

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

Número 7  
Diciembre 2012

# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



# INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



---

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

**Director**

Ing. Mariela De Giuda, MBA

**Coordinador de edición**

Lic. Celeste Villagrán, MS

**Editor**

Lic. Marina Barrientos

**Consejo editorial**

Ing. Mariela De Giuda, MBA

Ing. Tomas Lopéz, PHD

**Equipo de edición**

Lic. Lorena Fiori

Lic. Jacqueline Domínguez

**Diseño**

Vieja! Estudio Creativo

vieja.com.uy

La distribución de esta revista es gratuita. La colección completa se puede consultar en línea a través de <http://ojs.latu.org.uy>

Prohibida la reproducción total y parcial de artículos y/o materiales gráficos originales sin mencionar su procedencia. Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos son de responsabilidad de sus autores. Todos los derechos reservados

ISSN 1688-3691

Título clave: INNOTEC

Título clave abreviado: Innotec

ISSN electrónico: 1510-6593

Título clave: 1510-6593

Título clave abreviado: Innotec [en línea]

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598)2601 3724

[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)

<http://www.latu.org.uy>

<http://ojs.latu.org.uy>

<http://citein.blogspot.com>

<http://facebook.com/citein.latu>

# INDICE

---

Instrucciones a los autores.....	3
Índice de autores.....	91
Índice temático.....	92

## METROLOGÍA

- 5 **Certificación de un material de referencia de carne en base a un estudio de colaboración**  
*Salazar Arzate, Claudia Marcela et al.*

## TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

- 16 **Influencia de la aplicación de la ultra alta presión de homogeneización (UAPH) y de la [Ca<sup>++</sup>] en la estabilidad de la leche de arroz**  
*Jorcín, Santiago; Guamis, Buenaventura; López, Tomás.*
- 21 **Vida útil de tapas de empanadas con películas biodegradables como separadores**  
*Escobar Gianni, Daniela Verónica; Sala, Angelina; Silvera, Carlos; Harispe, Rodrigo; Márquez Romero, Rosa.*
- 25 **Estudio de la composición fisicoquímica de harina de semillas de zapallo como ingrediente alimentario**  
*Escobar Gianni, Daniela Verónica; Curutchet, Ana; Zirbesegger, Heinz; Márquez Romero, Rosa.*
- 31 **Evolución de la calidad de frutos de butiá (*Butia capitata*, Mart. Becc.) en almacenamiento refrigerado**  
*Zaccari, Fernanda; Crosa, María José; Irisity, Mariana.*
- 38 **Evolución del desarrollo del color en sistema modelo de composición similar al dulce de leche. Influencia del tiempo de calentamiento y del pH**  
*Rodríguez, Analía; Piagentini, Andrea; Rozycki, Sergio; Lema, Patricia; Pauletti, Miguel S.; Panizzolo, Luis.*

## BIOTECNOLOGÍA

- 43 **Andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en bioconjugados colágeno-quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos**  
*Ramos, Mikol; Zamora, Vanessa; Rodríguez, Gerardo; Sibaja, María; Madrigal-Carballo, Sergio; Lopretti, Mary.*

- 49 **Aplicación de la técnica de PCR en la detección de *Ralstonia solanacearum* en campos paperos**  
*Sanabria, Analía; Siri, María Inés; Cecchetto, Gianna; Planzzola, María Julia.*

- 55 **Biosíntesis de dextranos de alto peso molecular mediante la inoculación con *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) de jugos residuales de la agroindustria de la piña: síntesis y caracterización de hierro-dextranos**  
*Vega Baudrit, José Roberto; Sibaja Ballester, María del Rosario; Lopretti, Mary.*

- 59 **Nuevos materiales poliméricos derivados de fuentes renovables**  
*Lopretti, Mary; Gandini, Alessandro.*

- 64 **Obtención por  $\gamma$ -irradiación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a condiciones de cultivo rigurosas, para la producción de bioetanol**  
*Vázquez Zeballos, Sylvia Enid; Buxedas, Luciana; Lopretti, Mary.*

