comercial empleando la técnica de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.

retención; la temperatura óptima de la columna fue de **30 °C** que mostró una buena forma de pico y el volumen de inyección óptimo fue de **20 µL** cuyos resultados en el pico del cromatograma de una muestra de yerba mate comercial se puede observar en la Fig. 4.

Validación de métodos analíticos

A continuación, se detallan los resultados obtenidos

de la validación de los métodos analíticos para las dos técnicas analíticas en estudio para la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras de yerba mate comercial. Se ha puesto a punto y validado dos métodos analíticos, que incluye una etapa de extracción del analito de la matriz, seguida de la detección y cuantificación por ambas técnicas analíticas, la espectrofotometría UV-Visible y cromatografía de líquido de alta eficiencia HPLC.

En la Tabla 1 se recogen los parámetros de calibración de las dos técnicas analíticas en estudio, donde R^2 (%) Coeficiente de correlación, n = puntos de calibración, b = pendiente, S_b = desviación estándar de la pendiente, a = intercepto, S_a = desviación estándar del intercepto, $S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, % p/lof = valor P de prueba de falta de ajuste, LD = límite de detección, LC = Límite de cuantificación, RDL = rango dinámico lineal (Mandel & Stiehler, 1954).

Linealidad: para ambas técnicas analíticas se ha demostrado ser significativos con $R^2= 99,999\%$. Tanto los interceptos como las pendientes son significativamente diferentes de cero. Las gráficas de linealidad de los valores observados y ajustados por

Tabla 1. Parámetros de calibración en las técnicas analíticas espectrofotométrico y cromatográfico.

Parámetros	Linealidad	
	Espectrofotométrico	Cromatográfico
Ecuación de la recta	$Y = 0,051721 * X + 0,0114695$	$Y = 60452,2 * X - 5124,75$
R^2 (%)	99,999	99,999
n	15	15
b ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,052	60452,2
s_b	$4,6E^{-05}$	48,471
a	0,011	5124,750
s_a	0,001	953,773
$s_{y/x}$	0,002	1923,250
% p/lof	0,000	0,124
LD ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,101	0,092
LC ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,307	0,307
Sensibilidad	0,023	0,032
RDL ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0,307 - 32	0,307 - 32

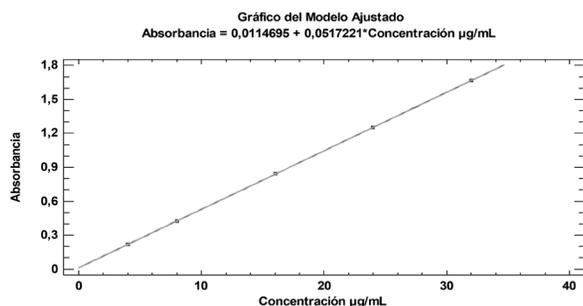


Figura 5. Regresión lineal de la curva de calibrado para la técnica analítica de UV-Visible.

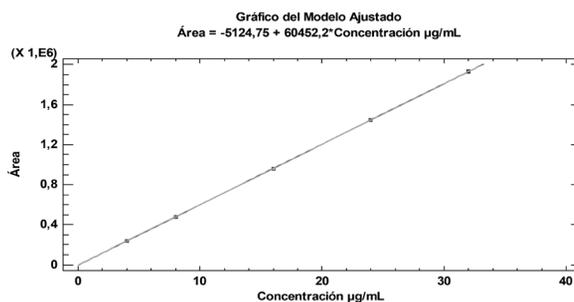


Figura 6. Regresión lineal de la curva de calibrado para la técnica analítica de HPLC.

mínimos cuadrados se muestran en la Fig. 5 (UV-Visible) y Fig. 6 (HPLC). Estos métodos analíticos de acuerdo a los resultados obtenidos han demostrado ser altamente sensibles en la detección de la cafeína, con **límites de detección (LD)** de $0,101 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para la técnica espectrofotométrica (UV-Visible) y $0,092 \mu\text{g. mL}^{-1}$ para la técnica cromatográfica HPLC; mientras que los **límites de cuantificación (LC)** para ambas técnicas fue de $0,307 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

El Rango Dinámico Lineal (RDL): para ambas técnicas analíticas el RDL están comprendidas entre el límite de cuantificación $0,307 \mu\text{g. mL}^{-1}$ y el límite superior de la concentración que se aplicó a los dos métodos $32 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Sensibilidad Analítica: La sensibilidad del método analítico de la calibración que se ha calculado a partir de la regresión lineal para ambos métodos analíticos, fueron respectivamente de 0,023 para UV-visible y 0,032 para el HPLC.

