



### **ACTA DE TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Los suscritos Miembros para integrar el Jurado examinador del Trabajo Especial de Grado de la Br. **Mayra Graciela Rengifo Carrillo**, titular de la cédula de identidad N° V-18.125.178, estudiante de la Facultad de Ciencias, especialidad Química, reunidos el día miércoles dieciocho (18) de junio de dos mil ocho (2008), en el Departamento de Química, hacemos constar que:

- a) Hemos leído y discutido el trabajo titulado:  
**"Estudio preliminar en la exploración de la cinética de degradación de fenilefrina en formas farmacéuticas sólidas"**
  
- b) En el día de hoy la candidata a Licenciada ha hecho Defensa Pública de su trabajo sobre el cual la hemos examinado.

Por ello, declaramos en Mérida, a los dieciocho (18) días del mes de junio de dos mil ocho (2008).

---

**APROBADO CON LA CALIFICACIÓN DE DIECIOCHO(18) PUNTOS  
RECOMENDADO PARA SU PUBLICACIÓN**

---

FIRMA DEL JURADO

  
Carlos Rondón

  
Francisco López

  
Rafael Almeida  
**TUTOR**

Este trabajo fue realizado bajo la Tutoría Externa del **Dr. Jorge Zambrano**, en las instalaciones de la empresa Procter & Gamble Baruta Edo. Miranda.

**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN**  
Departamento de Química

Núcleo "Pedro Bincón Gutiérrez" Edificio "A", Facultad de Ciencias Mérida 5101 - República Bolivariana de Venezuela  
Teléfono: (58 - 274) 240 1361 / 240 1360 - Fax 240 1360 - Web: [www.ciencias.ula.ve](http://www.ciencias.ula.ve) Correo\_e: [dqi@ula.ve](mailto:dqi@ula.ve)



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ANÁLISIS QUÍMICO,  
INDUSTRIAL Y AGROPECUARIO

**AJUSTE Y VALIDACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE  
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULASA EN  
SUELOS A PARTIR DE LA VALORACIÓN  
ESPECTROFOTOMÉTRICA DE AZÚCARES REDUCTORES**

*Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad de los  
Andes como requisito parcial para optar al Título de Licenciada en Química*

**Realizado por Br: María Albarrán  
TUTOR: Dr. Guillermo Bianchi  
COTUTOR: Dr. Froilán Contreras**

**Mérida – Venezuela  
Junio, 2008**

## INDICE GENERAL

	Pag.
Índice General	ii
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	vi
Resumen	vii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I.1 El suelo.</b>	1
<b>I.1.2 Indicadores de calidad de un suelo.</b>	1
<b>I.2 Enzimas.</b>	2
<b>I.2.1 Cofactor.</b>	3
<b>I.2.2 Clasificación de las enzimas.</b>	3
<b>I.2.3 Localización de las enzimas en el suelo</b>	4
<b>I.3 Factores del medio que influyen sobre la actividad enzimática.</b>	5
<b>I.3.1 pH.</b>	5
<b>I.3.2 Temperatura.</b>	6
<b>I.4 Celulasas</b>	6
<b>I.4.1 Celulosa</b>	7
<b>I.4.2 Degradación de la celulosa.</b>	7
<b>I.4.3 Complejo enzimático de la celulosa.</b>	7
<b>I.5 Medida de la actividad de la celulasa.</b>	9
<b>I.6 Procedimientos fotométricos más empleados para la cuantificación de la actividad celulasa a través de la glucosa liberada.</b>	9
<b>I.7 Selección del procedimiento a emplear en la cuantificación de la glucosa liberada.</b>	12
<b>II. Atributos del procedimiento seleccionado a ser evaluados para su Validación.</b>	12
<b>III. HIPÓTESIS</b>	15
<b>IV. OBJETIVO DEL TRABAJO</b>	15
<b>IV.1 PASOS A SEGUIR PARA SU LOGRO</b>	15
<b>V. PLAN DE TRABAJO</b>	16
<b>V.1 INSTRUMENTOS</b>	16
<b>V.2 REACTIVOS</b>	16
<b>VI. Principios del procedimiento empleado.</b>	17
<b>VII. RESULTADOS</b>	18
<b>VII.1 Curva de calibración de glucosa.</b>	18
<b>VII.2 Validación.</b>	19
<b>VII.3 Curva de calibración de glucosa en presencia de suelo.</b>	21
<b>VII.4 Efecto de matriz.</b>	25
<b>VII.5 Actividad enzimática celulasa en las distintas fracciones granulométricas del suelo bajo estudio.</b>	28
<b>VII.6 Efecto de la reducción del tamaño de la partícula de la muestra sobre la actividad enzimática de la celulasa del suelo.</b>	33

<b>VII.7</b> Estudio del efecto del pH sobre la glucosa liberada por la actividad enzimática de la celulasa del suelo.	36
<b>VII.8</b> Efecto de la temperatura de incubación del suelo sobre la actividad enzimática de la celulasa.	39
<b>VIII. CONCLUSIONES.</b>	43
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	44
<b>X. ANEXOS</b>	45

## Índice de tablas

		Pag.
<b>Tabla 1.</b>	Elementos inorgánicos que actúan como cofactores para enzimas.	4
<b>Tabla 2.</b>	Enzimas presentes en el suelo.	5
<b>Tabla 3.</b>	Absorbancia en función de la concentración de glucosa. Medida a 540 nm.	19
<b>Tabla 4.</b>	Atributos para los modelos lineal y polinomial calculados con programa Kalibo.	21
<b>Tabla 5.</b>	Absorbancia en función de la concentración de glucosa en presencia de suelo. Medida a 540 nm.	22
<b>Tabla 6.</b>	Atributos para los modelos lineal y polinomial calculados con programa Kalibo.	24
<b>Tabla 7.</b>	Valores de absorbancia en función de la cantidad de suelo (g) Medida a 540 nm.	26
<b>Tabla 8.</b>	Atributos para los modelos lineal y polinomial calculados con programa Kalibo.	26
<b>Tabla 9.</b>	Composición o fraccionamiento granulométrico de la muestra de suelo.	28
<b>Tabla 10.</b>	Absorbancia en función de la concentración de glucosa, medida a 540 nm en el fraccionamiento de la muestra de suelo.	30
<b>Tabla 11.</b>	Absorbancia de las fracciones de la muestra de suelo con carboximetil- celulosa, medida a 540 nm.	31
<b>Tabla 12.</b>	Valores determinados de actividad en cada fracción granulométrica trabajando por quintuplicado.	32
<b>Tabla 13.</b>	Curvas de calibración de glucosa usando suelo molido y sin moler.	33
<b>Tabla 14.</b>	Valores de absorbancia en las medidas de la glucosa producida por la acción de la celulasa en suelos molidos y sin moler medidas a 540 nm. Sustrato carboximetilcelulosa.	35

<b>Tabla 15.</b>	Valores de glucosa liberada de la actividad celulasa para muestra de suelo sin moler y molido.	35
<b>Tabla 16.</b>	Curva de calibración de glucosa para los cambios de pH.	36
<b>Tabla 17.</b>	Valores de absorbancia en las medidas de glucosa producida por la acción de la celulasa en los cambios de pH medidas a 540 nm. Sustrato carboximetilcelulosa.	38
<b>Tabla 18.</b>	Valores determinados de actividad en los cambios de pH trabajando por quintuplicado.	38
<b>Tabla 19.</b>	Curvas de calibración de glucosa para los cambios de temperatura.	40
<b>Tabla 20.</b>	Valores de absorbancia en las medidas de la glucosa producida por la acción de la celulasa en los cambios de temperatura de incubación del suelo medidas a 540 nm. Sustrato carboximetilcelulosa.	41
<b>Tabla 21.</b>	Valores determinados de actividad en los cambios de temperatura de incubación del suelo trabajando por quintuplicado.	42

## Índice de figuras

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Localización de las enzimas en el suelo.	5
<b>Figura 2.</b> Complejo enzimático de la celulasa.	8
<b>Figura 3.</b> Formación del 3 - amino - 5 – nitrosalicilato.	17
<b>Figura 4.</b> Curva de calibración para modelo lineal.	20
<b>Figura 5.</b> Análisis de los residuos.	21
<b>Figura 6.</b> Curva de calibración para modelo polinomial.	21
<b>Figura 7.</b> Curva de calibración en presencia de suelo. Modelo lineal	23
<b>Figura 8.</b> Análisis de los residuos.	25
<b>Figura 9.</b> Curva de calibración en presencia de suelo. Modelo Polinomial	25
<b>Figura 10.</b> Efecto de la matriz.	28
<b>Figura 11.</b> Porcentaje, en masa, de cada fracción granulométrica como función del rango de tamaños de las partículas que la integran.	30
<b>Figura 12.</b> Curvas de calibración para glucosa correspondiente a cada fracción granulométrica.	32
<b>Figura 13.</b> Fracción granulométrica y actividad celulasa.	34
<b>Figura 14.</b> Curvas de calibración para suelos de granulometrías $\leq 2,0$ y $\leq 0,21$ mm.	36
<b>Figura 15.</b> Curvas de calibración para glucosa correspondiente a los cambios de pH.	39
<b>Figura 16.</b> Cambios de pH en función de la actividad celulasa.	41
<b>Figura 17.</b> Curva de calibración para glucosa correspondiente a los cambios de temperatura de incubación del suelo.	43
<b>Figura 18.</b> Cambios de temperatura en función de la actividad celulasa.	44

## RESUMEN

El suelo es un recurso natural que necesita ser preservado y así mejorar su calidad y capacidad productiva. Los indicadores de calidad son un conjunto de parámetros (propiedades físicas, químicas y biológicas) que buscan establecer estándares de calidad para el recurso suelo; dentro de este conjunto se consideran las actividades enzimáticas por estar muy relacionadas con las demás propiedades y por ser sensibles a los cambios generados por el uso del suelo (González et al. 2008).

Los suelos son capaces de amortiguar los efectos de malas prácticas culturales o de contaminantes. Esta propiedad puede conducir a que sufran daños graves que no se detecten a tiempo. El seguimiento de los cambios en la actividad de algunas enzimas tales como  $\beta$ -glucosidasa, deshidrogenasa, fosfomonoesterasa y ureasa permite, mediante el cálculo de determinados índices, evidenciar perturbaciones ocurridas en cortos lapsos. El éxito en la detección oportuna, dependerá de la sensibilidad y precisión con que se las evalúe (Bianchi et al. 2008).

Uno de los procedimientos de uso más frecuente para la medida de la actividad enzimática de la celulasa, desarrollado inicialmente por Ghose (1987) y posteriormente Wood y Bhat (1988), se basa en el uso del ácido 3,5-dinitrosalisílico para la medida de los azúcares reductores liberados por la acción de la enzima sobre la carboximetilcelulosa incorporada al suelo como sustrato. Es a este procedimiento al que se dirigieron los estudios con la finalidad de mejorar su desempeño. Los estudios se concentraron en los análisis de la influencia del pH y temperatura de digestión y el tamaño de las partículas de la muestra sobre la exactitud, sensibilidad y precisión del procedimiento. Los resultados obtenidos mostraron que, dentro de los rangos estudiados, (pH 5 a 8, temperaturas entre 20 y 60 °C y tamaño de partículas  $\leq 2$  mm ó  $\leq 0,2$  mm), haciendo la digestión a 40 °C y a pH 5,0 con un tamaño de partícula  $\leq 0,2$  mm se logra el máximo de precisión mientras que si las determinaciones se efectúan a pH 5,3 la sensibilidad se incrementa en un 6 % mientras que la precisión disminuye a la mitad respecto a la obtenida a pH 5,0.



# **I. INTRODUCCIÓN**

## **I.1 El suelo**

Es un recurso natural complejo que necesita ser preservado, y así, mejorar su calidad y capacidad productiva. La importancia del suelo es palpable, si se piensa que es una reserva hídrica para las plantas y los microorganismos, y un medio purificador del agua que percola a través de él. El suelo está compuesto de materia inorgánica (arena, limo y partículas arcillosas), materia orgánica, agua, gases y organismos vivos (lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos), entre los cuales se produce un intercambio continuo de moléculas mediante procesos químicos, físicos y biológicos. Los microorganismos del suelo juegan un papel muy importante en gran parte de los ciclos bioquímicos del C, N, P, S y del agua. La disponibilidad de estos elementos está influenciada de manera importante por la mineralización de la materia orgánica y por su inmovilización, ambas producidas por los microorganismos (Karlen 1997).

### **I.1.2 Indicadores de calidad de un suelo**

En los últimos años se ha incrementado el interés por el desarrollo de un concepto de calidad de suelo, sin embargo ha sido difícil de definir y cuantificar el suelo en este sentido. La calidad de suelo está determinada por funciones simultáneas como el sostener la productividad de los cultivos, el mantener la calidad del agua y del aire, y el proporcionar condiciones saludables para plantas, animales y el hombre dentro de los límites de un ecosistema. Por consiguiente, la calidad de este recurso determina la sostenibilidad de la agricultura, la calidad ambiental y como consecuencia la salud de plantas, animales y del hombre (Gil Sotres 2004).

Se ha propuesto un conjunto de indicadores para determinar la calidad del suelo, entre los cuales se encuentran: los de tipo físicos, físicos- químicos (estabilidad de agregados, conductividad eléctrica), y químicos (indicadores nutricionales y fracciones de carbono), como los de tipo microbiológicos y bioquímicos (carbono de

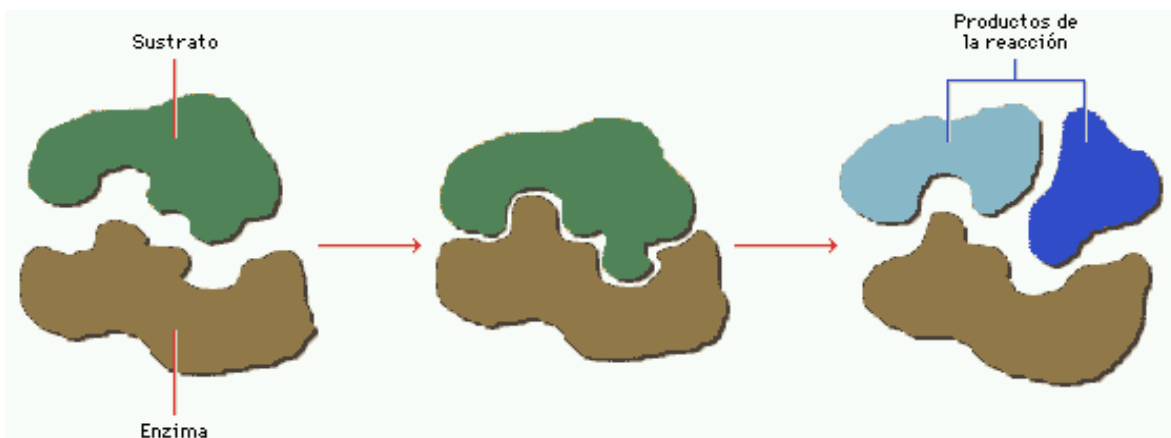
biomasa microbiana, respiración microbiana y diversas actividades enzimáticas), los cuales deben satisfacer ciertos requisitos como lo son:

- a. Sensibilidad ante la presencia del mayor número posible de agentes degradantes del suelo.
- b. Deben permitir conocer la dirección del cambio a producirse ante la presencia de un contaminante dado.
- c. Deben tener la capacidad de reflejar diferentes niveles de degradación (Gil-Sotres 2004).