## NANOTECNOLOGÍA

- 69 **Ensamblado de ficocianina sobre TiO<sub>2</sub> nanoestructurado para celdas fotovoltaicas**  
*Enciso, Paula; Minini, Lucía; Álvarez, Beatriz; Cerdá Bresciano, María Fernanda.*

## CUEROS

- 75 **Aprovechamiento de subproductos de la faena de aves. Curtido de pieles de pata de gallina**  
*Iade, Juan; Casanova, Susana; Losada, Leticia; Larrosa, Andrés.*

## ESCORPIONES

- 82 **Clave para la identificación de las especies de escorpiones de Uruguay**  
*Toscano Gadea, Carlos Antonio.*
-

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos o artículos editados y autorizados por el correspondiente Consejo editorial, dentro de los campos de interés de la institución. Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y autores externos en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas productivos y de investigación.

LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software de libre gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

(a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones: <http://ojs.latu.org.uy>

(b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En este paso se consideran la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.

(c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.

(d) Se asignan los árbitros, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.

(e) Devuelto el informe del árbitro, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo.

(f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo de la Organización, basado en normas internacionales (RCAA2, ISBD, ISO/IEC Guide 2, ISO 690, ISO 690-2, ISO 2108, ISO 3297, ISO 5127), y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy>, los autores deberán aceptar la Nota de copyright, en la que se establecen los términos de responsabilidad y se declara la transferencia de derechos autorales.

En el caso de artículos con derechos de autor, solo se publicarán aquellos que cuenten con autorización expresa de la empresa a cargo de su edición.

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

## Normas de presentación de los textos

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

Los artículos deben contener la siguiente información:

**Título** del artículo en español e inglés, en mayúsculas y minúsculas.

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

**Resumen y palabras clave:** en español y en inglés, de 200 palabras máximo en su versión castellana. Las palabras clave no deberían repetir los términos ya utilizados en el título.

**Texto:** de tres (3) a quince (15) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes; ver sección Formato y estilo en este documento).

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

**Fórmulas, figuras, tablas e imágenes:** Cada figura debe ingresarse en el perfil del artículo en OJS por separado, como archivo complementario, y con la referencia numérica correspondiente. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se numeran según el orden de aparición en el texto, incluyendo un pie de tabla explicativo en la parte inferior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla, no dividir tablas en más de un folio, ni colocarlas en forma perpendicular al texto. El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas.

Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

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

Por favor, evite las notas al pie.

## Formato y estilo

- **Autor:** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.
- **Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.
- **Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.
- **Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.
- **Material y Métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.
- **Resultados.** Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.

- **Discusión (Conclusión).** Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.
- **Agradecimientos.** Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.
- **Referencias.** Ver Manual de estilo de presentación de citas y referencias documentales del LATU.

## Ejemplos usuales:

### Monografías (Libros)

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

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

### Revistas como un todo

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

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

### Artículos de revistas

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

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

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

### Normas

ENTIDAD RESPONSABLE DE LA NORMA. País de la entidad responsable entre paréntesis. No. o código de la norma: *Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada, año de publicación.

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

### Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

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

RAPP, A.; AUGUSTA, U.; PEEK, R. D. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH, 2001. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfah.de/inst4/43/pdf/3doubalay.pdf>

### Patentes

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

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

---

## Política editorial LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

### Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico / tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales. Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

### Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas de LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems, <http://ojs.latu.org.uy> o a contactarse con el Centro de Información Técnica de LATU a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

