



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

REVISTA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES PESQUERAS



ANALISIS POR RADIATIVACION EN ENSILADO DE PESCADO¹

VÍCTOR H. BERTULLO² y OSVALDO A. DI LANDRO³

INTRODUCCION

Con motivo de la exposición "Átomos en acción", realizada en Montevideo (Uruguay), en el lapso 2 de noviembre de 1963 a 7 de diciembre de 1963, y que fuera patrocinada por las Comisiones de Energía Atómica de los EE.UU. y del Uruguay respectivamente, se cursó invitación a científicos docentes de la Universidad, a los efectos de trabajar con el Reactor LNP (Lockheed Nuclear P.) de 10 k.w. en algún trabajo inédito de investigación de interés a alto nivel científico.

El Director del Instituto de Investigaciones Pesqueras del Uruguay, Prof. Dr. Víctor H. Bertullo, presentó al Prof. Donald G. Rose, Director del Programa del Reactor de la mencionada exposición, el posible estudio de "Análisis por radiactivación en ensilado de pescado" siendo dicho tema de inmediato aceptado, atento al interés en el orden científico-investigativo como asimismo en el orden de lo económico-nacional.

La síntesis del trabajo realizado, se expone brevemente en las siguientes páginas, en las cuales podrá apreciarse un bosquejo en el mínimo posible de extensión, acerca de los sucesos —a nuestro entender— más importantes sobre este método radioquímico que sirviera de fundamento a nuestra experiencia.

Los autores han dividido el trabajo bajo un punto de vista dualista en sus aspectos, a saber:

1. Presentado para su publicación en marzo de 1966.

2. Profesor de Tecnología de los Productos de la Pesca. Director del Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay.

3. Radiólogo. Biofísico del Instituto de Investigaciones Pesqueras y Profesor Adjunto de Biofísica de la Facultad de Veterinaria de Montevideo, Uruguay.

- I) Aspecto biofísico, a cargo del Prof. Dr. Osvaldo A. Di Landro.
- II) Aspecto biobromatológico, a cargo del Prof. Dr. Víctor H. Bertullo.

Finalmente, se exponen como "Conclusiones", las resultancias de la metodología estudiada por ambos profesores.

I) ASPECTO BIOFISICO

Principios sobre el método

1.1. El análisis por radiactivación, es un método de análisis químico (cualitativo y/o cuantitativo) de gran sensibilidad, de técnicas rápidas, y destinado especialmente a la especificación de pequeñas trazas de material y que se basa en la detección de radionúclidos característicos, generados en el seno de la sustancia analizada sometida a un intenso flujo de partículas bombardeantes.

1.2. Por razones de orden técnico, la fuente preferida para la irradiación, productora de neutrones, son hoy día los reactores atómicos; pero, asimismo otras fuentes productoras de partículas bombardeantes pueden ser empleadas, por ejemplo: ciclotrones, betatrones y aceleradores lineales.

1.3. Quizá los primeros trabajos usando el método en cuestión, hayan sido los de Hevesy y Ievi, en 1938, estudiando muestras y analizando Ytrium; más tarde, Glenn T. Seaborg (Premio Nobel y actual Presidente de la Comisión de Energía Atómica de los EE.UU.) junto a Livingood, demostraron contaminación de Gallium en Fe después del bombardeo de éste en el ciclotron; King y Henderson, en 1939, detectan trazas de cobre en plata; Tobias, Brues y Robertson, en 1947, emplean el análisis de radiactivación para el estudio de elementos trazas en tejidos biológicos y también en el año 1947, Overman y Clark, trabajando en métodos analíticos en el Laboratorio Nacional de Oak Ridge (EE.UU.) impusieron por primera vez el término de: radiactivación análisis, el que muchas veces es abreviado por comodidad por el de análisis de activación, análisis por activación neutrónica, etc.

1.4. El fundamento del método se basa en la producción de uno o varios radioisótopos como consecuencia de la captura de neutrones por los núcleos de la sustancia a estudio, y posteriormente la determinación característica de la radiactividad inducida en la muestra.

1.5. Surge de hecho, una de las limitaciones al método de radiactivación: *que el isótopo producido no sea radiactivo.*

1.6. El proceso, es en general una reacción (n, γ), es decir, que tras la captura de un neutrón se emite un rayo γ de energía, igual a la de enlace del neutrón más su energía cinética perdida.