El estudio del incremento de la sensibilidad y precisión de los indicadores abre un amplio campo de trabajo en la química analítica para la propuesta de nuevos procedimientos suficientemente sensibles, precisos y confiables aptos para detectar cambios tan pequeños como sean requeridos en el control de la calidad del suelo.

## 1.2 Enzimas

El nombre de enzima deriva de la frase griega en Zymc, que significa 'en fermento' y fue propuesto en 1867 por el fisiólogo alemán Wilhelm Kühne. Las enzimas son moléculas proteicas especializadas en catalizar un tipo específico de reacción química (Lehninger 1995). Su reacción puede expresarse en dos pasos como se indica en el siguiente esquema:



### I.2.1 Cofactor

La actividad de algunas enzimas depende solamente de su estructura como proteínas, mientras que otras necesitan, además uno o más componentes no proteicos de otras especies, llamados cofactores. El cofactor puede ser un ión inorgánico, o bien una molécula orgánica llamada coenzima; algunas enzimas necesitan de ambos. Estos son generalmente más resistentes al calor que las enzimas mismas (ver tabla.1) (Lehninger 1995).

**Tabla 1:** Elementos inorgánicos que actúan como cofactores para enzimas

<b>ELEMENTO INORGÁNICO</b>	<b>ENZIMA</b>
$\text{Cu}^{+2}$	Citocromo oxidasa
$\text{Fe}^{+2}$ o $\text{Fe}^{+3}$	Citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa
$\text{Mg}^{+2}$	Hexoquinasa, glucosa 6- fosfatasa, piruvato quinasa
$\text{Ni}^{+2}$	Ureasa

Tomado de (Lehninger 1995).

El complejo enzima-cofactor activo recibe el nombre de holoenzima. Cuando se separa el cofactor, la proteína restante, que por si misma es inactiva, se la denomina apoenzima.

### I.2.2 Clasificación de las enzimas

Debido al gran número de enzimas conocidas en la actualidad se ha hecho necesario su ordenamiento en grupos siguiendo diferentes criterios. Una clasificación muy utilizada es aquella que hace uso del tipo de reacción que cataliza. De acuerdo a este criterio se las puede ubicar en 6 grupos principales (Skujins 1976). En la tabla 2 se indica cuales son esos grupos, las reacciones en las que intervienen y el nombre de la enzima involucrada.

**Tabla 2: Enzimas presentes en el suelo**

<b>Clases de Enzimas</b>	<b>Reacción Química Catalizada</b>	<b>Nombre de la Enzima</b>
Oxido – Reductasas	Reacción de óxido -reducción	Glucosa oxidasa
Transferasas	Transferencia de grupos funcionales (glucósidos, fosfatos)	Glucocuinasa
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis. Transforman polímeros en monómeros. Actúan sobre: Enlaces C=O	Celulasas
Liasas	Adición a dobles enlaces (C=O; C=C; C=N)	Descarboxilasa
Isomerasas	Reacción de isomerización	Fosfoglucosa isomerasa
Ligasas	Formación de enlaces , con aporte de ATP ( C=O; C=S; C=N; C=C)	Piruvato Carboxilasa

Tomado de (Skujins 1976).

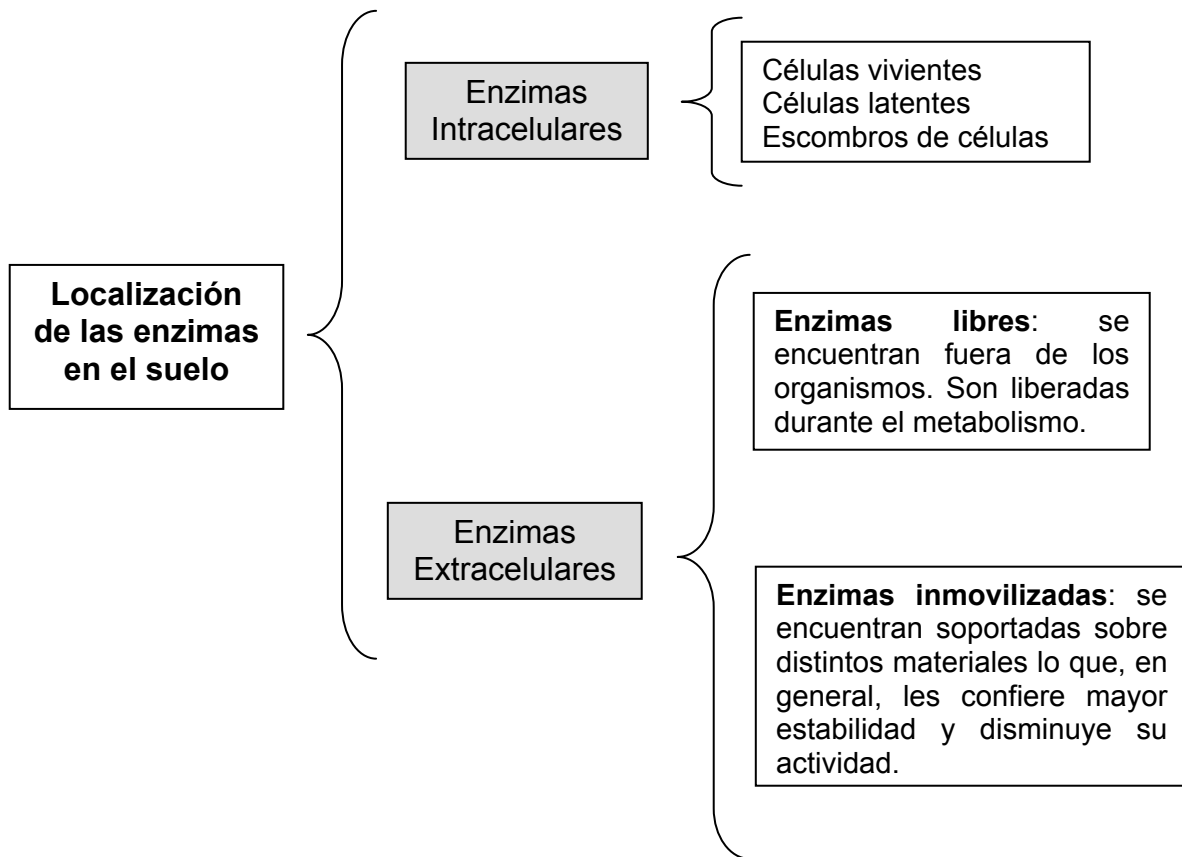
### **1.2.3 Localización de las enzimas en el suelo**

La actividad de la enzima en el suelo depende de enzimas intracelulares y extracelulares como se describe en la figura 1.

Las enzimas pueden estar intracelularmente localizadas en cualquier tipo de células o en células muertas y escombros de células. Ellas pueden ser liberadas y existir temporalmente en complejos enzima-sustrato o adsorberse a minerales arcillosos o estar asociadas con coloides húmicos

Las enzimas extracelulares se encuentran fuera de la célula y están de forma libre e inmovilizada (ver figura 1) (Nannipieri 1996).

**Figura 1:** Localización de las enzimas en el suelo.



### **I.3 Factores del medio que influyen sobre la actividad enzimática.**

Entre los principales factores que influyen en la actividad enzimática se encuentran la temperatura y el pH.

#### **I.3.1 pH**

Los estudios del efecto del pH en reacciones catalizadas por enzimas son debido a que la concentración del ión hidrógeno en el sistema de reacción afecta los grupos dissociables de la proteína influyendo el estado de ionización del sustrato. Para la interacción eficaz entre el sustrato y la enzima, los grupos ionizables, tanto del

sustrato como del centro activo de la enzima, deben estar en estados apropiados para mantener su conformación (Deng 1994).

### **I.3.2 Temperatura.**

Las reacciones catalizadas por enzimas aumentan con el incremento de la temperatura de incubación hasta cierto valor luego del cual comienza su disminución por la desnaturalización de la proteína. Para la celulasa la máxima actividad es próxima a los 60 °C (Deng 1994).

Las condiciones generales del ensayo y la concentración del sustrato deben permitir su libre difusión para facilitar su interacción con la enzima (Deng 1994).

### **I.4 Celulasas.**

El estudio de las enzimas del suelo, en particular de las hidrolasas, ha experimentado un claro auge en los últimos años debido al papel que desempeñan en los procesos de degradación de la materia orgánica.

La celulasa es una enzima extracelular que pertenece al grupo de las hidrolasas y cataliza reacciones de hidrólisis. Se encuentra fuera de la célula y puede estar en forma libre o inmovilizada. Las celulasas del suelo tienen su origen en los microorganismos celulolíticos, fundamentalmente hongos tales como *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. (Alvarez 2003). Son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, capaces de degradar la celulosa. En realidad se trata de una mezcla de diversos componentes enzimáticos, formando lo que se denomina un “complejo enzimático” que actúa de forma simultánea en la degradación de la celulosa. Este complejo está formado por tres tipos de enzimas (Charpentier 1968).

- Endoglucanasas o endocelulasas ( $\beta$ -1,4-D-glucan-4-glucanohidrolasas).
- Celobiohidrolasas o exocelulasas (1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasas) y
- $\beta$ - glucosidasa o celobiasa ( $\beta$ - D- glucósido glucohidrolasas).

### **I.4.1 Celulosa.**

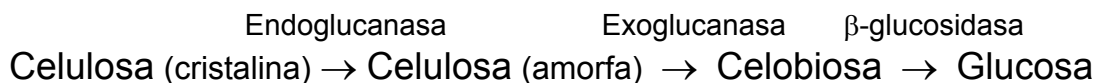
La celulosa es un polímero cuya molécula tiene más de dos mil unidades de D-(+)-glucosa, unidas por un enlace glucosídico (1,4) de tipo beta. Las moléculas de celulosa se unen mediante puentes de hidrógeno de dos tipos diferentes, dando lugar a una estructura polimórfica. De su hidrólisis se obtienen celodextrinas, celobiosa y finalmente, glucosa.

### **I.4.2 Degradación de la celulosa.**

Se distinguen tres fases en la degradación de la celulosa (Charpentier 1968):

1. Transformación de la celulosa insoluble (cristalina) en celulosa soluble (amorfa).
2. Transformación de celulosa soluble en oligosacáridos y celobiosa (dímero de la glucosa).
3. Transformación de la celobiosa en glucosa.

En las dos primeras fases intervienen diversas enzimas que se pueden incluir dentro del grupo de las celulasas, mientras que en la tercera está presente una enzima que cataliza la ruptura del enlace beta del disacárido, denominada  $\beta$ -glucosidasa. El proceso puede resumirse según el siguiente esquema:

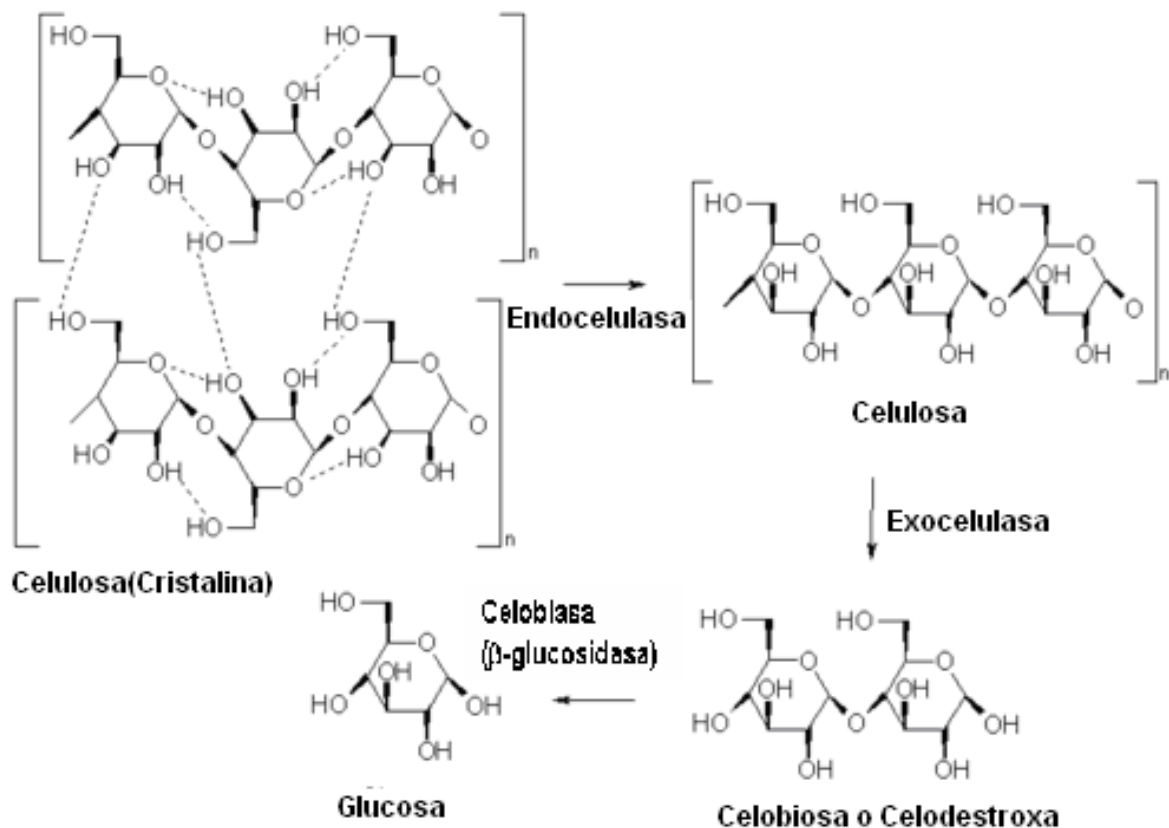


### **I.4.3 Complejo enzimático de la celulasa.**

La figura 2 describe el modo de acción del complejo enzimático de la celulasa. La primera etapa consiste en la degradación hidrolítica de las regiones amorfas, por medio de las endoglucanasas o endocelulasas, que atacan de forma reductora el enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico de las regiones amorfas del polímero de celulosa, produciendo múltiples cadenas de polímeros de diversas longitudes.

En la etapa siguiente actúan las celobiohidrolasas o exocelulasas, cuya acción se limita al extremo no reductor de la cadena, presentando una elevada actividad frente a la celulosa amorfa y dando como producto celobiosa (dímero de  $\beta$ -1,4-glucosa). Esta enzima presenta gran afinidad por la celulosa por lo que también degrada lentamente las cadenas terminales no reductoras de las regiones cristalinas accesibles del polímero, produciendo celobiosa. Finalmente, las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan las cadenas de celobiosa y celooligosacaridos solubles, produciendo glucosa (Charpentier 1968).

**Figura 2:** Complejo enzimático de la celulasa.





## **I.5 Medida de la actividad de la celulasa**

Para realizar la determinación de la actividad de las enzimas en el suelo, entre ellas la celulasa, se debe trabajar bajo condiciones controladas de pH, temperatura y concentración de sustrato.