Exactitud del Método: Los estudios de re-

cuperación se realizaron para las dos técnicas analíticas validadas, previa extracción del analito en el disolvente fortificada a tres niveles de concentración ($16, 24, 32 \mu\text{g. mL}^{-1}$), obteniendo para la técnica analítica de UV-Visible recuperaciones de inter e intra día entre 80% y 84%, mientras que para la técnica por HPLC las recuperaciones inter e intra día se encontraron entre 81 y 84%, lo que nos lleva a deducir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores obtenidos en ambas técnicas analítica la DER fueron menor 1% en todos los casos.

Estos datos se encuentran dentro de límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15 % en general, y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se puede concluir que el método propuesto de la técnica de extracción a reflujo con soxhlet y posterior

Tabla 2. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de veracidad del método utilizando la técnica de extracción liquido-liquido.

Ensayo Intra-día						
Analito Cafeína	Dopado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
UV-Visible	16	13,0028	0,0193	81,2675	0,1487	3
	24	19,5120	0,0112	81,2998	0,0572	3
	32	25,6344	0,0403	80,1076	0,1570	3
HPLC	16	13,1418	0,0057	82,1365	0,0435	3
	24	20,2089	0,0076	84,2038	0,0375	3
	32	26,0293	0,0685	81,3414	0,2629	3

Tabla 3. Ensayos de recuperación para la determinación de la exactitud en precisión de veracidad del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Ensayo Inter-día						
Analito Cafeína	Dopado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	Observado $\mu\text{g. mL}^{-1}$	DE	Recuperación %	DER %	n
UV-Visible	16	13,1575	0,0199	82,2342	0,1469	3
	24	20,2402	0,0914	84,3342	0,4514	3
	32	26,3859	0,4514	82,4559	0,7154	3
HPLC	16	13,2301	0,0089	82,6879	0,0673	3
	24	19,4921	0,0945	81,2171	0,4848	3
	32	26,6358	0,0278	83,2369	0,1044	3

separación del analito por líquido-líquido genera resultados próximos entre sí, cumpliendo de este modo los requisitos de precisión (Cuadros Rodríguez *et al.*, 1993). Se trata por tanto de un método veraz, preciso y por tanto exacto. En las Tablas 2 y 3 se muestran los valores de recuperación obtenidos para ambas técnicas analíticas.

Aplicación de los métodos analíticos a muestras reales

Finalizado el desarrollo y validación de los métodos analíticos se procedió a la determinación y cuantificación de la cafeína en la extracción de las muestras de yerba mate que fueron procesadas, utilizando la curva de calibrado descrito en la metodología para ambas técnicas analíticas.

Los resultados obtenidos de la extracción de cafeína en yerba mate analizada para la técnica analítica por espectrofotometría (UV-visible) fue de 127,6 mg/45g de muestra mientras que para la técnica cromatográfica (HPLC) se ha obtenido como resultado 121,2 mg/45g de muestra promediando

así los resultados para ambas técnicas de 124,4 mg de cafeína por cada 45 gramos de yerba mate. En la Tabla 4 podemos observar los resultados obtenidos.

Conclusión

Este trabajo de investigación propone la validación de dos metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de la cafeína en muestras de yerba mate comercial, la espectroscopia UV-visible y la cromatografía de líquidos HPLC, para ello se ha utilizado la técnica de extracción sólido-líquido a reflujo con Soxhlet y posterior separación de las fases acuosas por extracción líquido-líquido. Esta técnica de extracción podemos considerar una técnica de extracción óptima debido a un buen rendimiento de extracción obtenido y de fácil operación.

La cafeína es el componente más importante que contiene esta matriz que es el responsable de la acción estimulante en las bebidas que son preparadas a base de ella. Las técnicas analíticas UV-visible y el HPLC empleadas para el análisis de los extractos obtenidos a partir de las muestras mostraron una

Tabla 4. Determinación de la concentración de la cafeína en muestras de yerba mate en las técnicas analíticas UV-visible y por HPLC.

Concentración de la cafeína en muestras de yerba mate mg/45 g de muestra					
Analito	UV-Visible	Promedio UV-Visible	HPLC	Promedio HPLC	Promedio ambos métodos
Cafeína	127,9	127,6	118,1	121,2	124,4
	126,6		125,7		
	129,3		119,8		

alta sensibilidad analítica y precisión, tiempos de análisis corto y el alto grado de automatización. Se ha podido estimar que en 45 gramos de yerba mate comercial contiene aproximadamente 124,4 mg de cafeína.