1.7. En otras palabras, el fundamento del método: los átomos irradiados de la sustancia a estudio, son hechos radiactivos por los neutrones; dichos átomos se desintegran "decay", emitiendo radiaciones electromagnéticas de alta energía, que son los llamados rayos gamma; estos rayos gamma son posteriormente analizados, poniéndose en evidencia sus energías y también su media vida "half-lives" de los núcleos radiactivos. Hoy día, se encuentran con facilidad publicaciones especiales tabuladas, verdaderos "patrones" —patterns— en los cuales se identifican de manera muy simple dichos elementos provocados.

1.8. Es importante resaltar que las resultancias del análisis de radiactivación depende de las reacciones nucleares, las que son completamente independientes de las combinaciones químicas atómicas; y, siendo así, las tabulaciones patrones aludidas "ut supra", sólo identificarán elementos químicos, pero no compuestos químicos.

1.9. Hoy día, la multiplicación de reactores nucleares —fuente especialísima, recalamos, para la irradiación— ha dado gran incremento a este método de análisis radioquímico, que, aunque es menos exacto que otras técnicas analíticas, las supera a aquéllas por la especificidad y por la simpleza de las manipulaciones químicas, que vuelcan a su favor el hecho de la poca interferencia con otras sustancias extrañas.

1.10. Y, así como observando el espectro característico de una sustancia problema, podemos llevar a cabo su identificación; también podemos identificar la naturaleza de un núcleo radiactivo, mediante el análisis de su espectro de rayos gamma, mediante el aparato llamado espectrómetro de rayos gamma.

1.11. El análisis por radiactivación tiene en su contra dos grandes limitaciones:

- A) que el isótopo producido no sea radiactivo (1.5);
- B) que la "sección eficaz" (cross section: σ) de captura de neutrones por la sustancia a estudio, sea muy pequeña.

1.12. Cuando una sustancia es sometida a un flujo de neutrones lentos, en dicha operación se producen dos procesos:

- a) *crecimiento de la radiactividad*, la que depende a su vez de dos factores: 1) flujo de la radiación; y 2) la sección eficaz (cross section: σ : superficie aparente de un núcleo atómico, sometido al bombardeo de un neutrón cuya unidad es el barn $\cong 10^{-24}$ cm²);
- b) *la desintegración* (Decay), que depende de la vida media "half-lives" del radioisótopo formado.

1.13. La cantidad de radiactividad presente en un tiempo dado durante la exposición, puede ser expresada por la siguiente ecuación, obtenida de las leyes de crecimiento y desintegración radiactiva, respectivamente (1.12):

$$A = \frac{G(6,02 \times 10^{23}) f \sigma (1 - e^{-\lambda t}) (\Theta)}{M}$$

en la cual,

- A = desintegraciones por segundo del radioisótopo formado;
- G = gramos de la composición isotópica natural de elemento en la muestra;
- f = flujo de partículas bombardeantes en unidades de partículas/cm²/seg.;
- σ = sección eficaz de reacción nuclear en unidades de cm²/blanco atómico —"target"—;
- λ = constante de desintegración radiactiva;
- t = tiempo de exposición de la muestra a estudio;
- Θ = abundancia fraccional del isótopo "blanco" —target— en abundancia natural;
- M = peso atómico del elemento.

Por substitución de valores conocidos en la ecuación precedente, es posible calcular "G" —gramos— de un elemento problema. Caso éste ya, de evaluación cuantitativa en análisis por radiactivación.

1.14. Sin embargo, es mucho más práctico calcular "G", mediante el uso de una muestra comparativa (patrón) conteniendo una cantidad conocida del elemento a ser determinado, la cual es simultáneamente expuesta al mismo flujo y tratada en idénticas condiciones (geometría, etc.) que aquella a analizar, es decir, la muestra problema.

2.1. El personal técnico del Instituto de Investigaciones Pesqueras, de la Facultad de Veterinaria de Montevideo (Uruguay), que dirige el Prof. Dr. Víctor H. Bertullo, proporcionó seis muestras de ensilado de pescado, de 1 gramo cada una, y que eran perfectamente individualizadas —numeradas— en bolsitas de polietileno.