La actividad se la cuantifica en función de la cantidad de producto surgido de la reacción enzima - sustrato y se indica como: moles o  $\mu\text{g}$  del metabolito por gramo de material por hora de incubación. En nuestro caso, al determinar la actividad en suelo el carboximetilcelulosa como sustrato y, siendo la glucosa el producto de la interacción enzima - sustrato, la actividad enzimática será indicada como:

$$\text{Actividad celulasa} = \mu\text{g de glucosa} \times \text{g}^{-1} \text{ de suelo} \times \text{h}^{-1} \text{ de incubación}$$

La determinación de la glucosa liberada por la actividad celulasa se realiza por distintos métodos siendo los más frecuentes los espectrofotométricos y los cromatográficos. De ellos el más usado es el espectrofotométrico (Alvarez 2003).

## **I.6 Procedimientos fotométricos más empleados para la cuantificación de la actividad celulasa a través de la glucosa liberada.**

Diversos autores proponen procedimientos para determinar la actividad celulasa en diversos extractos provenientes de sistemas biológicos. Algunos de ellos se han aplicado a su determinación en suelos.

Todos coinciden en la utilización de carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Difieren en las condiciones en las cuales se desarrolla la hidrólisis (tiempo, temperatura, pH y concentración de sustrato) y/o en el procedimiento para la determinación de la glucosa liberada.

En la mayoría de los estudios la incubación, durante el desarrollo de la hidrólisis de la celulosa, se mantiene entre 20 y 24 horas, la temperatura fluctúa entre 30 y 50 °C y el pH entre 4,5 y 5,5, la concentración del sustrato, CMC, varía entre 0,2 y 2 %.

Entre los procedimientos empleados para la cuantificación espectrofotométrica de la glucosa liberada se encuentran:

1) Los desarrollados por Spiro (1966) y Wood y Bhat (1988) que utilizan antrona y fenol en medio de ácido sulfúrico como reactivos. Ambos procedimientos son poco usados debido a su baja sensibilidad y al hecho de que son muy poco selectivos ya que no sólo detectan azúcares reductores si no que sus reacciones son aplicables también a azúcares no reductores. Sus usos están dirigidos sólo a los casos en los que se requiere la determinación de azúcares reductores totales.

2) Nelson (1994) propuso la modificación al procedimiento de Somogyi (1945) basado en la determinación de glucosa por su efecto reductor sobre  $\text{Cu}^{(II)}$  proponiendo el uso del ácido arsenomolibdico el cual sería reducido por el ion cuproso confiriéndole a la solución un intenso color azul el cual podía ser cuantificado fotométricamente. Este procedimiento ha sufrido una serie de modificaciones: Hayano (1986), García Alvarez e Ibáñez (1994) y Deng y Tabatabay (1994). Estos últimos proponen el empleo de 2 g de resina AG 50W-X8 de malla 20 – 50 para tratar 10 mL del extracto del suelo a fin de extraerle los metales Ag, Ba, Cd, Hg,  $\text{Fe}^{(III)}$ , Cr, Pd, Sr ó Zn que son interferentes. Ioduro y iodato son también interferentes pero no son eliminados por el empleo de la resina.

3) Schinner y Von Mersi (1990) y Gander et al. (1994) propusieron el procedimiento conocido como del Azul de Prusia en el cual el extracto del suelo se hace reaccionar en medio alcalino en presencia de cianuro, a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos, con ferricianuro en exceso. La reacción conduce a la formación de ferrocianuro el cual, a temperatura ambiente, ante el exceso de ferricianuro y el agregado de sulfato amónico férrico produce ferrocianuro férrico coloreando de azul la solución con un máximo de absorbancia a 690 nm. El color es estable al menos durante 1 hora.

4) Un método alternativo en desarrollo es el propuesto por Prado et al. (1998). El procedimiento se basa en la reducción, en medio alcalino, del ferricianuro de potasio por los grupos reductores de los carbohidratos y el posterior desarrollo de color por formación del complejo de o-fenantrolina con el hierro II liberado por el ferrocianuro formado. El procedimiento ha sido desarrollado para la determinación de azúcares reductores en tejidos vegetales y aunque Deng y Tabatabai (1994) lo incluyen dentro de los 5 métodos comparados por ellos para la determinación de azúcares reductores en suelos, lo único que analizan es su sensibilidad.

5) Ghose (1987) y posteriormente Wood y Bhat (1988) han desarrollado un procedimiento para el análisis de azúcares reductores en suelo que hace uso de ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS.

La reacción entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) con glucosa conduce a la formación del ácido 3-amino-5-nitrosalicílico mientras que el grupo aldehído del azúcar se oxida a carboxílico. La relación entre el azúcar reaccionante y el DNS consumido indica que la reacción es algo más compleja que la que se postula.

El procedimiento de análisis es simple ya que para la calibración 3 mL de la solución del reactivo se adicionan a 3 mL solución glucosa en solución pH 5 de ácido acético-acetato y CMC 0,2 % calentándose por 15 minutos en baño de agua hirviendo. Desarrollado el color adicionar 1 mL de solución 20 % de tartrato de Na y K. (Sal de Rochelle), se deja enfriar y mide absorbancia a 540 nm.

La solución del reactivo contiene: 1% de Acido 3,5-dinitrosalicílico, 0,2 % de fenol, 0,05 % de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , y 1 % de NaOH.

La intensidad del color alcanza un máximo para una concentración de DNS del 1 %.

La concentración de fenol debe estar entre 0,2 y 0,5 %. En ese rango la presencia de fenol incrementa en 5 veces la intensidad de color respecto a la solución libre de él.

El sulfito tiene como finalidad eliminar el oxígeno disuelto para prevenir la oxidación de la glucosa, favorecida por el medio alcalino. El rango óptimo se encuentra entre 0,025 y 0,1%. Con concentraciones menores hay pérdida de linealidad y de intensidad de color, concentraciones mayores disminuyen la coloración. Si se utiliza la sal de Rochelle, para estabilizar el color, ésta debe ser incorporada separadamente antes de mezclar la glucosa con el reactivo. Esto previene la pérdida de glucosa hasta en un 70 %.

El NaOH incrementa la coloración pero produce una pérdida de glucosa. El efecto es favorable hasta un máximo del 1 % a partir del cual la decoloración por pérdida de glucosa comienza a superar el incremento de coloración debido al aumento de la alcalinidad.

La carboximetilcelulosa al 0,2 %, utilizada como sustrato en la medida de la actividad celulasa, incrementa la coloración mientras que la solución buffer de pH 5, conteniendo citrato 0,05 M como recomiendan por algunos autores, disminuye el

color. En las concentraciones señaladas ambos efectos se compensan. El efecto negativo del citrato puede eliminarse usando en su lugar buffer de acético – acetato.

### **I.7 Selección del procedimiento a emplear en la cuantificación de la glucosa liberada.**

El procedimiento del fenol sulfúrico (Wood y Bhat, 1988) como el de la antrona (Bailey, 1958), (Spiro, 1966) se descartan fundamentalmente por su inespecificidad además de su baja sensibilidad y el del arsenomolibdato, también se descarta por sus interferentes, la complejidad operativa y su menor sensibilidad con relación a los métodos del ferricianuro o el del DNS.

Considerando los métodos del ferricianuro propuesto por Schinner y Von Mersi (1990) y Gander et al. (1994) y el del DNS propuesto por Ghose (1987) y posteriormente por Wood y Bhat (1988) si bien el procedimiento del Azul de Prusia es más sensible, se prefiere seleccionar el procedimiento del DNS por tener una adecuada sensibilidad, mayor estabilidad del producto final y utilizar reactivos menos peligrosos.

## **II. Atributos del procedimiento seleccionado a ser evaluados para su validación.**

Una vez seleccionado el procedimiento a utilizar se debe proceder a su montaje y ensayo hasta que se encuentre bajo control estadístico. Esto es que los errores en las magnitudes medidas sean, en lo posible, exclusivamente de origen aleatorio y no sistemático. Para ello es necesario hacer curvas sucesivas de calibración hasta que el número de valores experimentales que deban ser desechados se minimice al igual que la desviación estándar de los puntos cuyas fluctuaciones puedan ser consideradas de origen aleatorio.

Las curvas de calibración fueron preparadas con un mínimo de cinco estándares de calibración que cubran, uniformemente, el rango de concentración de interés. Este rango normalmente corresponde a 50 % y 200 % de la concentración del componente que se espera encontrar en las muestras reales.

Una vez logrado el control estadístico del método se procederá a su validación. Para el uso al que serán destinados los resultados. Los atributos a ser considerados serán los siguientes:

**- Linealidad.**

La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado (Cámara, 2002).

**- Sensibilidad.**

La sensibilidad del método esta definida por su capacidad en discriminar entre concentraciones muy próximas del analito y está representada por la pendiente de la curva de calibración. Así, un método analítico es sensible si pequeños cambios en la concentración del analito producen grandes cambios en la medición analítica (Cámara, 2002).

**- Error sistemático de la curva de calibración.**

El método de adición de estándar (5 ó 6 niveles de adición del analito a la muestra - matriz) se usará para determinar si la pendiente de la línea de regresión de los estándares de adición es la misma que la pendiente de la curva de calibración de las soluciones estándares (Cámara, 2002).

Si las pendientes e intercepciones son las mismas, se interpreta que no hay evidencia de error sistemático producido por la matriz. Si las pendientes son diferentes el método de adición de estándares podrá ser usado para calcular el efecto matriz y efectuar las correcciones correspondientes.

**- Exactitud.**

La exactitud de un método analítico es una medida de la proximidad entre el resultado obtenido y el valor aceptado como real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico y se expresa en términos de error absoluto o error relativo (Cámara, 2002).

### - **Precisión.**

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea (Cámara, 2002).

La medida de este parámetro, para un número reducido de datos ( $n < 30$ ) se puede expresar como desviación estándar estimada (S) o como el coeficiente de variación (CV) y se calculan mediante las expresiones:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}}$$

Donde:

$x_i$  = valor medido.

$\bar{x}$  = valor promedio de las medidas efectuadas.

n = número de medidas efectuadas

### - **Límites de detección y cuantificación.**

Muchos autores y organizaciones coinciden en establecer que el límite de detección y cuantificación es igual al promedio del blanco más 3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Cámara, 2002).

### **III. HIPÓTESIS**

Es necesario que los procedimientos empleados en la medida de la actividad celulasa en suelos, destinada al control de su calidad, permitan detectar cambios muy pequeños. La utilización de la muestra tamizada a  $\leq 2$  mm no permite garantizar la uniformidad de las replicas. La molienda de la misma hasta un tamaño de partícula  $\leq 0,2$  mm debe mejorar significativamente la homogeneidad del material y el contacto entre la enzima y sustrato incrementando la sensibilidad y precisión del análisis.

### **IV. OBJETIVO DEL TRABAJO.**

Desarrollar, ajustar y validar un procedimiento espectrofotométrico que, respecto a los actuales, incremente la precisión en la medida de la actividad celulasa a fin de hacerlo lo más útil posible a la medida del seguimiento de procesos tales como (Compostaje, variación en la calidad de suelos, etc.).

#### **IV.1 PASOS A SEGUIR PARA SU LOGRO.**

1. Estudiar y validar el procedimiento fotométrico destinado a determinar la glucosa liberada en la degradación de la celulosa.
2. Estudiar el efecto del pH y la temperatura sobre la determinación de la actividad celulasa.
3. Estudiar la influencia que ejerce el tipo de sustrato sobre la medida de la actividad enzimática.
4. Estudiar la influencia que el tamaño de la submuestra destinada al análisis la molienda y el tamaño de las partículas que la integran tienen sobre la sensibilidad y la precisión de la determinación de la actividad enzimática de la celulosa en el suelo.
5. Hacer uso de los resultados de los estudios indicados para proponer un procedimiento que mejore precisión en la determinación de la actividad celulasa.
6. Validar el procedimiento que se proponga

## **V. PLAN DE TRABAJO.**

1. Investigación bibliográfica continua y exhaustiva sobre determinación de la actividad celulasa.
2. Selección de un procedimiento práctico, de uso frecuente, para la determinación de la actividad celulasa en suelos.
3. Desarrollarlo experimentalmente para adquirir la destreza necesaria para su implementación, estudio y mejoramiento.
4. Estudiar las variables experimentales que influyan en su precisión incluyendo el tamaño de las partículas que integran la submuestra.
5. De acuerdo a los resultados obtenidos, proponer las condiciones operativas más adecuadas para su aplicación.
6. Validar y protocolizar el o los procedimientos que se consideren más adecuados.
7. Presentación de los resultados.

### **V.1 INSTRUMENTOS.**

- Espectrofotómetro Ultravioleta / Visible (340 - 650) nm. Marca Thermo Spectronic. Modelo Spectronic 20 D +.
- Baño Termostático. Rango de temperatura (-10 °C a 120 °C ). Regulación ( $\pm 0,5$  °C). Marca BECKMAN
- Balanza Analítica (precisión  $\pm 0,0001$  g). Marca Mettler. Modelo H31AR
- Mortero porcelana mecánico.

### **V.2 REACTIVOS.**

- D (+) – Glucosa anhidra, CAS
- Ácido acético. p.a. Marca Merck, 99,8 %.
- Ácido 3,5 – dinitrosalicílico. Marca Aldrich, 98 %.
- Acetato de sodio anhidro. p.a. Marca Alled Chemical.

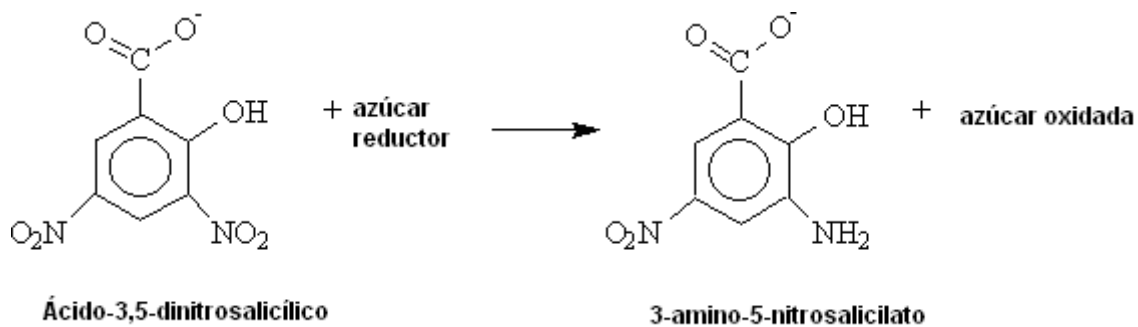


- Tartrato de sodio y potasio. p.a. Marca Merck, 99 %.
- Hidróxido de sódio. p.a. Marca Laboratory Reagent, 96,0 %.
- Carboximetilcelulosa. Marca Sigma N° C - 4888.

## VI. Principios del procedimiento empleado.

El procedimiento de Ghose (1987) y Wood y Bhat (1988) se basa en la determinación colorimétrica del 3-amino-5-nitrosalicilato obtenido por la reacción entre la glucosa y el ácido 3,5-dinitrosalicílico, DNS, ver figura 3.