---

# Certificación de un material de referencia de carne en base a un estudio de colaboración

## Certification of a meat reference material based on a collaborative study

Salazar Arzate, Claudia Marcela <sup>(7)</sup>, Regalado, Laura <sup>(7)</sup>, Pazos, Alberto <sup>(1)</sup>, Vivino, Enrique <sup>(1)</sup>, García, Vania <sup>(2)</sup>, Pantoja, María Rosa <sup>(2)</sup>, Rocha, Eliana <sup>(2)</sup>, Vacafior, Patricia <sup>(2)</sup>, Casiano, Rodrigo <sup>(3)</sup>, Cucatti, Mónica Regina <sup>(3)</sup>, Miyagushu, Luciana <sup>(3)</sup>, Sousa, Renata <sup>(3)</sup>, Uekane, Thais <sup>(3)</sup>, Gonçalves de Melo, Monique <sup>(3)</sup>, Acevedo, Xiomara <sup>(4)</sup>, Jimenez, Elizabeth <sup>(4)</sup>, Jimenez, Linda Patricia <sup>(4)</sup>, Rivera, Myriam Jessel <sup>(4)</sup>, Torres, Pedro Hernán <sup>(4)</sup>, Larrea, Elena <sup>(5)</sup>, Navas, Lucía <sup>(5)</sup>, Silva, Susana <sup>(5)</sup>, Phillips, Andrene <sup>(6)</sup>, Random, Dwight <sup>(6)</sup>, Acco, Steve <sup>(8)</sup>, Ramos, Ana <sup>(8)</sup>, Uribe, Christian <sup>(8)</sup>, Ticona, Galia <sup>(8)</sup>, Toro, Cristina <sup>(8)</sup>, Francini, Lorena <sup>(9)</sup>, Reñares, Rosana <sup>(9)</sup>

<sup>(1)</sup> Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI, Argentina - <sup>(2)</sup> Instituto Boliviano de Metrología, IBMETRO, Bolivia

<sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Metrología, Normalización y Calidad Industrial, INMETRO, Brasil - <sup>(4)</sup> Superintendencia de Industria y Comercio, SIC, Colombia - <sup>(5)</sup> Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN, Ecuador - <sup>(6)</sup> Bureau of Standards Jamaica, BSJ, Jamaica - <sup>(7)</sup> Centro Nacional de Metrología, CENAM, México - <sup>(8)</sup> Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Servicio Nacional de Metrología, INDECOPI, Perú

<sup>(9)</sup> Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay.

Contacto: csalazar@cenam.mx

Recibido: 25/1/2011 - Aprobado: 28/9/2012

### Resumen

Mediante un proyecto de colaboración, se llevaron a cabo estudios de comparación para mejorar la capacidad de medición de los laboratorios participantes, apoyándolos en la producción, caracterización y distribución de materiales de referencia del sector agroalimentario. El proyecto fue planteado en cuatro etapas anuales (leche, agua, carne y granos). La tercera etapa en específico tuvo el objetivo de cuantificar y certificar el contenido de los parámetros nutrimentales (nitrógeno, grasa, sodio y potasio) de un lote candidato a Material de Referencia Certificado (MRC) de carne bovina enlatada. Dicho estudio fue realizado en colaboración entre varios Institutos Nacionales de Metrología (INM) y/o laboratorios colaboradores, los cuales, una vez que identificaron las posibles causas de variabilidad o de sesgo en las mediciones, así como las oportunidades de mejora, lograron la certificación del material de carne bovina. El MRC fue distribuido entre los participantes para cubrir las necesidades de la industria alimentaria de productos cárnicos y laboratorios de prueba de sus respectivos países.

Palabras clave: Material de referencia, Material de Referencia Certificado, trazabilidad, incertidumbre.

### Abstract

Through a collaborative project, comparison studies were carried out to improve measurement capabilities of participating laboratories, supporting them to produce, characterize and distribute reference materials in the food sector. The project was planned in four annual stages (milk, water, meat and grains). The third stage aimed specifically to quantify and certify the nutritional content of the parameters (nitrogen, fat, sodium and potassium) of a batch candidate as Certified Reference Material (CRM) of canned beef. This study was conducted in collaboration between several National Metrology Institutes (NMIs) and/or collaborating laboratories, which, once identified the possible causes of variability or bias in the measurements, as well as the opportunities of improvement, achieved the certification of the material beef. The CRM was distributed among the participants to cover the needs of the food industry of meat products and testing laboratories in their respective countries.

Keywords: Reference material, Certified Reference Material, traceability, uncertainty.