2.2. La irradiación se verificó en el reactor de la exposición "Átomos en acción" que es un reactor heterogéneo, experimental, LNP (Lockheed Nuclear P.) de 10 k.w., bajo control directo del encargado del mismo, Mr. Donald G. Rose.

2.3. Cada una de las muestras de ensilado de pescado, fueron irradiadas 15 minutos en un flujo "flux" equivalente a: $5,7 \times 10^{10}$ n/cm²/seg. (1.12, a) y (1.13, f).

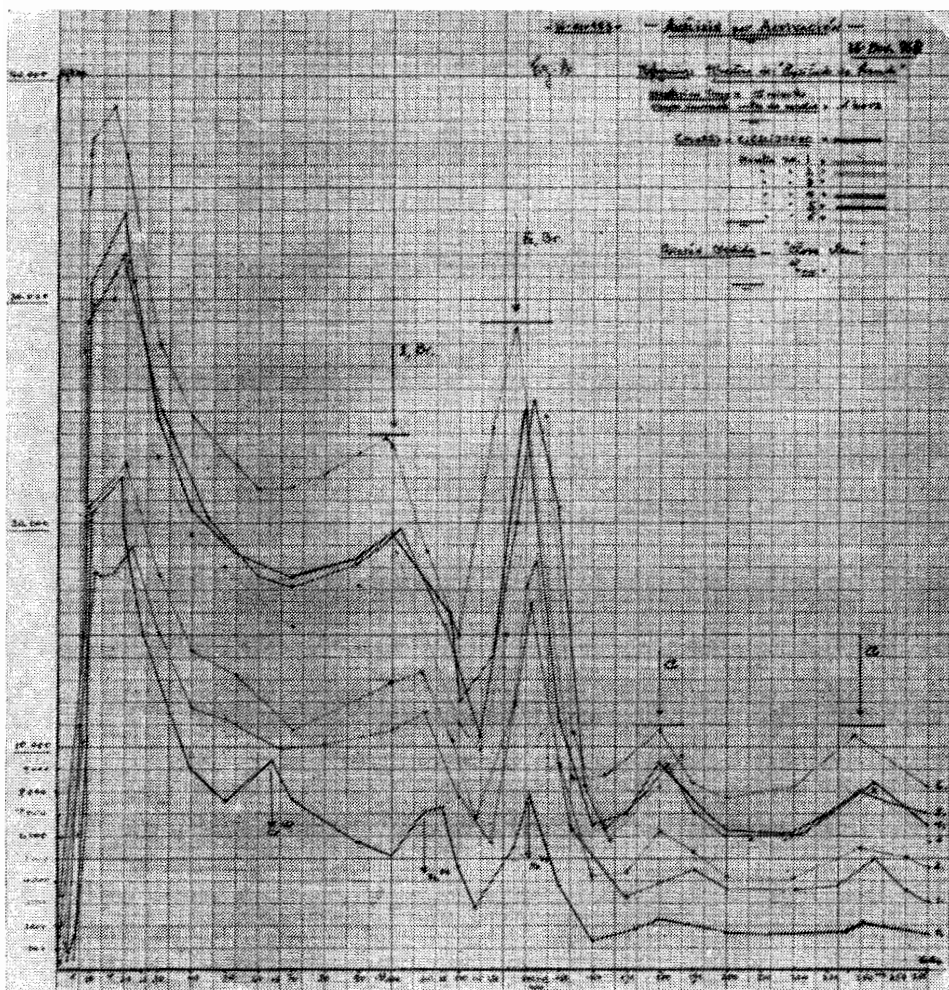
*Espectrometría gamma,
en lo referente a nuestra investigación*

3.1. Calibrado el espectrómetro gamma —también del equipo de aparataje de la exposición "Átomos en acción"—, moderno instrumento electrónico, de varios canales, y referenciado a tres fuentes, a saber: Fe⁵⁹, Cesio¹³⁷ y Na²⁴, con sus característicos picos fotoeléctricos en nuestra investigación, dimos comienzo a las lecturas respectivas —"cuentas"—, 30 minutos "a posteriori" de ser irradiadas las muestras.

3.2. Se verificaron dos lecturas sobre cada muestra, ya que una sola no hubiera sido suficiente para "afinar" el estudio. Una se llevó a cabo, como se expresó, a los 30 minutos consecutivos a la finalización de la irradiación, y otra, a los 60 minutos subsiguientes al primer "conteo".