**Figura 3:** Formación del 3-amino-5-nitrosalicilato



## **VII. RESULTADOS.**

### **VII.1 Curva de calibración de glucosa.**

#### **Preparación de soluciones.**

- Solución para el desarrollo del color. (Solución de DNS)

Se disuelve en 60 mL de agua destilada, lentamente y con agitación continua, 1,0 g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico. Se adiciona 1,0 g de hidróxido de sodio disuelto en un pequeño volumen de agua destilada, luego se añaden 30 g de tartrato de sodio y potasio, 0,20 g de fenol, 50 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y se lleva a un volumen final de 100 mL.

- Solución buffer de pH 5,0; 0,2 M en acetato.

Se disuelve en 900 mL de agua destilada 16,4 g de acetato de sodio y agregan 11,4 mL de ácido acético concentrado. De ser necesario se ajusta el pH a 5,0 con solución de 2 M de NaOH o con 2 M de HCl según sea el caso. Se lleva a volumen final de 1000 mL.

- Solución concentrada de glucosa.

Se preparan 250 mL de solución  $3 \times 10^{-3}$  M de glucosa disolviendo 0,135 g de glucosa en 50 - 70 mL de la solución buffer llevándose finalmente a 250 mL.

- Soluciones de referencia.

En sendos matraces aforados de 25 mL se colocan 4, 8, 12 y 16 mL de la solución concentrada de glucosa y se llevan a 25 mL con solución buffer de pH 5.

#### **Preparación de la curva de calibración.**

En 5 tubos de reacción, aptos para ser usados como celdas para mediciones fotométricas, se colocan 3,0 mL de solución buffer en el primero y 3,0 mL de cada uno de los patrones preparados en los 4 siguientes. A todos ellos se les adicionan 3 mL de la solución para el desarrollo del color (Solución de DNS) y se homogenizan.

### **Desarrollo del color y su medida.**

Los tubos preparados como se indicó anteriormente se colocan en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos. A continuación se enfrían rápidamente en agua con hielo hasta temperatura ambiente luego de lo cual se mide la absorbancia de cada una de las soluciones a 540 nm.

### **VII.2 Validación.**

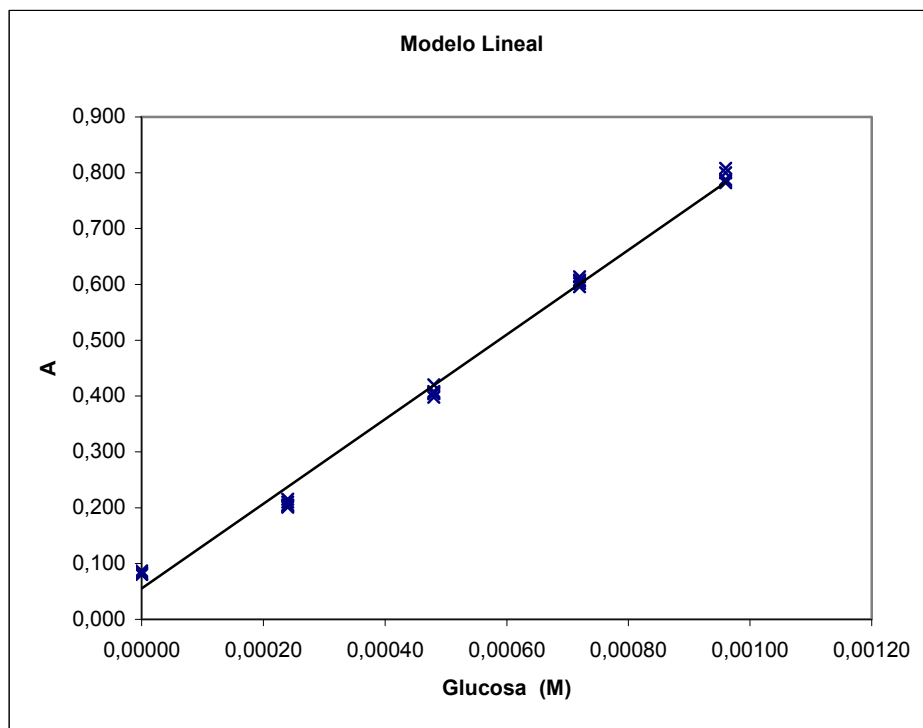
Se repitió el procedimiento anterior hasta que las series de datos de 3 curvas sucesivas no mostraran diferencia significativa entre ellos. Una vez logrado esto se hizo una curva de calibración con 5 réplicas por cada nivel de concentración tomando los tubos para las medidas de absorbancia en forma aleatoria.

Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en las figuras 4 y 6 su representación gráfica para los modelos lineal y polinómico.

**Tabla 3:** Absorbancia en función de la concentración de glucosa.  
Medida a 540 nm.

<b>Concentración de glucosa M</b>	<b>Absorbancia</b>				
0	0,083	0,081	0,087	0,084	0,081
0,000240	0,205	0,210	0,201	0,203	0,215
0,000480	0,398	0,406	0,404	0,420	0,408
0,000720	0,602	0,614	0,596	0,606	0,608
0,000960	0,808	0,782	0,788	0,785	0,800

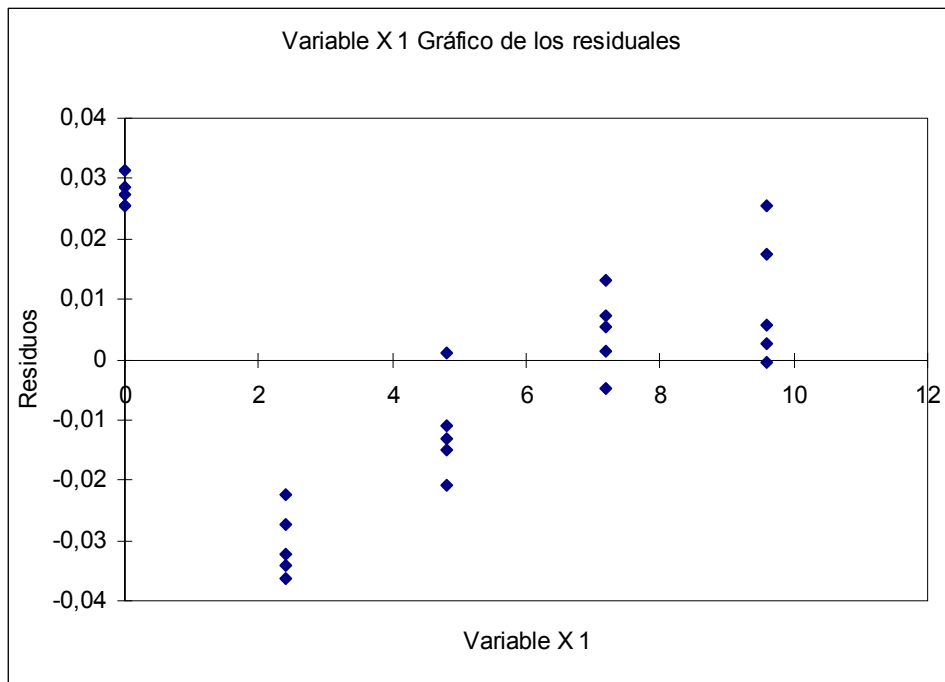
**Figura 4.** Curva de calibración para modelo lineal.



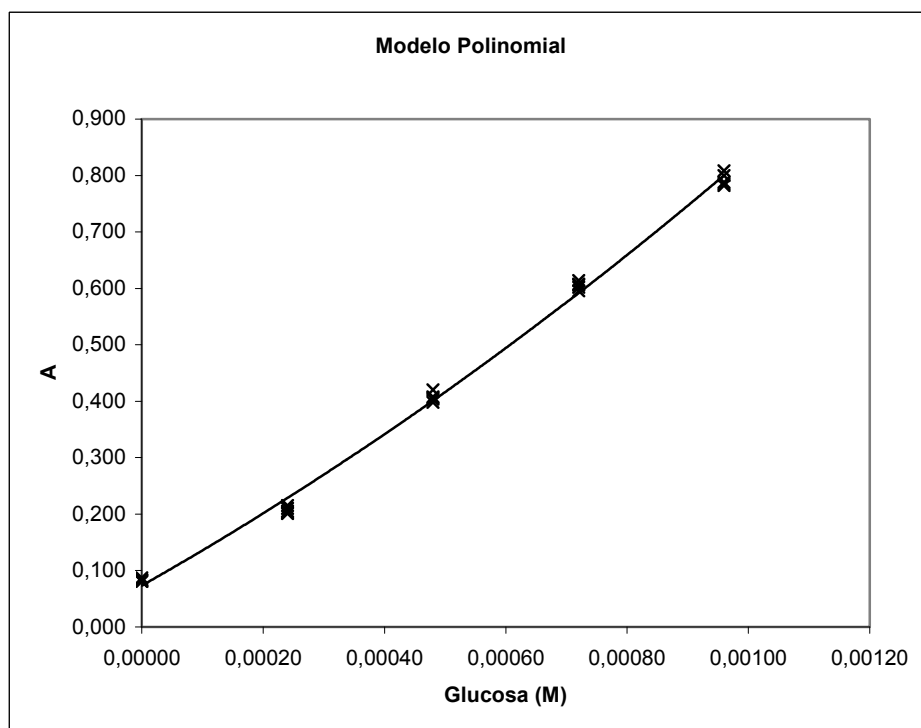
Los resultados experimentales obtenidos en la figura 4 se les aplicó el análisis de los residuos (ver figura 5) para comprobar a qué modelo se ajusta el procedimiento.

En la figura 5 se observa que el procedimiento se ajusta a un modelo polinomial, sin embargo se tomó el modelo lineal por que en este caso la pendiente es igual en todos los puntos y por ser más práctico y sencillo de trabajar.

**Figura 5:** Análisis de los residuos



**Figura 6.** Curva de calibración para modelo polinomial.



**Tabla 4.** Atributos para los modelos lineal y polinomial.  
Calculados con programa Kalibo

PARAMETRO	MODELO	
	LINEAL	POLINOMIAL
$a_0$	0,0556	0,0735
$S_{a_0}$	0,0075	-
$a_1$	757	608
$S_{a_1}$	13	-
$a_2$		155260
<b>Coef. de correlación</b>	0,9972	0,9984
<b>Prob. De correlación</b>	100,000 %	99,999 %
<b>Sensibilidad (para valor medio)</b>	-	757
$S_{residuos}$	-	0,0155
$S_{método}$	0,000029	0,000020
$CV_{método}$	5,98	4,25
<b>n</b>	25	25
<b>Outliers</b>	No se presentaron	No se presentaron

### VII.3 Curva de calibración de glucosa en presencia de suelo.

#### Preparación de soluciones.

Se procedió exactamente como en el caso indicado anteriormente.

#### Incubación del suelo.

En cada uno de 15 erlenmeyers de 50 mL de capacidad se colocan 5,00 g de suelo seco, tamizado a un tamaño  $\leq 2,0$  mm. A 3 de ellos se les agrega 10 mL de solución buffer. A los 12 restantes se les agrupa en 4 grupos de 3 y en cada erlenmeyer de estos grupos se adiciona 10 mL a cada de uno de los patrones de glucosa preparados.

El conjunto de erlenmeyers se coloca en baño termostático a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo indicado se toman 5 mL de solución sobrenadante de cada uno de los erlenmeyers y se colocan en sendos tubos de centrifuga y se los centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

### **Preparación de la curva de calibración.**

En 16 tubos de reacción, aptos para ser usados como celdas para mediciones fotométricas, se colocan 3,0 mL de solución buffer en el primero y 3,0 mL de solución de cada uno de los 15 tubos centrifugados anteriormente.

### **Desarrollo del color y su medida.**

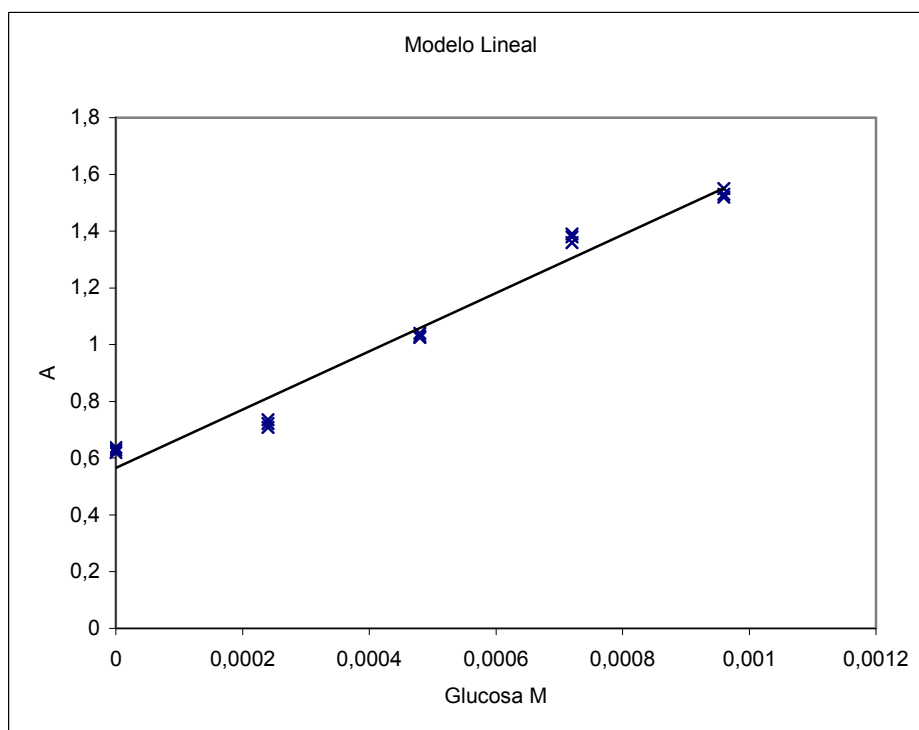
Los tubos preparados como se indicó anteriormente se colocan en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos. A continuación se enfrían rápidamente en agua con hielo hasta temperatura ambiente y se miden las absorbancias de cada una de las soluciones a 540 nm usando como blanco el primer tubo, cuya solución nunca estuvo en contacto con suelo.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Absorbancia en función de la concentración de glucosa, en presencia de suelo.  
Medida a 540 nm.