## Introducción

Dentro de la industria alimenticia, los parámetros de análisis más comunes en la evaluación de la calidad de los productos son conocidos como proximales y constituyen parámetros de medición rutinaria. Sin embargo, la disponibilidad de Materiales de Referencia Certificados (MRC) afines a estos es aún limitada en el mercado. Atender la necesidad de contar con Materiales de Referencia (MR) que contribuyan a mantener e incluso mejorar la calidad de medición de los laboratorios analíticos es uno de los mayores objetivos de los

Institutos Nacionales de Metrología (INM), los cuales son, además, responsables de establecer la trazabilidad de las mediciones analíticas y su comparabilidad.

Con este antecedente y la finalidad de mejorar la disponibilidad y el desarrollo de MR, así como de fomentar la colaboración entre laboratorios de diferentes regiones, se generó mediante el apoyo de la Organización de Estados Americanos (OEA) un proyecto para producir, certificar y compartir MRC requeridos para asegurar la calidad de alimentos de interés común, en este caso, carne. El proyecto se realizó bajo el esquema de comparación y contó con la

participación y experiencia de instituciones dedicadas a la certificación de materiales.

Para esta tarea, un lote de 1.000 unidades de un candidato a MR de carne tipo paté contenida en latas de aluminio de aproximadamente 90 g fue producido y distribuido por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina al resto de los participantes, quienes recibieron sub lotes de 100 unidades cada uno.

El laboratorio coordinador del proyecto estuvo a cargo de evaluar la homogeneidad del contenido de los parámetros a certificar -acordados previamente-, nitrógeno, grasa, potasio y sodio, por tratarse de mediciones de control en los laboratorios de prueba.

Previo al proceso de certificación y con el objetivo de demostrar competencia técnica y obtener a su vez la mayor consistencia en los resultados -sobre todo para los parámetros dependientes del proceso operacional de medición, tales como nitrógeno y grasa- fue necesaria la revisión y "armonización" tanto de métodos como de prácticas de laboratorio llevadas a cabo por cada participante.

Conviene recordar que para los parámetros dependientes del procedimiento operacional una práctica comúnmente aceptada para la certificación de estos analitos son los estudios colaborativos, en los cuales, por medio de una evaluación de la consistencia de los resultados y la aplicación de conceptos estadísticos, es posible determinar los valores representativos de las propiedades del material en cuestión. Por otro lado, para los parámetros independientes del método se aplican directamente los conceptos de trazabilidad hacia los resultados de medición con mayor jerarquía metrológica, cuya incertidumbre sea la más pequeña que se pueda lograr.

Originalmente, se estableció que las incertidumbres máximas esperadas al final de las mediciones de proteína y grasa serían de 5 y 7 %, respectivamente; sin embargo, debido a que en los estudios de comparación realizados durante la etapa de leche los valores de incertidumbre fueron mayores, se estableció que para este ejercicio serían de 7 y 8 %.

En este trabajo se describen las consideraciones hechas por los laboratorios para llegar a definir los valores de certificación obtenidos y expresados para el MR de carne, con base en el estudio de comparación realizado entre los participantes del proyecto.

## Materiales y Métodos

En cuanto a los métodos de medición, existen distintas prácticas para la evaluación de la calidad de los productos cárnicos entre los países participantes de este estudio. En la mayoría de los casos, son dictadas por la legislación de cada país, de modo que varían de región a región. Dichas diferencias pueden ser consultadas en las Tablas 11 a 14 del artículo.

En ese sentido, el proyecto para la caracterización del candidato a MR de carne se planteó en las siguientes fases:

1. Medición de muestras de carne y muestras de un MR con métodos habituales.
2. Armonización de métodos y prácticas de laboratorio.
3. Realización de nuevas mediciones de muestras de carne y control utilizando métodos armonizados.
4. Certificación del candidato a MR.