Lo ideal lo hubiera constituido —a los efectos del mejor "afinamiento" del examen— unas cinco o seis lecturas, espaciadas aproximadamente: a la media hora, a las dos horas, a las doce horas, a las veinticuatro horas, a la semana, etc., consiguiéndose así "purificación" en puntos notables —elementos— del espectro gamma, pero —el Uruguay aún no tiene un solo reactor— eran tantas las investigaciones a realizarse en el corto tiempo de la exposición, que debimos contentarnos con sólo estas dos lecturas.

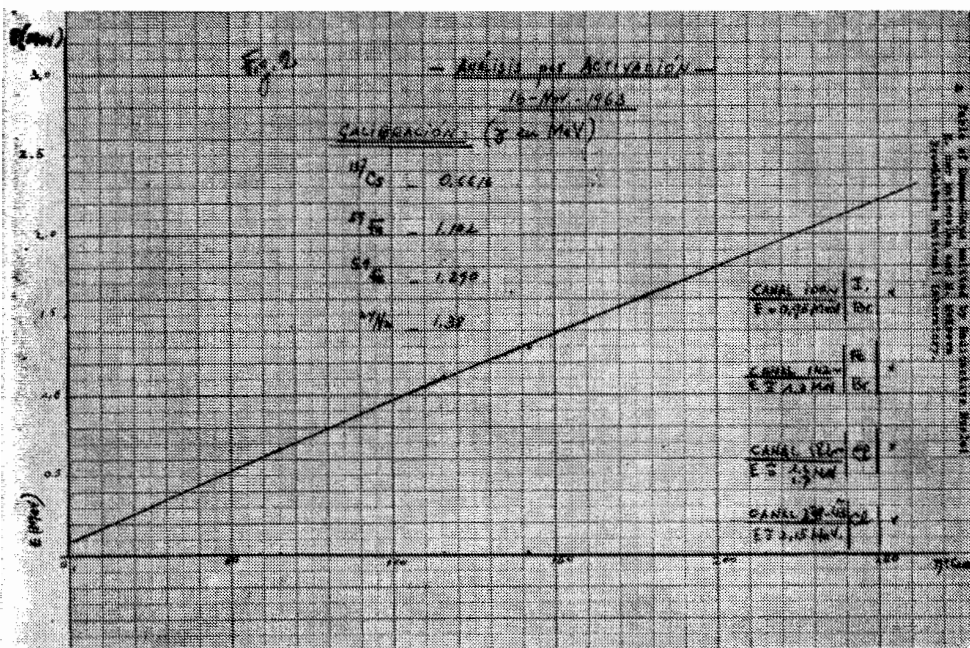
3.3. Graficando los valores obtenidos, según ilustramos en la figura 1, y expersando en un sistema de coordinadas: número de canales



y c.p.m., estando referenciados los valores de la radiación γ en energías de MeV, encontramos como resultado de nuestro análisis de muestras de ensilado de pescado por radiactivación, elementos tales como: I, Br, Fe y Cl (fig. 2).

3.4. La importancia desde el punto de vista bioquímico y bromatológico de dichos elementos, en el material bionutricional analizado, se detalla en el capítulo siguiente.

(Cúpleme agradecer al Br. Alberto Moris, el haber colaborado en el "conteo" de las muestras irradiadas, que nos insumiera un tiempo bastante largo.)



II) ASPECTO BIOBROMATOLOGICO

4.1. El ensilado (fish silage) de pescado y/o sus sinonimias: hidrolizado o bio-proteo-catenolizado de pescado, es el producto que surge de la acción proteolítica de una levadura sobre la carne del pescado, en presencia de una fuente energética, tal como lo son: el azúcar o la melaza de caña de azúcar o de remolacha, escindiendo la molécula proteica en polipéptidos y aminoácidos, los que quedan en solución en la parte líquida del producto.

El proceso se desarrolla a una temperatura no mayor de 37° C. y queda terminado en no más de 72 horas.