<b>Concentración de glucosa M</b>	<b>Absorbancia</b>		
0	0,620	0,628	0,638
0,000240	0,722	0,736	0,708
0,000480	1,030	1,025	1,040
0,000720	1,360	1,380	1,390
0,000960	1,550	1,520	1,530

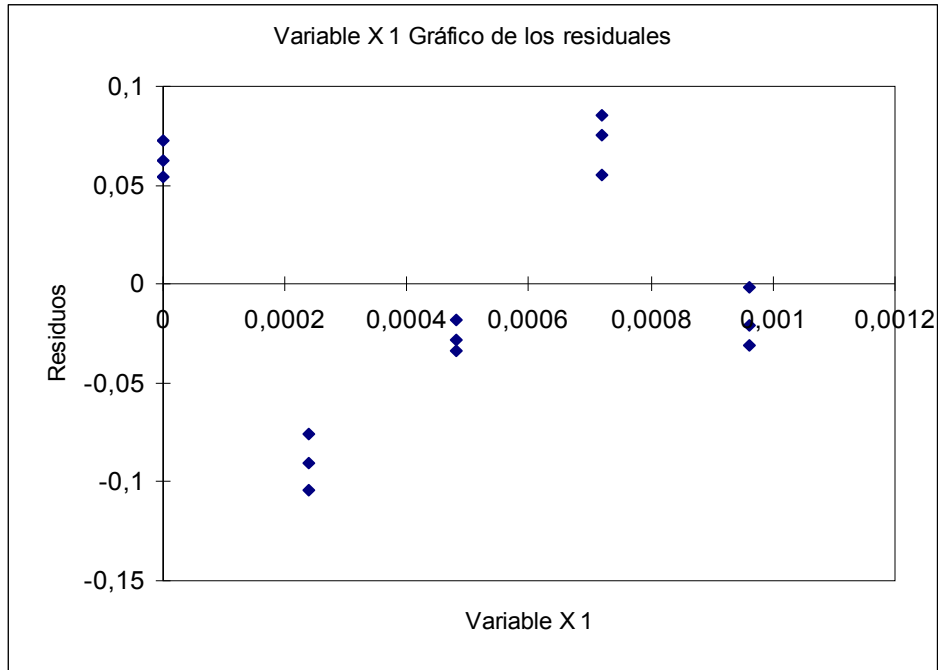
**Figura 7.** Curva de calibración en presencia de suelo.  
Modelo Lineal



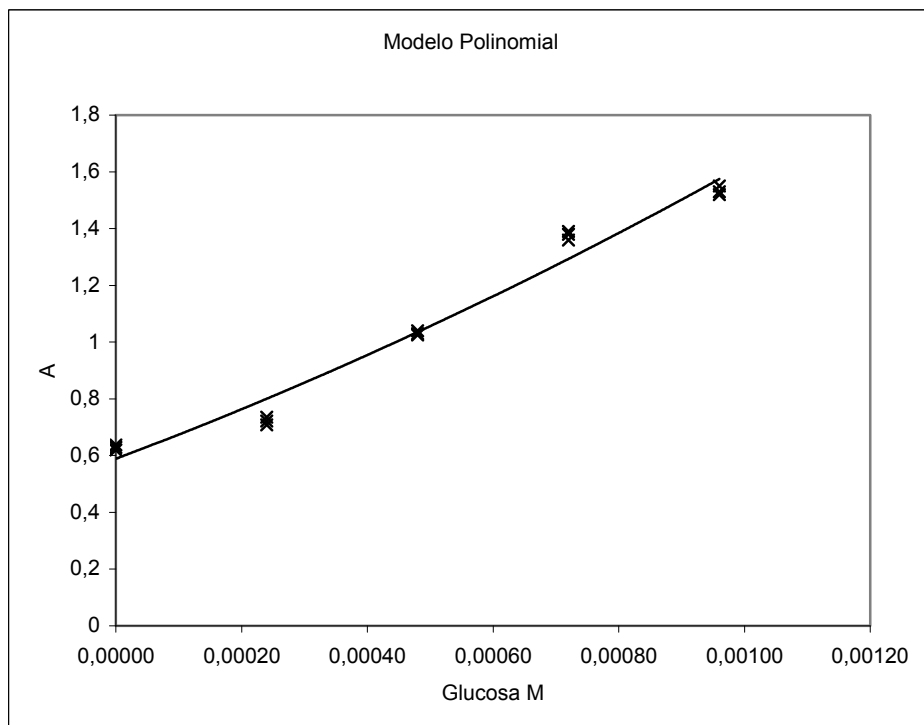
Los resultados experimentales obtenidos en la figura 7 se les aplicó el análisis de los residuos. El análisis para este caso es el mismo que para la figura 5.



**Figura 8:** Análisis de los residuos



**Figura 9.** Curva de calibración en presencia de suelo.  
Modelo Polinomial.



**Tabla 6.** Atributos para los modelos lineal y polinomial.  
Calculados con programa Kalibo.

PARAMETRO	MODELO LINEAL	MODELO POLINOMIAL
$a_0$	0,565	0,590
$S_{a_0}$	0,030	-
$a_1$	1027	833
$S_{a_1}$	50	-
$a_2$	-	201714
<b>Coef. de correlación</b>	0,9848	0,9863
<b>Prob. De correlación</b>	100,000 %	99,9999 %
<b>Sensibilidad (para valor medio)</b>	-	1027
$S_{residuos}$	0,066	0,065
$S_{método}$	0,000064	0,000064
$CV_{método}$	13,4	13,2
<b>n</b>	15	15
<b>Outliers</b>	No se presentaron	No se presentaron

#### VII.4 Efecto de la matriz.

Al realizar la curva de calibración con glucosa disuelta en agua se observa que no hay mayor dispersión en las medidas, pero cuando se realiza la curva de calibración con glucosa disuelta en buffer, en presencia de suelo se observa que existe mayor dispersión en las medidas y un valor mucho mayor para la abscisa en el origen de coordenadas. Ello condujo a realizar el siguiente estudio:

- Se procedió a homogenizar una muestra de suelo y se la dividió en dos porciones. Una de ellas se la humedeció y se calentó en la estufa a 100 °C por 2 horas para inactivar la enzima.
- Fracciones de 5,00 g del suelo inactivado se mezclaron con cantidades crecientes, desde 0 a 5,00 g del suelo con la enzima activa y se colocaron en erlenmeyers de 50 mL de capacidad.
- A cada erlenmeyer se le adicionó 10 mL de la solución carboximetilcelulosa (CMC) y al blanco 10 mL de buffer. Se taparon y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

- De cada erlenmeyers se tomaron 5 mL del sobrenadante. Se transfirieron a los tubos de centrifuga y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos. De cada uno de ellos se transfirieron 3 mL a tubos de reacción donde se desarrolló el color según el procedimiento ya indicado.
- Se midió la absorbancia a 540 nm usando como referencia solución buffer.

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos para las medidas de absorbancia en función de la cantidad de suelo con enzima activa. En la tabla 8 los resultados de su análisis.

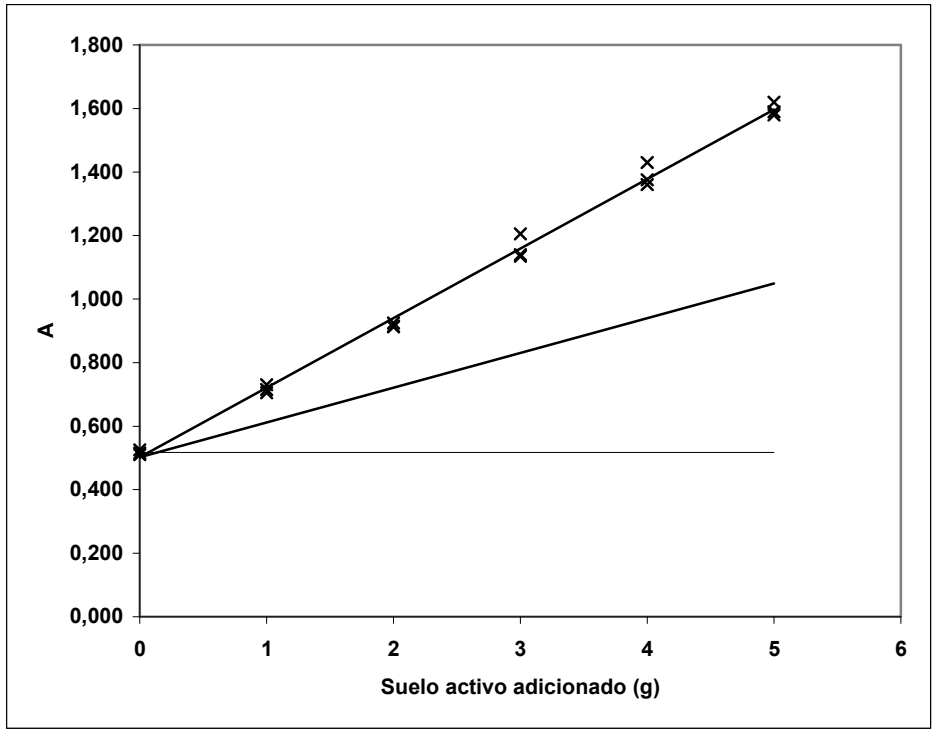
**Tabla 7.** Valores de absorbancia en función de la cantidad de suelo (g).  
Medida a 540 nm.

<b>Cantidad suelo (g)</b>	<b>Absorbancia</b>		
0	0,510	0,525	0,515
1,00	0,705	0,715	0,730
2,00	0,913	0,915	0,925
3,00	1,140	1,135	1,205
4,00	1,360	1,375	1,430
5,00	1,580	1,590	1,620

**Tabla 8.** Atributos para los modelos lineal y polinomial.  
Calculados con programa Kalibo.

<b>PARAMETRO</b>	<b>TODOS LOS DATOS</b>	<b>ELIMINANDO VALORES ANOMALOS</b>
a	0,502	0,504
a <sub>0</sub>	0,010	0,006
a <sub>1</sub>	0,219	0,214
a <sub>10</sub>	0,0034	0,0020
Coefficiente de correlación	0,998	0,999
Probabilidad de la correlación	99,999	100,000
S <sub>Residuos</sub>	0,025	0,013
S <sub>Método</sub>	0,112	0,062
CV <sub>Método</sub>	4,49 %	2,81 %
n	18	15
Valores anómalos	No se presentaron	Se eliminaron 3

**Figura 10.** Efecto de la matriz.



En la recta de máxima pendiente se encuentran graficados los datos experimentales. La recta inferior, de pendiente 0, indica el nivel de absorbancia para cuando no se agrega CMC y se trabaja con la enzima inactivada por calor. La absorbancia medida se corresponde a las sustancias coloreadas en solución que se separan del suelo durante las 24 horas de incubación. También se encuentran presentes, aunque en baja concentración, algunos azúcares reductores, distintos a la glucosa, pero que es natural encontrarlos en el suelo y son capaces de reducir el DNS y producir color. La recta de pendiente intermedia es la resultante de sumar los valores de la curva inferior el valor, variable, que se correspondería a la absorbancia que se mediría en una solución en la cual se hubiese trabajado con una cantidad de suelo igual a la que se indica en cada punto en la abscisa. Si se calculan las diferencias entre los puntos de la curva de máxima pendiente y los correspondientes a los de la curva de pendiente intermedia y las diferencias se

dividen por la cantidad de suelo activo correspondiente se obtiene la absorbancia por gramo de suelo activo la cual es directamente proporcional a la actividad de la enzima. El promedio calculado para las diferencias indicadas es de 0,108 con una desviación estándar igual a 0,0047. Si se informa el promedio de 6 o 7 medidas el error asociado que se podrá informar, con un nivel de confianza de 95 %, será numéricamente igual a la desviación estándar, o sea del orden del 4%.

## **VII.5 Actividad enzimática celulasa en las distintas fracciones granulométricas del suelo bajo estudio.**

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer la distribución del tamaño de las partículas que conforman el suelo utilizado y como variaba la actividad enzimática en función de la fracción granulométrica.

Para ello 1 Kg. de muestra de suelo seco se pasó por una serie de tamices con abertura de malla comprendida entre 2,0 y 0,21 mm.

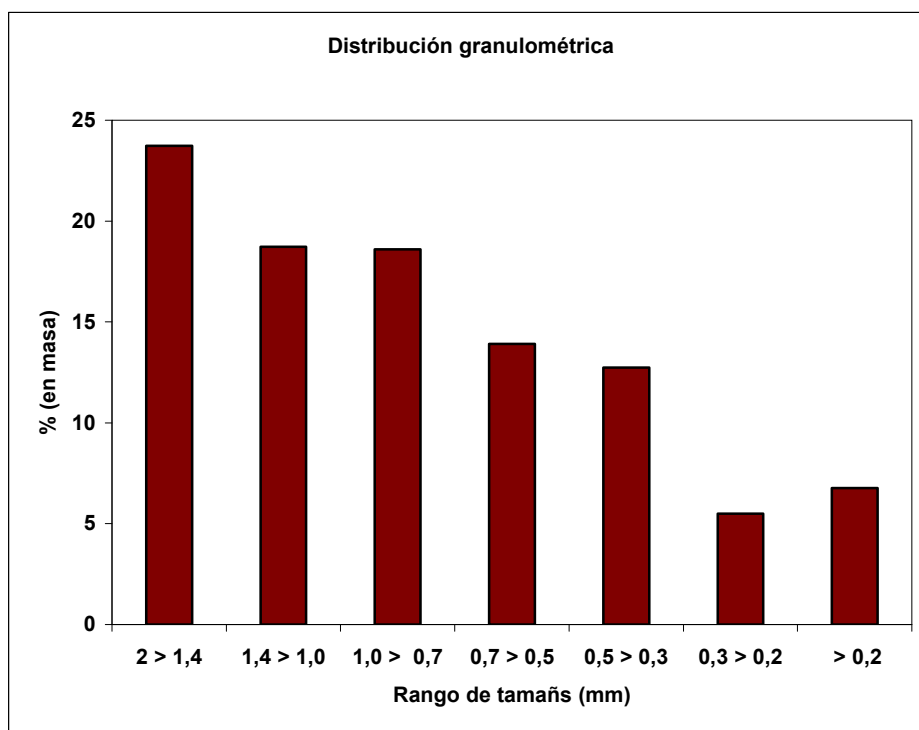
En la tabla 9 se presenta el porcentaje en peso de cada fracción separada como función del tamaño de partícula.

**Tabla 9:** Composición o fraccionamiento granulométrico de la muestra de suelo.

<b>Tamaño partícula (mm)</b>	<b>% Peso</b>
2 a > 1,4	23,7
1,4 a > 1,0	18,7
1,0 a > 0,71	18,6
0,71 a > 0,5	13,9
0,5 a > 0,3	12,7
0,3 a > 0,21	5,51
> 0,21	6,80

De los datos de fraccionamiento granulométrico se obtuvo la figura 11, en la cual se presenta porcentaje en peso de cada fracción granulométrica como función del tamaño de partícula (mm). Se observa que la mayor cantidad de partículas (aproximadamente el 24 %) tiene un tamaño que oscila entre 2 y  $\leq 1,4$  mm.

**Figura 11.** Porcentaje, en masa, de cada fracción granulométrica como función del rango de tamaños de las partículas que la integran.



Posteriormente se tomaron cinco muestras, de 5,00 g cada una, de las distintas fracciones obtenidas en el análisis granulométrico y se les determinó la actividad de la celulasa, por la metodología ya indicada.