Durante la fase de "armonización", los participantes se abocaron a la tarea de identificar las variables importantes que se debían controlar durante los procedimientos de cuantificación de cada uno de los parámetros en análisis. Asimismo, acordaron establecer, en la medida

de lo posible, las condiciones de trabajo y realizar cada vez nuevas mediciones con el objetivo de poder certificar el lote de carne bajo el esquema de colaboración original. Para este fin se empleó un MRC proporcionado por el Centro Nacional de Metrología (CENAM), que consistió en una mezcla de pollo con vegetales y que se usó de modo paralelo como control de medición.

Se realizó nuevamente el estudio de homogeneidad de los contenidos de nitrógeno, grasa, sodio y potasio con las mediciones reportadas con los métodos armonizados mediante análisis de varianza (ANOVA). El número de muestras consideradas fue diferente para cada parámetro.

Para las mediciones de sodio y potasio se emplearon los métodos basados en espectrometría de absorción atómica (EAAF), emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) o espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), y también cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC).

Para algunos de los parámetros fue necesario que ciertos laboratorios realizaran varias veces las mediciones, ya que las reportadas originalmente presentaban sesgo y/o dispersión y, por lo tanto, no se consideraban adecuadas para incluirlas en el proceso de certificación de los parámetros.

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron para cada parámetro. Para cada uno de los analitos, la asignación del valor certificado y la estimación de su incertidumbre asociada se realizó de forma individual.

## Resultados

### Nitrógeno

La homogeneidad del lote fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA). Se consideraron un total de 68 muestras, cada una con tres réplicas. Las muestras fueron seleccionadas de forma aleatoria por los laboratorios participantes. El estudio indicó que el contenido de nitrógeno en el candidato a material de referencia de carne era homogéneo, por lo que se continuó con la certificación en conjunto.

En la Figura 1 se presentan los valores medidos para cada réplica, del lado derecho, el valor promedio y las barras de incertidumbre reportados por cada participante. La línea sólida representa el valor promedio del total de los resultados reportados y las líneas punteadas, dos veces la desviación estándar.

### Grasa

Los resultados de grasa están contenidos en la Figura 2. Como se observa, los laboratorios 2 y 4 presentaban valores sesgados que contribuían a una desviación estándar grande, que podía ser disminuida considerablemente si estos eran corregidos o eliminados. Igualmente, los resultados de los laboratorios 7 y 8 afectaron la evaluación de la calidad de las muestras.

La eliminación de los resultados sesgados con respecto al valor medio global afectaba directamente al valor medio del total de valores (Tabla 1), pero sobre todo a la desviación estándar relativa, la cual cambiaba de 2,4 % a 0,6 % (Tabla 5).

Por consiguiente, se recomendó a los laboratorios mencionados repetir sus mediciones y a los identificados con los números 6, 7 y 8 revisar sus resultados a fin de encontrar mejoras que pudieran reducir la desviación estándar.

Los resultados obtenidos finalmente son los presentados en la Figura 3.

	Todos las muestras	Excluyendo a los laboratorios 2 y 4
Media del grupo	20,01 g/100 g	20,25 g/100 g
Desviación estándar de la media	0,49 g/100 g	0,13 g/100 g
DER	2,45 %	0,64 %

Tabla 1. Comparación de valores reportados para grasa.