4.2. Naturaleza e identificación de las muestras analizadas. En la preparación del producto final se seleccionó como materia prima la merluza (*Merluccius merluccius hubbsi*, Marini) especie ampliamente distribuída en el mundo entero. Por ejemplo, en América del Norte puede capturarse en la parte atlántica (*Merluccius bilinearis*, Mitchil) y *Merluccius albidus*, y en la parte pacífica, zona o costa californiana: *Merluccius productus* (Ayres); en Europa se encuentra, según Le Danois, *Merluccius merluccius* (L.) con sus razas meridional, del Golfo de

Gascuña y Céltica, que de acuerdo a Rodríguez y Alvariño se extienden desde las Islas Faroes al Norte, hasta el Ecuador, pescándose también la merluza negra de Marruecos o *Merluccius senegalensis* (Cob.), etc.

4.3. Los valores promedios de los nutrientes que a continuación se detallan, obtenidos de 92 análisis, dan los siguientes calores en porcentajes:

	Merluza fresca	Ensilado de merluza
Materia seca	20,92	24,89
Humedad	79,05	75,11
Cenizas	2,52	3,19
Proteína cruda	16,33	14,75
Proteína insoluble	11,94	5,69
Proteína hidrosoluble	4,39	9,09
Grasa	2,82	2,10
Fósforo total (P205)	3,98	4,42
Fósforo insoluble en ácido cítrico	1,56	0
Fósforo soluble en ácido cítrico	1,34	1,76
Fósforo hidrosoluble	1,08	2,68
Calcio total	3,44	3,95
Calcio hidrosoluble	0,44	2,98

4.4. La naturaleza del material contenido en cada muestra activada (6) fue el siguiente:

Muestra N° 1: Merluza fresca total. Secada a 100° C. y luego molida.

Muestra N° 2: Merluza fresca, en las mismas condiciones que la anterior, pero de otra partida pescada al mes.

Muestra N° 3: Harina de pescado de merluza, elaborada en el Instituto de Investigaciones Pesqueras del Uruguay, Facultad de Veterinaria.

Cocida durante una hora y treinta minutos a vapor hirviendo (autoclave abierto) y secado a aire caliente con temperatura no mayor de 75° C.

Muestra N° 4: Ensilado de merluza.

Muestra N° 5: Ensilado de merluza.

Muestra N° 6: Ensilado de merluza.

Las muestras 4, 5 y 6 de ensilado de merluza, contenían ensilado preparado en diferentes meses, con especies de merluza pescadas en diferentes épocas.

Todo el material de estas muestras fue tratado en las siguientes condiciones:

Secado, a 100° C., en la estufa de aire caliente, durante 24 horas; luego molido y luego ensacado en las bolsitas de polietileno —1 gramo cada una— a los efectos del análisis por radiactivación.

4.5. Los valores (en porcientos) en lo referente a calcio, fósforo y hierro, contenidos en las muestras activadas, fueron los siguientes:

	Fósforo	Calcio	Hierro
Merluza fresca	6,09	6,14	0,77
Merluza fresca (dif. época pesca)	5,27	4,74	0,74
Harina de pescado (preparada en el Instituto)	6,61	6,33	0,091
Ensilado de merluza	3,72	3,72	0,84
Ensilado de merluza	3,16	4,49	0,47
Ensilado de merluza	5,85	6,83	0,63

CONCLUSIONES

5.1. Las razones de índole bioeconómica, que nos llevaron a realizar el análisis por radiactivación en ensilado de pescado y su comparación en contrapartida con merluza fresca desecada, fueron las siguientes:

a) El hecho de poder elaborar con 4 kilos de pescado 1 kilo de ensilado, en lugar de tener que utilizar de 5,8 a 6,2 kilos de materia prima, para preparar 1 kilo de harina de pescado, lo que significa una economía de 1.8 a 2.2 kilos.

b) La versatilidad del proceso, que permite elaborar desde pequeñas a grandes cantidades de ensilado de pescado, sin necesidad de aparataje complicado y que necesariamente debe ser importado —en nuestro caso— tal cual sucede con las plantas de reducción (harina de pescado).

c) El producto es elaborable con materia prima nacional. Por un lado, el pescado puede capturarse en las zonas inmediatas de nuestra costa y otra ventaja es que la melaza utilizada —subproducto de la industria azucarera— abunda en el Uruguay.

d) El ensilado de pescado, (húmedo) mantenido en lugar fresco, se conserva indefinidamente.

e) Las comprobaciones que hemos efectuado bajo el punto de vista de la productividad y por ende redundando en la economía nacional, en grandes y/o pequeños animales y que se refieren en la positividad de incrementación de leche en los vacunos, lana y pelo en los ovinos y conejos, huevos y carne en aves, etc. Tal es así, que hemos comprobado que 3 kilos de ensilado de pescado sin secar (húmedo) con un contenido proteico de 15 gramos por ciento, substituyen ventajosamente a 1 kilo de harina de pescado, y con una riqueza del 65%. Este hecho se hace más notable, desde el momento en que las comprobaciones fueron efectuadas con pescados (merluzas) provenientes de una misma captura.