La contribución de este trabajo de investigación es el aporte de las metodologías analíticas que ofrecen una importante innovación científica, ya que en la actualidad no existe ningún trabajo publicado sobre el análisis de este analito en esta matriz en nuestro país. Estas técnicas validadas podrán ser utilizada en futuras investigaciones en otras matrices que contengan este analito.

Literatura citada

- Analytical Methods Committee. (1994). Is my calibration linear? *Analyst*, 119: 2363–2366.
- Arbiser, J.L., Li, X.C., Hossain, C.F., Nagle, D.G., Smith, D.M. & Miller, P. (2005). Naturally occurring proteasome inhibitors from mate tea (*Ilex paraguayensis*) serve as models for topical proteasome inhibitors. *Journal of Investigative Dermatology*, 125(2): 207–212.
- Arcari, D.P., Bartchewsky, W., Dos Santos, T.W., Oliveira, K.A., Funck, A. & Pedrazzoli, J. (2009). Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*, 17(12): 2127–2133.
- Bastos, D.H.M., Ishimoto, E.Y., Marques, M.O.M., Ferri, A.F., & Torres, E.A.F.S. (2006). Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7): 538–543.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N. M. & Vílchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63.
- Bertoni, M.H., Prat Kircun, S.D., Kanzig R.G. & Cattaneo Y.P. (1992). Hojas frescas de *Ilex paraguariensis* S. Hill. III. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 80: 493–501.
- Blanco, M. & Cela, R. (1994). *Avances en Quimiometría Práctica*. Santiago de Compostela: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico - Universidad de Santiago de Compostela. 503 pp.
- Bracesco, N., Dell, M., Rocha, A., Behtash, S., Menini, T., Gugliucci, A. & Nunes, E. (2003). Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 9(3): 379–387.
- Cardozo, E.L., Ferrarese-Filho, O., Filho, L.C., Ferrarese, M.D.L.L., Donaduzzi, C.M. & Sturion, J.A. (2007). Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(7): 553–558.
- Carini, M., Facino, R.M., Aldini, G., Calloni, M. & Colombo, L. (1998). Characterization of phenolic antioxidants from maté (*Ilex paraguayensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(22): 1813–1819.
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1990). Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. *Food Chemistry*, 35(1): 13–21.
- Commission of the European Communities. (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044). *Official Journal of the European Communities*, 45(L 221): 2–38.
- Cuadros Rodríguez, L., García Campana, A.M., Jimenez Linares, C. & Roman Ceba, M.

- (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6): 1243–1258.
- Currie, L.A. (1999). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*, 391(2): 105–126.
- Dean, R.B. & Dixon, W.J. (1951). Simplified statistics for small numbers of observations. *Analytical Chemistry*, 23(4): 636–638.
- González, A., Cuadros, L., Alonso, E. & Vilchez, J.L. (1996). Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726(1-2): 133–139.
- Grigioni, G., Carduza, F., Irurueta, M. & Pensel, N. (2004). Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(5): 427–432.
- Gugliucci, A. (1996). Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224(2): 338–344.
- Heck, C.I. & Mejía E.G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9): R138–R151.
- Isolabella, S., Cogoi, L., Lopez, P., Anesini, C., Ferraro, G. & Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122(3): 695–699.
- IUPAC. (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis—II: data interpretation. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy*, 33: 241–245.
- Mandel, J. & Stiehler, R.D. (1954). Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 53(3): 155–159.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers-Verbeke, J. (eds.). (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. 867 pp.
- ISO/TC 69/SC 6. (1994a). *ISO 5725-1:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization. 17 pp.
- ISO/TC 69/SC 6. (1994b). *ISO 5725-2:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Geneva: International Organization for Standardization. 42 pp.
- USP 29. (2005). *General Chapter 1225: Validation of compendial methods*. United States Pharmacopeia. [Consultado: 12/08/2020]. < http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1225.html >.
- Zelada Cardozo, N.J. & González Villalba, J. (2019). *Guía técnica: cultivo de yerba mate*. San Lorenzo: Facultad de Ciencias Agrarias - UNA. 60 pp.

Fe de Erratas

El siguiente resumen correspondería a la sección de posters presentados en el XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, llevado a cabo en el año 2019. El resumen fue omitido involuntariamente de la publicación original “Memorias del XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental”, que fuera presentada como Suplemento 1 del Volumen 11 del año 2020. Dicho resumen faltante debe ir como sigue:

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Aloysia polystachya* (Griseb.) MOLDENKE ETHANOLIC EXTRACT USING THE 1,1-DIPHENYL-2-PICRYL-HYDRAZYL FREE RADICAL SCAVENGING METHOD (DPPH•)

Dávalos, L¹, Gayozo, E², Martínez, M³, Ocampos, R², Ucedo, A¹, Gómez, L¹, Ferreira, F⁴

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

³Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Área de Química Orgánica de los Productos Naturales-LAREV, San Lorenzo, Paraguay.