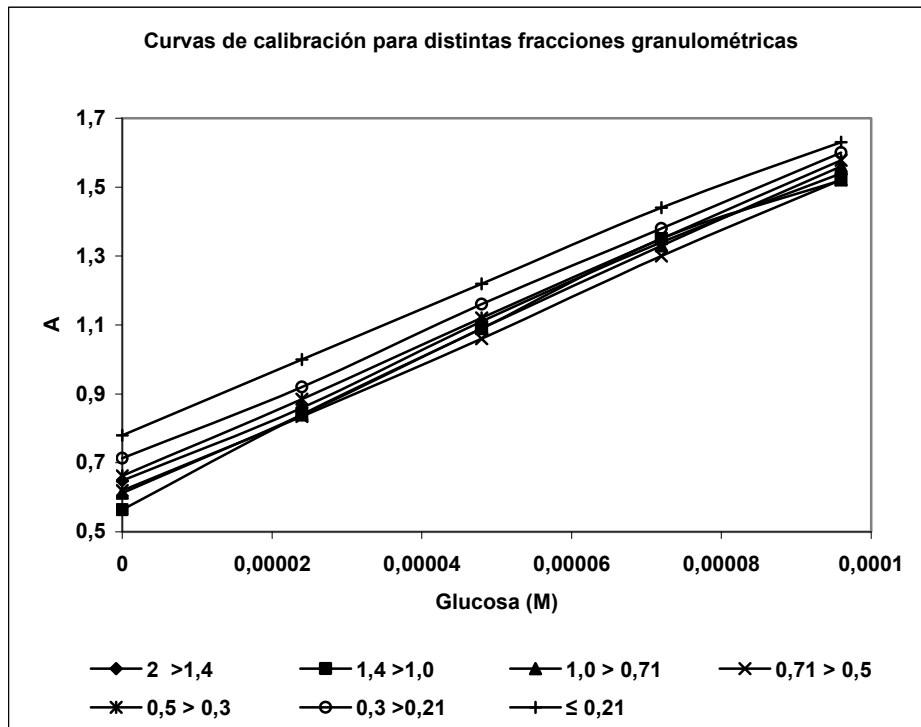
Dado que cada fracción tiene una composición característica, tanto desde el punto de vista del tamaño de las partículas que la integran como de los materiales que contienen, se hizo necesario hacer una curva de calibración para cada caso. En la tabla 10 se presentan los valores obtenidos.

**Tabla 10:** Absorbancia en función de la concentración de glucosa medida a 540 nm en el fraccionamiento granulométrico de la muestra de suelo.

Concentración de glucosa M	Rango de tamaños de las partículas (mm)						
	2 >1,4	1,4 >1,0	1,0 > 0,71	0,71 > 0,5	0,5 > 0,3	0,3 > 0,21	≤ 0,21
	A	A	A	A	A	A	A
0	0,648	0,564	0,612	0,620	0,662	0,713	0,78
0,000240	0,860	0,840	0,839	0,835	0,885	0,92	1,00
0,000480	1,11	1,09	1,09	1,06	1,12	1,16	1,22
0,000720	1,34	1,35	1,33	1,30	1,35	1,38	1,44
0,000960	1,54	1,52	1,56	1,521	1,578	1,60	1,63

En la figura 12 se representan las curvas de calibración correspondientes para cada fracción granulométrica de suelo. De cada una de estas gráficas se utiliza el valor de la pendiente b y el punto de intersección a.

**Figura 12.** Curvas de calibración para glucosa correspondiente a cada fracción granulométrica.



En la tabla 11 se presentan los valores obtenidos de absorbancia de las fracciones granulométricas de la muestra de suelo con carboximetilcelulosa como sustrato trabajando con 5 réplicas por fracción.

**Tabla 11.** Absorbancia de las fracciones de la muestra de suelo con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Medidas a 540 nm.

Réplica	Tamaño de partícula (mm)						
	2 > 1,4	1,4 > 1,0	1,0 > 0,71	0,71 > 0,5	0,5 > 0,3	0,3 > 0,21	≤ 0,21
<b>R1</b>	0,895	0,810	0,875	0,880	1,110	1,060	1,190
<b>R2</b>	0,815	0,882	0,890	0,895	1,035	1,100	1,170
<b>R3</b>	0,940	0,900	0,895	0,890	1,090	1,090	1,180
<b>R4</b>	0,820	0,792	0,875	0,950	1,025	1,080	1,210
<b>R5</b>	0,845	0,850	0,885	0,935	1,020	1,130	1,150

En la tabla 12 se presentan los resultados calculados de la medida de la actividad celulasa del suelo. Se puede observar que la actividad enzimática tiende a aumentar ligeramente de una fracción a otra, a medida que disminuye el tamaño de las partículas, excepto para aquellas que tienen un tamaño entre (0,71 > 0,21) mm donde el aumento de la actividad es más brusco, ver figura 13. Esto señala que la actividad de la celulasa en una muestra de suelo no está igualmente distribuida entre sus partes. Cada fracción de la muestra contribuye de forma diferente a la actividad total de la celulasa del suelo. Las partículas de menor tamaño tienden a contribuir en mayor medida de la glucosa liberada por la actividad de la celulasa.

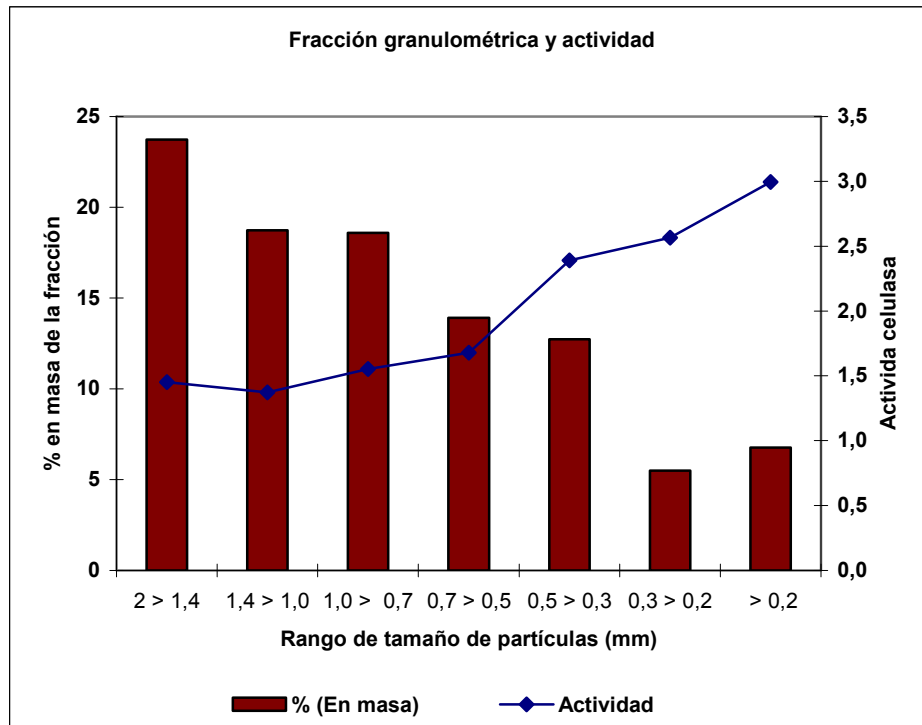


**Tabla 12.** Valores determinados de actividad en cada fracción granulométrica trabajando por quintuplicado.

RANGO DE TAMAÑOS (mm)						
2 > 1,4	1,4 > 1	1 > 0,7	0,7 > 0,5	0,5 > 0,3	0,3 > 0,2	≤ 0,2
a	a	a	a	a	a	a
1,61	1,19	1,52	1,53	2,65	2,41	3,04
1,22	1,54	1,58	1,61	2,29	2,60	2,95
1,83	1,63	1,60	1,58	2,56	2,56	2,99
1,24	1,11	1,51	1,87	2,24	2,51	3,14
1,36	1,39	1,56	1,80	2,22	2,75	2,85

<b>Promedios</b>	1,45	1,37	1,55	1,68	2,39	2,57	2,99
<b>S</b>	0,26	0,22	0,04	0,15	0,20	0,13	0,11
<b>CV</b>	17,9	16,3	2,5	8,9	8,4	4,9	3,6

**Figura 13.** Fracción granulométrica y actividad celular.



## VII.6 Efecto de la reducción del tamaño de la partícula de la muestra sobre la actividad enzimática de la celulasa del suelo

Este ensayo se realizó para comprobar si al disminuir el tamaño de partícula de la muestra se modifica la medida de la glucosa liberada por efecto de la actividad enzimática de la celulasa.

Para ello se procedió del siguiente modo:

- Se tomó una muestra de tamaño de partícula  $\leq 2$  mm, se homogenizó y se dividió en dos porciones aproximadamente iguales.
- Una porción se trituró en molino mecánico hasta hacerla pasar totalmente por un tamiz de abertura de malla  $\geq 0,21$  mm.
- De ambas porciones se tomaron cinco muestras y se procedió a su análisis por el procedimiento ya indicado construyendo una curva de calibración para suelo molido y otra para suelo sin moler.

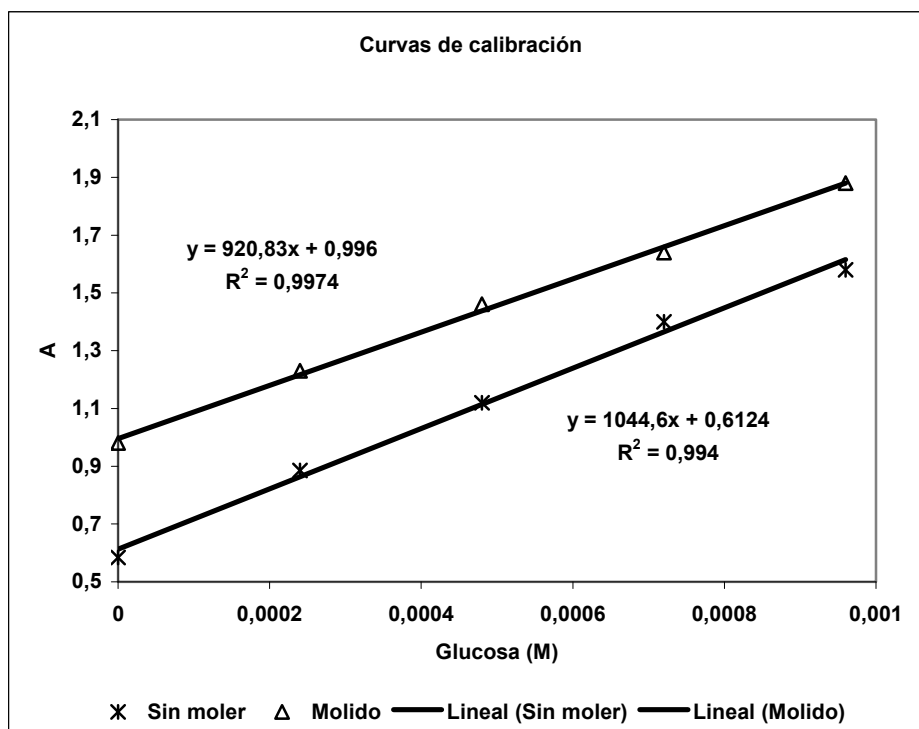
En la tabla 13 se presentan los valores obtenidos de absorbancias en función de la concentración de glucosa en el análisis de suelo molido y sin moler.

**Tabla 13:** Curvas de calibración de glucosa usando suelo molido y sin moler.

Concentración de glucosa M	Suelo sin moler	Suelo molido
	A	A
0	0,584	0,980
0,000240	0,885	1,230
0,000480	1,120	1,460
0,000720	1,400	1,640
0,000960	1,580	1,880

En la figura 14 se representan las curvas de calibración correspondientes al suelo sin moler y molido. De cada una de estas curvas se utilizó el valor de la pendiente b y el punto de intersección a, para determinar la medida de glucosa liberada por la actividad celulasa del suelo.

**Figura 14.** Curvas de calibración para suelos de granulometrías  $\leq 2,0$  y  $\leq 0,21$  mm.



En la tabla 14 se presentan los valores obtenidos de absorbancia de las muestras de suelo molido y sin moler con carboximetil- celulosa (CMC) como sustrato.

**Tabla 14:** Valores de absorbancia en las medidas de la glucosa producida por la acción de la celulasa en suelos molidos y sin moler medidas a 540 nm.  
Sustrato carboximetilcelulosa.

	<b>Suelo sin moler</b>	<b>Suelo molido</b>
<b>Muestra</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
R1	0,800	1,280
R2	0,805	1,290
R3	0,820	1,285
R4	0,845	1,288
R5	0,830	1,300

En la tabla 15 se presentan los resultados de los valores de las medidas de la actividad celulasa para material molido y sin moler.

**Tabla 15:** Valores de actividad celulasa determinada para muestra de suelo sin moler y molido.

<b>Actividad (<math>\mu\text{g}</math> de glucosa / g de suelo * h de incubación)</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Suelo sin moler</b>	<b>Suelo molido</b>
1	0,90	1,54
2	0,92	1,60
3	1,00	1,57
4	1,11	1,59
5	1,04	1,65
Promedio:	1,00	1,59
S:	0,09	0,04
CV:	8,8	2,5

Tomando en cuenta estos resultados se observa que para el suelo molido se obtiene mayor medida de actividad, menor desviación estándar y, por consiguiente menor coeficiente de variación que en suelo sin moler. Por tanto se puede afirmar que la molienda de la muestra conduce a mayor sensibilidad y precisión en la medida de la actividad enzimática para la celulasa.

### **VII.7 Estudio del efecto del pH sobre la actividad enzimática de la celulasa del suelo.**

Se realizó con el objeto de establecer el pH de máxima actividad de la enzima en las condiciones experimentales de su determinación.

Para ello se procedió del siguiente modo:

A suelo molido y tamizado para que pase a través de un tamiz de 0,21 mm se le determinó la actividad enzimática a cinco valores distintos de pH de incubación (5,0; 5,4; 6,0; 7,0 y 8,0). Para cada pH se hicieron 5 réplicas los valores de concentración de glucosa, necesarios para el cálculo de la actividad, se obtuvieron relacionando las absorbancias leídas con 5 curvas de calibración hechas para cada pH.

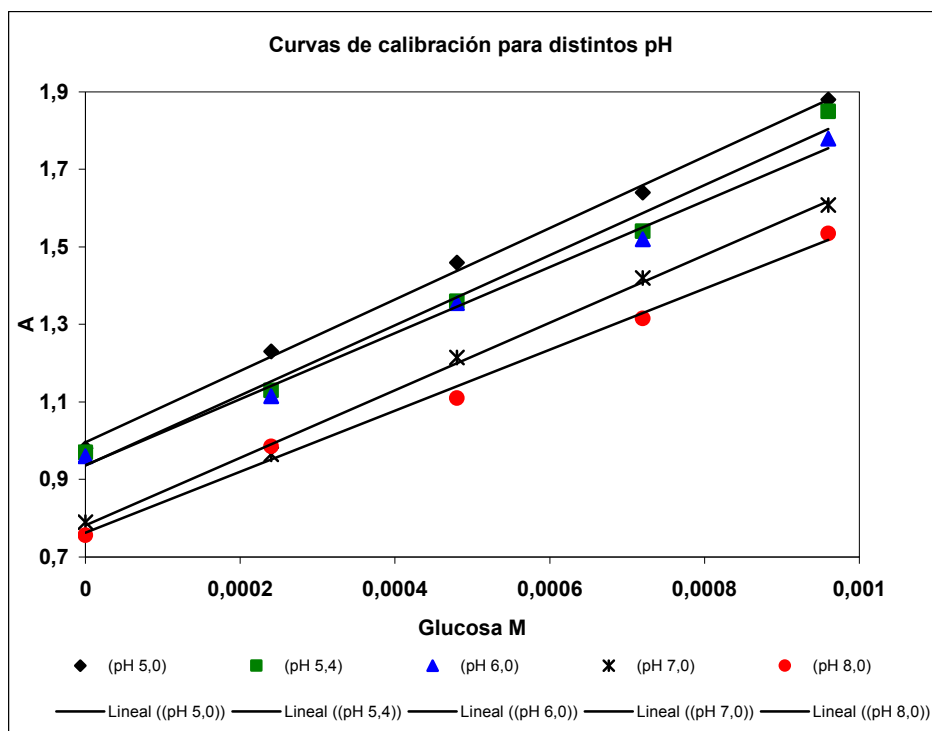
En la tabla 16 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para cada curva de calibración.