5.2. A la luz de los conocimientos actuales en nutrición animal, llama la atención la capacidad de substitución que tiene una misma proteína, según el procedimiento a que haya sido sometida, pues en nuestro caso podemos afirmar en términos generales, que la relación es de 15 a 1.

Lógicamente, pensamos que la proteína del ensilado de pescado, no afectada por tratamientos físicos enérgicos, pudiera mantener interrelaciones con oligoelementos que pudiesen dar alguna explicación a lo que hoy día llamamos "factor pescado", por cuya razón se efectuó el análisis de radiactivación de muestras de dicho producto.

6.1. De las lecturas efectuadas (ver: 3.1 y 3.2) y con las salvedades técnicas: falta de aparataje y mayor número de conteos, sólo pudimos determinar cualitativamente los elementos I, Fe, Cl y Br; pero lo que ha llamado poderosamente nuestra atención es la presencia del bromo en el análisis efectuado, máxime que de dicho halógeno se desconoce prácticamente su acción fisiológica, punto éste fundamental que abre especial consideración en próximos exámenes investigativos.

6.2. Como hemos comprobado, en nuestras experiencia, que todo animal doméstico alimentado con ensilado de pescado, experimenta marcada tranquilidad en sus hábitos (factor éste: la quietud, que influye poderosamente en el engorde, etc.), se nos ocurre pensar en el terreno de lo especulativo, si esta sorprendente y desconocida *detección del bromo en el análisis de radiactivación del ensilado de pescado*, no podría dar una explicación sobre la acción farmacológica del ensilado sobre el organismo animal, en lo que tiene que ver con el factor "quietud" que mencionamos.

6.3. Asimismo, nuestra investigación ha creado otra inquietud científica a resolver: qué interrelación debe existir entre el Br y el I, y el Br y el Fe, desde el punto de vista bioquímico aplicado, atento a su forma de aparición —picos notables— en el análisis por radiactivación efectuada (fig. 1).

RESUMEN

Razones de índole bioeconómica nos han llevado a realizar el análisis por radiactivación en ensilado de pescado (fish silage) y su comparación en contrapartida con merluza fresca desecada, existiendo razones para ello, tales como:

a) El hecho de poder elaborar con 4 kilos de pescado 1 kilo de ensilado seco, en lugar de tener que utilizar unos 6 kilos de materia prima para preparar 1 kilo de harina de pescado, lo que significa una economía de 2 kilos.

b) El ensilado de pescado húmedo, mantenido en lugar fresco, se conserva indefinidamente.

c) Hemos comprobado que 3 kilos de ensilado de pescado sin secar (húmedo) con un contenido proteico de 15 gramos por ciento, substituye ventajosamente a 1 kilo de harina de pescado, con una riqueza del 65%. Este hecho se hace más notable desde el momento en que las comprobaciones fueron efectuadas con pescado (merluzas) provenientes de una misma captura.

d) Lógicamente pensamos que la proteína del ensilado de pescado, no afectada por tratamientos físicos enérgicos, pudiera mantener interrelaciones con oligoelementos que pudiesen dar alguna explicación a lo que hoy día llamamos "factor pescado", por cuya razón se efectuó el análisis por radiactivación de muestras de dicho producto.

e) De las lecturas efectuadas (ver numerales 3.1 y 3.2) pudimos detectar cualitativamente elementos tales como el I, Fe, Cl y Br, pero lo que ha llamado poderosamente nuestra atención es la presencia del Br en el análisis efectuado, máxime que de dicho halógeno se desconoce prácticamente su acción fisiológica, punto éste fundamental que abre especial consideración en próximos exámenes investigativos.