⁴Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumental, San Lorenzo, Paraguay.

Corresponding author: davaloslucy1@gmail.com

Aloysia polystachya (Burrito) is an aromatic plant widely used in the Paraguayan population as a stomach digestive, antidepressant, anxiolytic, and carminative. Despite these properties, its antioxidant activity is little known yet. The mainly objective of this research was to determine the antioxidant activity of *A. polystachya* ethanolic extract by the capture of free radicals of DPPH•. For this, the *A. polystachya* leaves extract was made using ethanol 98° g.l as solvent, preparing 16, 32, 48, 64, 80 µg respectively for the assay; ascorbic acid (8, 12, 16, 20, 24 µg) was used as an antioxidant reference compound. The measuring was preformed using spectrophotometer at 517 nm wavelength. Data obtained showed antioxidant activities equal to those of the reference standard.; ethanolic extract obtained an $IC_{50} = 22.2 \pm 0.5 \mu g$ ($R^2 = 0,998$, $r = 0,999$, $P < 0,05$) and ascorbic acid an $IC_{50} = 22.1 \pm 0.03 \mu g$ ($R^2 = 0,998$, $r = 0,999$, $P < 0,05$). These results indicate that the ethanolic extract of *A. polystachya* leaves, in addition to having digestive activities, is also a promising antioxidant, thus increasing its value as a medicinal source.

Keywords: Burrito, leaves, free radical, antioxidant.

Recibido: 15/04/2021 Aceptado: 15/04/2021



2078-399X/2021 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

GUÍA PARA LOS AUTORES

Reportes Científicos de la FACEN, es una revista de acceso libre y gratuito y es la publicación científica oficial de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción. Es emitida semestralmente y publica **Artículos originales, Artículos de revisión, Tópicos actuales, Reportes de casos, Comunicaciones cortas y Correspondencia**, en las áreas de Biología, Química, Física, Matemática Pura, Matemática Estadística, Geología, Biotecnología y Tecnología de Producción. Los principales criterios para la selección de los artículos son la solidez científica y la originalidad del tema. Los trabajos y opiniones publicados en la revista son de exclusiva responsabilidad de los autores. El idioma oficial de la revista es el español, pero se aceptan trabajos en inglés y en portugués. No existe costo de publicación para los autores.

El trabajo será enviado en formato electrónico a la dirección email de la revista (reportescientificos@gmail.com), consistiendo en archivos de texto, archivos de planilla electrónica y archivos de imagen. **El archivo principal de texto debe contener únicamente texto, sin ilustraciones ni tablas embebidas**, sino únicamente las respectivas citas a las mismas en el texto (numeradas secuencialmente). **Las tablas e ilustraciones deberán ser remitidos en formato digital en archivos independientes**. Los respectivos archivos deberán indicar en su nombre a qué número de tabla o ilustración corresponden.

El archivo de texto debe ser producido con Microsoft Word® u otro editor de texto perfectamente compatible. El texto deberá estar en letra Times New Roman, tamaño 11. Todo trabajo llevará en su primera página los siguientes elementos: **a) el Título** en español e inglés, **b) la lista de Autores** con nombre y apellido, **c) la Afiliación** laboral de cada autor, **d) un Resumen** de un máximo de 250 palabras en español, **e) un máximo de 7 Palabras clave** en español, **f) un Abstract** en inglés, correspondiente a la versión en español y **g) un máximo de 7 Key words** en inglés, correspondientes a la versión en español. **En caso de trabajos en Portugués** se añaden Título, Resumen y Palavras chave en dicho idioma. El resumen sólo podrá obviarse en el caso de Editoriales, Comunicaciones cortas y Correspondencias presentadas como tales. El cuerpo principal del texto podrá contener, según el contexto del trabajo, las secciones de **1) Introducción, 2) Materiales y métodos (o sólo uno de ellos de acuerdo al caso), 3) Resultados, 4) Discusión, 5) Conclusión, 6) Agradecimientos y 7) Literatura citada**. Tales secciones podrán sufrir fusión o no existir, de acuerdo a la metodología de trabajo o enfoque dados por el autor, así como al tipo de escrito (Artículo original, Comunicación corta, etc.) como haya sido presentado por autor o como lo decida el comité editorial. **Los pies de figuras y tablas** deberán ir al final del texto, a continuación de la sección de literatura citada.