**Tabla 16:** Curvas de calibración de glucosa para los cambios de pH.

Concentración de glucosa M	Absorbancia				
	(pH 5,0)	(pH 5,4)	(pH 6,0)	(pH 7,0)	(pH 8,0)
0	0,980	0,970	0,960	0,790	0,756
0,000240	1,230	1,130	1,115	0,965	0,985
0,000480	1,460	1,360	1,355	1,215	1,110
0,000720	1,640	1,540	1,520	1,420	1,315
0,000960	1,880	1,850	1,780	1,608	1,535

En la figura 15 se presentan las curvas de calibración correspondientes a cada valor de pH. De cada una de estas curvas se utilizó el valor de la pendiente b y el punto de intersección a, para determinar la medida de glucosa liberada por la actividad celulasa del suelo.

**Figura 15:** Curvas de calibración para glucosa correspondiente a los cambios de pH.



En la tabla 17 se presentan los valores obtenidos de absorbancia para las determinaciones de actividad enzimática hechas por quintuplicado para cada valor de pH.

**Tabla 17:** Valores de absorbancia en las medidas de la glucosa producida por la acción de la celulasa en los cambios de pH medidas a 540 nm. Sustrato CMC.

Muestras	Absorbancia				
	pH 5,0	pH 5,4	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0
R1	1,280	1,220	1,168	0,998	0,925
R2	1,290	1,235	1,175	1,015	0,935
R3	1,285	1,248	1,188	1,025	0,948
R4	1,288	1,255	1,195	1,030	0,955
R5	1,300	1,258	1,200	1,040	0,968

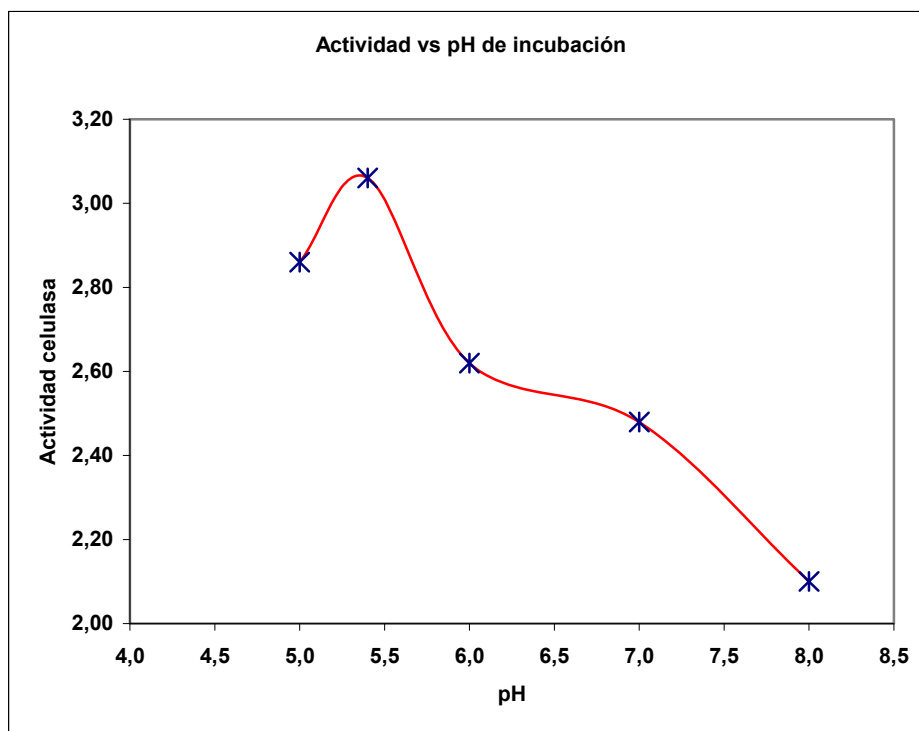
En la tabla 18 se presentan los resultados calculados de la medida de la actividad celulasa del suelo para los diferentes pH de incubación estudiados.

**Tabla 18:** Valores determinados de actividad enzimática para distintos pH de incubación.

pH	Actividad ( $\mu\text{g}$ de glucosa / g de suelo * hora de incubación)					Promedio	S	CV
5,0	2,77	2,87	2,82	2,85	2,97	2,86	0,07	2,44
5,4	2,83	2,98	3,11	3,17	3,2	3,06	0,15	4,9
6,0	2,44	2,51	2,65	2,72	2,78	2,62	0,14	5,34
7,0	2,24	2,41	2,52	2,57	2,67	2,48	0,16	6,45
8,0	1,86	1,97	2,12	2,2	2,35	2,10	0,19	9,05

En la figura 16 se presentan los valores determinados de la actividad celulasa del suelo en función de los cambios de pH de incubación. Se observa un máximo de actividad enzimática para pH aproximadamente 5,3 coincidente con lo ya encontrado por Deng y Tabatabai (1994) y Schinner y von Mersi (1990) quienes indican que la actividad máxima se obtiene a pH 5,5, y también a medida que aumenta el pH disminuye la actividad celulasa debido a que hay menor interacción entre el sustrato y la enzima.

**Figura 16:** Cambios de pH en función de la actividad celulasa.



### **VII.8 Efecto de la temperatura de incubación del suelo sobre la actividad enzimática de la celulasa.**

Este ensayo se realizó para evaluar el comportamiento del complejo enzimático presente en el suelo a distintas temperaturas. Las temperaturas de 20, 40 y 60 °C han sido seleccionadas teniendo en cuenta la temperatura frecuente para el suelo en nuestra zona, la temperatura a la cual se hacen las determinaciones de actividad enzimática y la temperatura que algunos autores señalan como de máxima actividad para la enzima, respectivamente.

Para ello se procedió del siguiente modo:

Al suelo molido y tamizado para que pase a través de un tamiz de 0,21 mm se le determinó la actividad enzimática a tres valores distintos de temperatura de incubación (20, 40 y 60 °C). Para cada temperatura se hicieron 5 réplicas los valores de concentración de glucosa, necesarios para el cálculo de la actividad, se



obtuvieron relacionando las absorbancias leídas con 3 curvas de calibración hechas una para cada una de las temperaturas seleccionadas.

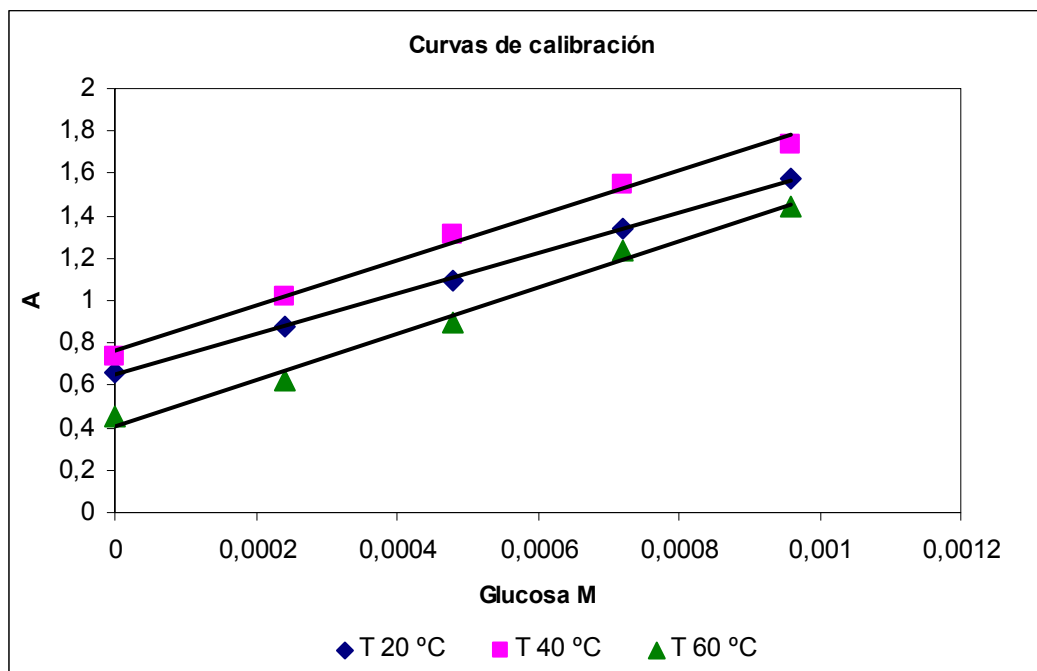
En la tabla 19 se presentan los valores de absorbancia en función de la concentración de glucosa obtenidos para las curvas de calibración.

**Tabla 19:** Curvas de calibración de glucosa para los cambios de temperatura.

<b>Concentración de glucosa M</b>	<b>Absorbancia</b>		
	<b>20 °C</b>	<b>40 °C</b>	<b>60 °C</b>
0	0,658	0,735	0,450
0,000240	0,880	1,015	0,620
0,000480	1,090	1,310	0,900
0,000720	1,340	1,550	1,240
0,000960	1,580	1,740	1,440

En la figura 17 se representan las curvas de calibración correspondientes a las distintas de temperaturas de incubación. De cada una de estas curvas se utilizó el valor de la pendiente b y el punto de intersección a, para determinar la medida de glucosa liberada por la actividad celulasa del suelo.

**Figura 17:** Curvas de calibración para glucosa correspondiente a los cambios de temperatura de incubación del suelo.



En la tabla 20 se presentan los valores de absorbancia obtenidos para cada temperatura de incubación del suelo usando carboximetilcelulosa como sustrato.

**Tabla 20:** Valores de absorbancia en las medidas de la glucosa producida por la acción de la celulasa en los cambios de temperatura de incubación del suelo medidas a 540 nm. Sustrato carboximetilcelulosa.

Muestras	Absorbancia		
	T 20 °C	T 40 °C	T 60 °C
R1	0,860	1,130	0,650
R2	0,877	1,148	0,600
R3	0,885	1,160	0,640
R4	0,898	1,155	0,610
R5	0,900	1,170	0,630

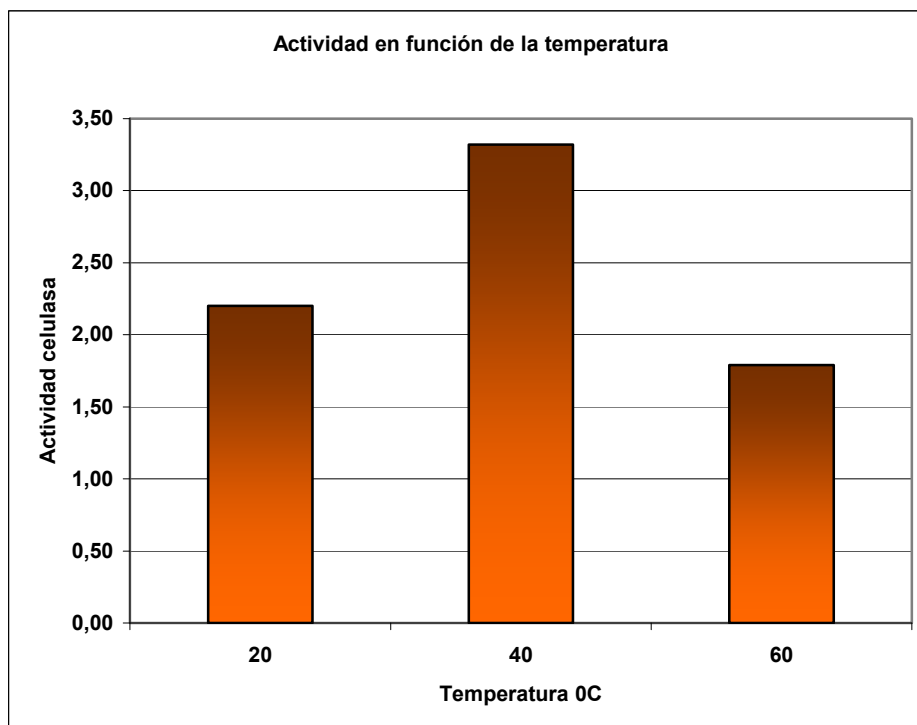
En la tabla 21 se presentan los resultados calculados de la medida de la actividad celulasa en los cambios de temperatura de incubación del suelo.

**Tabla 21:** Valores determinados de actividad en los cambios de temperatura de incubación del suelo trabajando por quintuplicado.

Temperatura (°C)	Actividad ( $\mu\text{g}$ de glucosa / g de suelo * h de incubación)					Promedio	S	CV
20	1,98	2,13	2,21	2,33	2,35	2,20	0,15	6,82
40	3,13	3,28	3,38	3,34	3,47	3,32	0,13	3,92
60	1,99	1,58	1,91	1,66	1,83	1,79	0,17	9,50

En la figura 18 se representan los valores determinados de la actividad celulasa en función de la temperatura de incubación del suelo. En ella se observa un máximo para 40 °C lo cual contradice lo señalado por Deng (1994) quien informa haber encontrado máxima actividad a 60 °C. Aun a 20 °C se encontró que la actividad es 23 % mayor que a 60 °C.