f) Como hemos comprobado en nuestras investigaciones que todo animal doméstico alimentado con ensilado de pescado experimenta marcada tranquilidad en sus hábitos (factor éste: "la quietud" que influye poderosamente en el engorde, etc.), pensamos en el terreno especulativo,

si esta sorprendente y desconocida detección del bromo en el análisis por radiactivación del ensilado de pescado, no podría dar una explicación sobre la acción farmacológica del ensilado sobre el organismo animal, en lo que tiene que ver con el factor "quietud" que mencionamos.

g) Asimismo, nuestra investigación ha creado otra inquietud científica a resolver: qué interrelación debe existir entre el Br y el I, y el Br y el Fe, desde el punto de vista bioquímico aplicado, atento a su forma de aparición —picos notables— en el análisis por radiactivación efectuado (gráfica: fig. 1).

CONCLUSIONS

The bio-economical reasons that we decided to analyse by radiactivation the fish silage and it's comparison in other hand with fresh dried hake were the following:

a) The fact of being able elaborate with 4 kg. of fish: 1 kg. of dry silage, instead of 6 kg. of raw material, to prepare 1 kg. of fish flour, what means a saving of 2 kg.

b) The wet fish silage when stored in a cool place remain unchanged indefinitely.

c) Logically, we think that the protein of the fish silage without being affected by energetic physical treatment, could maintain some relationship with oligoelements that could give some explanation to what is call nowadays "fish factor" which was the cause of radiactivation analysis of specimens of that product.

d) From the collected data (see numerals 3.1 and 3.2) and with technical reservations: lack of apparatus and a larger number of countings we could only determinate qualitatively the elements: I, Fe, Cl and Br. but what has drawn our attention is the presence of Br in the analysis made, mostly when the phisiological action of this halongen is unknown, fundamental point, this one, that opens special consideration in future research.

e) As we have verified in our research that all domestic animals fed with fish silage, experiments a marked quietness in its habits (this factor: "quietness" has a great influence in fatness, etc.) we thought in the speculative field, if this unknown and amazing detection of brome in the radiactivation analysis of fish silage, wouldn't give an explanation on the farmacological action of the silage on the animal organism, in what has to do with the factor "quietness" we mentioned.

f) At the same time, our research work has created another scientific problem to be solved: what relation should exist between Br and the I, and the Br and the Fe, from the applied bio-chemical point of view, looking at its aparition rate —remarkables peaks— in the analysis by radiactivation which was made (grafic: fig. 1).

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- BERTULLO**, Víctor H. and Hettich PEREZ.— *Protein Hydrolysis*. United States Patent Office, 3.000.789. Patent Sept.: 19, 1961.
- BERTRAND**, Didier.— *Les Oligoelements*. Presse Universitaires de France, 1962.
- BERTULLO**, Víctor H.— Hidrólisis de proteínas de origen animal a base de microorganismos proteolíticos. *Rev. Inst. Inv. Pesq.*, Montevideo, Vol. I. Nº 2, pág. 52-61. Facultad de Veterinaria, Uruguay, 1962.
- BERTULLO**, Víctor H.— *El ensilado de pescado*. Industrias Pesqueras. Vigo, España, Nº 793-794, año XXXIV. 1960.
- BERTULLO**, Víctor H.— El hidrolizado o bio-proteo-catenolizado de pescado para uso humano. Preparación, análisis bromatológico. *Rev. Inst. Inv. Pesq.*, Vol. 1: Montevideo. Facultad de Veterinaria, Uruguay, 1964.
- CAUSERET**, Jean.— *Fish as Food. Fish as a Science of Mineral Nutrition*. Chapter 5, Vol. 2. Academic Press, 1962.
- DI LANDRO**, Osvaldo A.— La radiología en medicina veterinaria. *Rev. Téc. Rad.*, año 1959. Montevideo, Uruguay.
- DI LANDRO**, Osvaldo A.— *Radioisótopos en biología y medicina veterinaria*. Cátedra de Biofísica. (Clases.) Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay, 1964.
- F.A.O.**— *International Training Course. Radioisotopes Techniques*. "Cornell University". Dir. Prof. C. Comar, 1962. "Fellowship André Mayer", 1961. Dr. O. A. Di Landro.
- F.A.O.**— "Fellowship André Mayer", 1961. *Studies in Radioisotopes Techniques*. Dir. A. R. Twardock. University of Illinois, Champaign. Dr. O. A. Di Landro. Champaign, Illinois, 1963.