Las citas bibliográficas deberán seguir las normas APA. Según estas normas, el año va entre paréntesis y se destacan el autor y año en las citas en texto: “Según González (1999)” o “El método es reciente (González, 1999)”. Para la lista en la sección de Literatura citada la secuencia lógica y formato es de “Autor. (Año). Título. Publicador, Volumen(Número): Páginas.”, poniéndose siempre primero el apellido de cada autor, seguido de sus correspondientes iniciales y separados por comas, con el último autor separado por un signo de ampersand. Se aplicará cursivas respectivamente en el título si se trata de un libro o tesis, o en el publicador si se trata de un artículo. Se ilustra en los siguientes ejemplos:

González, A.P. (1999). *Métodos de análisis crítico*. Asunción: Editorial Nueva. 120 pp.

González, A.P., Martínez, G.T. & Robledo, H.A. (1999). Análisis de la producción científica del país. *Revista de Filosofía Científica*, 45(2): 56-61.

Las tablas y cuadros deberán presentarse en archivos de Microsoft Excell® u otro programa perfectamente compatible, aunque en muchos casos se aceptan también tablas embebidas en archivo de Microsoft Word®, siempre que sea en archivo separado del de texto. **Las ilustraciones (graficos, imágenes, fotos, dibujos, mapas, esquemas o láminas completas) deberán presentarse cada una en un archivo aparte**, en formato JPG o TIF, generados en Adobe Photoshop u otro programa de procesamiento de imágenes. Deberá cuidarse que posean buen enfoque, claridad y contraste, que tengan una resolución mínima de 300 dpi y máxima de 1000 dpi y teniendo en cuenta que su anchura máxima en la revista será de 16 cm.

El proceso de evaluación incluye una primera revisión por el Comité Editorial para determinar si el artículo corresponde a la línea editorial y si cumple con los criterios generales de publicación. Una vez que el artículo se considere pertinente, se someterá a por lo menos dos revisores especialistas en el tema, de cuya opinión depende la aceptación definitiva del artículo. Si existiera una contradicción en la opinión de ambos especialistas, se someterá al Comité editorial o en caso contrario se solicitará una tercera opinión de un tercer especialista. El dictamen podrá ser aceptado, rechazado o condicionado, que será comunicado por escrito al autor principal en un plazo no mayor de tres meses de la recepción del material original. Si el dictamen es condicionado, el autor deberá remitir la nueva versión impresa y en formato digital en el plazo que se le indique que no podrá exceder de los 30 días posteriores a la recepción de la comunicación.

REPORTES CIENTÍFICOS

D E L A F A C E N

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Rep. cient. FACEN	San Lorenzo (Paraguay)	Vol. 12, Nº 1	enero-junio de 2021	ISSN 2078-399X (versión impresa) ISSN 2222-145X (versión online)
-------------------	------------------------	------------------	---------------------	---

ARTÍCULOS ORIGINALES

- 3-9 **Tomás López, Yadira Parra, Danilo Fernández, Sandra Álvarez, Camila Ayala, Matías Policani & Gabriela Ulke.** Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por bacterias ácido lácticas aisladas de leche cruda y queso Paraguayo.
- 10-20 **Rafael Fugarazzo, Moisés Gadea, Maximiliano Caballero, Marcelo Souza de Assumpção & Vincent Figueres.** Las Zonas Sísmicas en Paraguay.
- 21-31 **Yolanda Amelia López Benítez, Leandro Marcio Moreira & Gilberto Antonio Benítez Rodas.** Bacterias asociadas a *Sarcocornia neei* (Lag.) con aparente actividad hidrolítica y control biológico provenientes del chaco seco paraguayo.
- 32-41 **Shaun Patrick McGahan, Tomás López, Pablo Heleno Sezerino, Francisco Ferreira, Leonida Medina & Rodrigo Mohedano.** Evaluación del uso de *Landoltia punctata* a escala mesocosmos en el tratamiento complementario de aguas residuales proveniente de sistema RBC a escala laboratorio.
- 42-47 **Liz Paola Lugo, Liz Mariela Centurión & Roberto Martínez-López.** Determinación del movimiento escolar en las instituciones educativas de la ciudad de Capiatá, Departamento Central.
- 48-58 **Julio César Benítez-Villalba, Mirtha Letizia Grau-Torales, Oscar Daniel Cristaldo-López, Arturo Iván Bogado-Fernández, Liliana Antonia Arrúa-Martínez & Nadia Mabel Villalba-Villalba.** Validación de dos métodos analíticos para la determinación y cuantificación de la cafeína en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) comercial, UV-visible y HPLC.

FE DE ERRATAS

- 59 Fe de Erratas de la publicación especial "Memorias del XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental".