**Figura 18:** Cambios de temperatura en función de la actividad celulasa.



## VIII. CONCLUSIONES.


- El análisis de las distintas porciones del fraccionamiento granulométrico del suelo mostró la gran variabilidad existente entre ellas. Esta es sin dudas una de las principales causas de la dispersión de los valores que se observa al analizar distintas fracciones de un mismo material cuando se trabaja con partículas de tamaño variable hasta de 2 mm.
- Se verificó la hipótesis propuesta ya que al disminuir el tamaño de las partículas del material sometido al análisis aumentó significativamente la sensibilidad y precisión del método. Lo primero se debe probablemente al mejor contacto entre la enzima y el sustrato y lo segundo a la mayor homogeneidad del material de ensayo.
- Para las 3 temperaturas de incubación estudiadas, 20, 40 y 60 °C, la temperatura de 40 °C es la más adecuada tanto desde el punto de vista de la sensibilidad como de la precisión.
- Se encontró que, para la incubación a pH 5,0 y 37 °C durante 24 horas, trabajando con partículas de tamaño  $\leq 0,2$  mm se obtiene, respecto al trabajo con partículas de tamaño  $\leq 2$  mm, un incremento en la sensibilidad del 60 % que, unido a la disminución de la desviación estándar de las medidas en esas condiciones, se logra un importante aumento en la precisión ya que el coeficiente de variación, CV, disminuye en un 72 %.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Álvarez, G. A. 2003. **Determinación de las actividades celulasa e invertasa del suelo**. En: García. I. C, Gil S. F, Hernández. F. T, Trasar C. C., Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en suelos: Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana Mundi-Prensa Madrid Barcelona México, 153 - 160.
2. Bailey, R. W. 1958. **The Reaction of Pentoses with Anthrone**. Biochem. J, 68 (4), 669 – 672.
3. Bianchi, G., Contreras, F. A., Rondón, C., Calderón, Y. y Albarrán, M. 2008. **La molienda de la muestra como recurso para incrementar la precisión en la medida de algunas actividades enzimáticas en suelos**. En: XXI Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, San Luis, Argentina. Mayo 2008.p 152.
4. Charpentier, M. 1968. **Degradation de la cellulose dans le sol**. Mecanismes enzymatiques (Rapport général). Annales de l'Institut Pasteur, 115, 487 – 537.
5. Cámara, C. 2002. **Toma y Tratamiento de Muestras**. Editorial Síntesis. Madrid, España, 46 – 71.
6. Deng, P. S. y Tabatabai, A. M. 1994. **Cellulase Activity of Soils**. Soil Biol. Biochem, 26, (10), 1347 - 1354.
7. Gander, K. L. y Hendricks. W. C. 1994. **Interferences, Limitations and an Improvement in the Extraction and Assessment of Cellulase Activity in soil**. Soil Biol. Biochem, 26, 65 - 73.
8. García Álvarez, A. e Ibánes, J. J. 1944. **Seasonal Fluctuation and Crop influence on microbiota and enzyme activity in Fully developed Soils of Central Spain**. Arid Soil Research and Rehabilitation, 8, 161 – 178.
9. Ghose, K. T. 1987. **Measurement of Cellulase Activities**. Pure & Appl. Chem, 59, (2), 257 - 268.
10. Gil-Sotres, F. 2004. **Different Approacges to Evaluating Soil Quality Using Biochemical Properties**. Soil Biology y Biochemistry, 37, 87 – 887.
11. González, M. G., Gallardo, J. F., Cecannti, B., Moreno, G. y Comese, R. 2008. **Degradación del suelo: Uso de indicadores enzimáticos**. En: XXI Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, San Luis, Argentina. Mayo 2008.p 227.

12. Hayano, K. 1986. **Cellulase Complex in A Tomato Field Soil: induction, localization and some properties.** Soil Biology y Biochemistry, 18 (2), 215 – 219.
13. Karlen, D. L., Mausbach, M. J., Doran, J. W., Cline, R. G., Harris, R. F., Schuman, G. E. 1997. **Soil Quality: a concept, definition, and framework for evaluation.** Soil Science Society of America, 61, 4 -10.
14. Lehninger, A. L. 1995. **Bioquímica.** Ediciones Omega, S.A. Barcelona, 202 - 203.
15. Nannipieri, P. y Landi, L. 1996. **Soil Enzymes.** Soil Biology y Biochemistry, 129 – 130.
16. Nelson, N. 1944. **A Photometric Adaptation of The Somogyi Method for The Determination of Glucose.** Journal of Biological Chemistry, 375 -380.
17. Prado, E. F., González, J. A., Boero C. y Sanpietro, A. R. 1998. **A Simple and Sensitive Method for Determining Reducing Sugars in Plant Tissues. Application to Quantify the Sugar Content in Quinoa.** Phytochemical Analysis, 9, 58 - 62.
18. Skujins, J. 1976. **Extracelular Enzymes in Soil.** Crit. Rev. Microbiol, 4, 383 – 421.
19. Schinner, F. y von Mersi, W. 1990. **Xylanase, CM- Cellulase and Invertase Activity in Soil: an improved method.** Soil Biol. Biochem, 22 (4), 511- 515.
20. Somogyi, N. A. 1945. **A New Reagent for the Determination of Sugar.** J. Biol. Chem, 160, 61 - 68.
21. Spiro, R. G. 1966. **Analysis of Sugars Found in Glycoproteins.** In Methods in Enzymology (E. F. Neufeldand y V. Ginsburg, Ed), 8, 3 – 19. Accademic Press, New York.
22. Vogelgesang, J. **Kalibo.** [disquete]. Versión 1.2ª. 16-07-1994. Bruselas. Programa computacional.
23. Wood, T. M. y Bhat, K. M. 1988. **Methods for Measuring Cellulase Activities.** In Methods in Enzymology (W Wood y S. T Kellogg, Eds), 160, 87 – 112 Academic Press, New York.

# **ANEXOS**

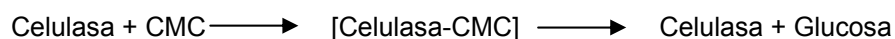
 <b>L.I.A.Q.I.A.</b> Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 1 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 1. OBJETIVO

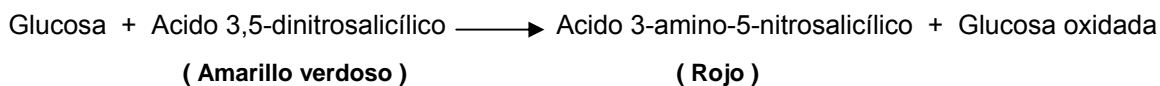
Definir el procedimiento a seguir para la determinación de la actividad celulasa en suelos, basado en la determinación espectrofotométrica de la glucosa liberada por la hidrólisis de la carboximetilcelulosa (CMC) usada como sustrato y el ácido 3,5-dinitrosalicílico como reactivo cromogénico.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Una muestra de suelo se mantiene en contacto con una solución de carboximetilcelulosa de pH 5 durante 24 horas a una temperatura de 37 °C. La celulasa presente en el suelo cataliza la hidrólisis de la carboximetilcelulosa liberando glucosa en una reacción que puede esquematizarse como:



La glucosa liberada es cuantificada por espectrofotometría con ácido 3,5-dinitrosalicílico el cual reacciona con ella para generar 3-amino-5-nitrosalicílico que colorea de rojo a la solución. La reacción puede formularse como:



Haciendo uso de la curva de calibración, ya sea gráficamente o por medio de la ecuación que la describe, se calcula la actividad enzimática expresándola en  $\mu\text{g}$  de glucosa por gramo de suelo seco por hora de incubación. ( $\mu\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ).




### **3. ALCANCE**

El método es aplicable a la determinación de la actividad celulasa en suelos agrícolas con contenidos de MO entre 1 y 4 % y actividad celulasa no mayor de 40  $\mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Para actividades mayores deberá disminuirse proporcionalmente el tiempo de incubación y/o la cantidad de muestra.

### **4. INSTRUMENTOS**

- Balanza analítica con precisión de  $\pm 0,1$  mg.
- Espectrofotómetro Ultravioleta / Visible (340 - 650) nm
- Baño Termostático. Rango de temperatura (-10 °C a 120 °C ). Regulación ( $\pm 0,5$  °C).
- Mortero de porcelana mecánico.

 <p>L.I.A.Q.I.A. Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química</p>	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 2 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 5. MATERIALES

- Tamices con aberturas de 2,0 y 0,21 mm.
- Vasos de precipitado de 100, 150 y 250 mL.
- Matraces aforados de 25, 50, 100, 250 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 mL.
- Embudo de vástago largo
- Erlenmeyers de 50 mL.
- Tubos de ensayo para reacción y medida fotométrica Pyrex N° 9820.
- Papel de filtro cualitativo
- Recipientes de vidrio y polietileno para soluciones de reactivos.
- Espátula

## 6. REACTIVOS

- Ácido acético. p.a.
- Ácido 3,5 – dinitrosalicílico.
- Acetato de sodio anhidro. p.a.
- Carboximetilcelulosa.
- D (+) – Glucosa anhidra, CAS.
- Hidróxido de sodio. p.a.
- Sulfito de sodio. p.a.
- Tartrato de sodio y potasio. p.a.


## **7. PREPARACION DEL SUELO.**

### **7.1. Secado.**

El suelo, tamizado con tamaño de partícula  $\leq 2$  mm., es secado a temperatura ambiente con una corriente suave de aire seco. Se lo conserva en frascos de vidrio de 1 Kg. de capacidad a  $3 - 4$  °C.

### **7.2. Molienda y tamizado.**

En el momento de su análisis una porción no menor de 500 g del suelo seco, previamente homogeneizada, se somete a molienda en un mortero mecánico hasta que toda ella pasa por un tamiz de apertura de 0,2 mm.

 <p>L.I.A.Q.I.A. Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química</p>	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 3 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 8. PREPARACION DE SOLUCIONES

### 8.1. Solución para el desarrollo del color. (Solución de DNS)

En un vaso de precipitados de 150 mL de capacidad disolver, en 60 mL de agua destilada, lentamente y con agitación continua, 1,0 g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico. Adicionar 1,0 g de hidróxido de sodio disuelto en un pequeño volumen de agua destilada, 30 g de tartrato de sodio y potasio, 0,20 g de fenol, 50 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Agitar hasta completa disolución. Trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL y se llevar a volumen con agua destilada. Almacenar en una botella de vidrio al abrigo de la luz indicando la fecha de preparación.

### 8.2. Solución buffer de pH 5,0 (0,2 M en acetato).

Disolver en 900 mL de agua destilada 16,4 g de acetato de sodio y agregar 11,4 mL de ácido acético concentrado. Homogeneizar bien y medir el pH. De no ser 5,0, ajustarlo a ese valor mediante la adición de solución de 2 M de NaOH o 2 M de HCl según sea el caso. Llevar a volumen final de 1000 mL. Almacenar en un envase de plástico indicando la fecha de preparación.

### **8.3. Solución $3 \times 10^{-3}$ M de glucosa.**


Disolver 0,1425 g de glucosa en aproximadamente 100 mL de solución buffer llevándose finalmente a 250 mL.

### **8.4. Soluciones de referencia (Glucosa: 0,60; 1,20; 1,80; y $2,40 \times 10^{-3}$ M).**

En sendos matraces aforados de 25 mL se colocan 5, 10, 15 y 20 mL de la solución  $3 \times 10^{-3}$  M de glucosa y se llevan a 25 mL con solución buffer de pH 5.

### **8.5. Solución 0,2 % de carboximetilcelulosa (CMC).**

Disolver 0,5 g de CMC en solución buffer de pH 5,0 llevando a volumen final de 250 mL.

 <b>L.I.A.Q.I.A.</b> Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 4 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 9. PROCEDIMIENTO DE ANALISIS.

### 9.1. Incubación del suelo.

#### 9.1.1. Para la curva de calibración.

En cada uno de 5 erlenmeyers de 50 mL de capacidad se colocan 5,0 g de suelo seco, tamizado a un tamaño  $\leq 0,2$  mm. A 1 de ellos se le agrega 10 mL de solución buffer de pH = 5,0. A los 4 restantes se les adiciona 10 mL a cada de uno de los patrones de glucosa preparados.

#### 9.1.2. Para las muestras.

Colocar 5,0 g de muestra suelo seco, tamizado a un tamaño  $\leq 0,2$  mm., en un erlenmeyer de 50 mL de capacidad y agregarle 10 mL de solución de CMC 0,2 % preparada en solución buffer de pH = 5,0.


El conjunto de erlenmeyers, tanto los correspondientes a la curva de calibración como los que contienen las muestras, se coloca en baño termostático a 37 °C durante 24 horas.

### 9.2. Desarrollo del color y su medida.

Transcurrido el tiempo indicado se toman 5 mL de solución sobrenadante de cada uno de los erlenmeyers que se colocan en sendos tubos de centrifuga y se los centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

En tubos de reacción, aptos para ser usados como celdas para mediciones fotométricas, se colocan 3,0 mL de solución buffer en el primero y 3,0 mL de solución de cada una de las soluciones centrifugadas en los demás.

A cada uno de ellos se les adicionan 3,0 mL de solución de DNS y se colocan en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos. A continuación se enfrían rápidamente en agua con hielo hasta temperatura ambiente y se miden las absorbancias de cada una de las soluciones a 540 nm usando como blanco el primer tubo, cuya solución nunca estuvo en contacto con suelo.

 <b>L.I.A.Q.I.A.</b> Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 5 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 10. CALCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS.

Los valores de absorbancia medidos para la curva de calibración son graficados en función de las concentraciones de los patrones preparados, de 0,0 a  $2,4 \times 10^{-3}$  M, o evaluados por regresión lineal. Por cualquiera de las dos vías se calculan los valores de intercepción, a, y pendiente de la recta, b, los cuales son utilizados para los cálculos de actividad de las muestras con la ecuación:

$$\text{Actividad} = \frac{(A - a) \times 1,9 \times 10^5}{b \times g \times h}$$

Donde:

Actividad: En  $\mu\text{g}$  de glucosa x g de suelo x h de digestión.

A: Absorbancia.

a: Valor del punto de intercepción de la curva de calibración.

b: Valor de la pendiente de la curva de calibración.

g: masa de la muestra, en gramos.

h: Tiempo empleado en la incubación, en horas.

Si se quieren expresar los resultados en términos de **milimoles  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$**  la expresión correspondiente será:

$$\text{Actividad} = \frac{(A - a) \times 10}{b \times g \times h}$$



Donde:

Actividad: En  $\mu\text{g}$  de glucosa x g de suelo x h de digestión.


A: Absorbancia.

a: Valor del punto de intercepción de la curva de calibración.

b: Valor de la pendiente de la curva de calibración.

g: masa de la muestra, en gramos.

h: Tiempo empleado en la incubación, en horas.

 <p>L.I.A.Q.I.A. Universidad de Los Andes Facultad de Ciencias Departamento de Química</p>	<b>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO</b>	Código:00.00.00 Elaborado por: Aprobado por: Fecha: Revisado: Página: 6 de 6
	<b>Determinación de actividad celulasa en suelos</b>	

## 11. REFERENCIAS.

1. Bianchi, G., Contreras, F. A., Rondón, C., Calderón, Y. y Albarrán, M. 2008. **La molienda de la muestra como recurso para incrementar la precisión en la medida de algunas actividades enzimáticas en suelos.** En: XXI Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, San Luis, Argentina. Mayo 2008.p 152.
2. Ghose, K. T. 1987. **Measurement of Cellulase Activities.** Pure & Appl. Chem, 59, (2), 257 - 268.
3. Gil-Sotres, F. 2004. **Different Approaches to Evaluating Soil Quality Using Biochemical Properties.** Soil Biology y Biochemistry, 37, 87 – 887.
4. González, M. G., Gallardo, J. F., Cecananti, B., Moreno, G. y Comese, R. 2008. **Degradación del suelo: Uso de indicadores enzimáticos.** En: XXI Congreso Argentino de Ciencia del Suelo, San Luis, Argentina. Mayo 2008.p 227.
5. Wood, T. M. y Bhat, K. M. 1988. **Methods for Measuring Cellulase Activities.** In Methods in Enzymology (W Wood y S. T Kellogg, Eds), 160, 87 – 112 Academic Press, New York.