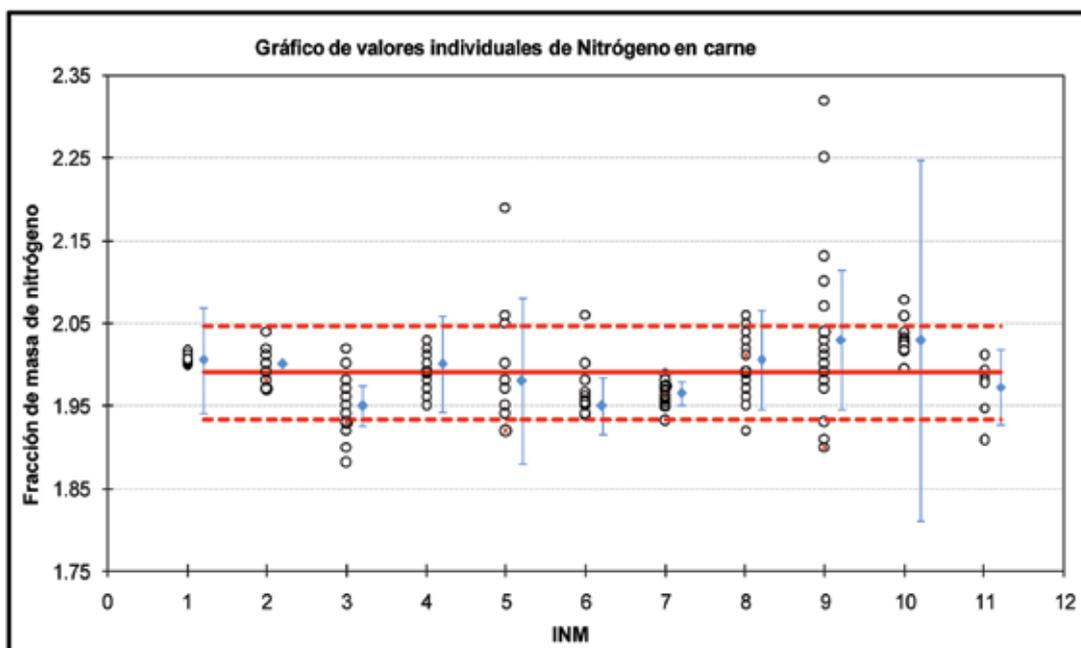


Figura 1. Resultados de la medición de nitrógeno en carne.

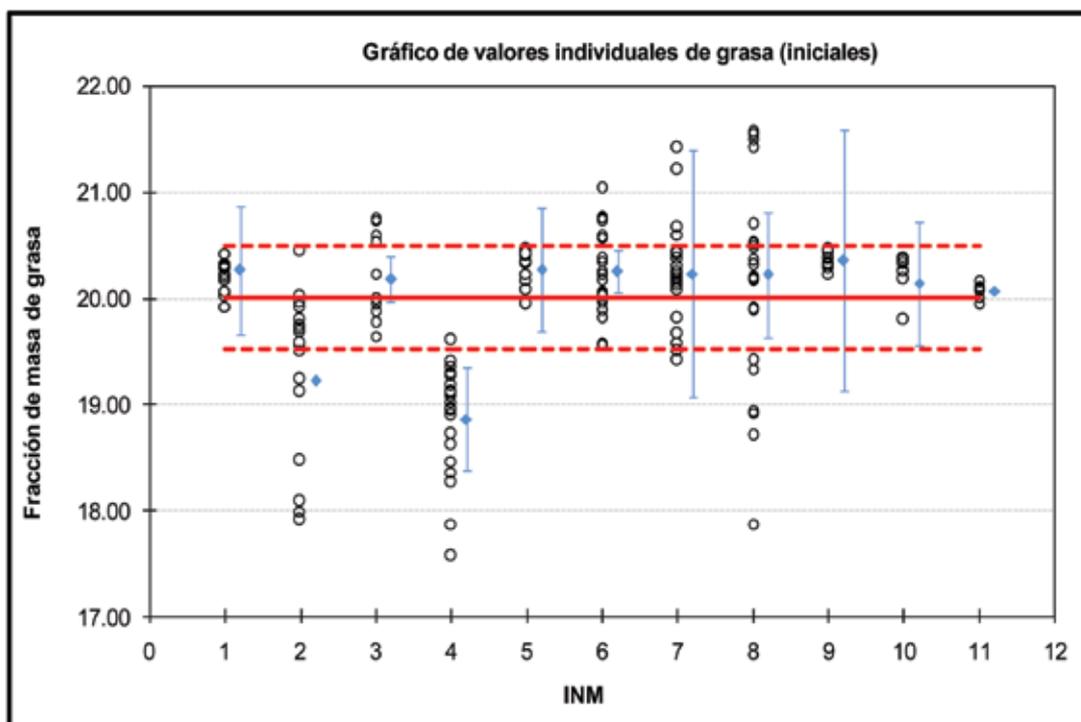


Figura 2. Resultados iniciales de la medición de grasa en carne.

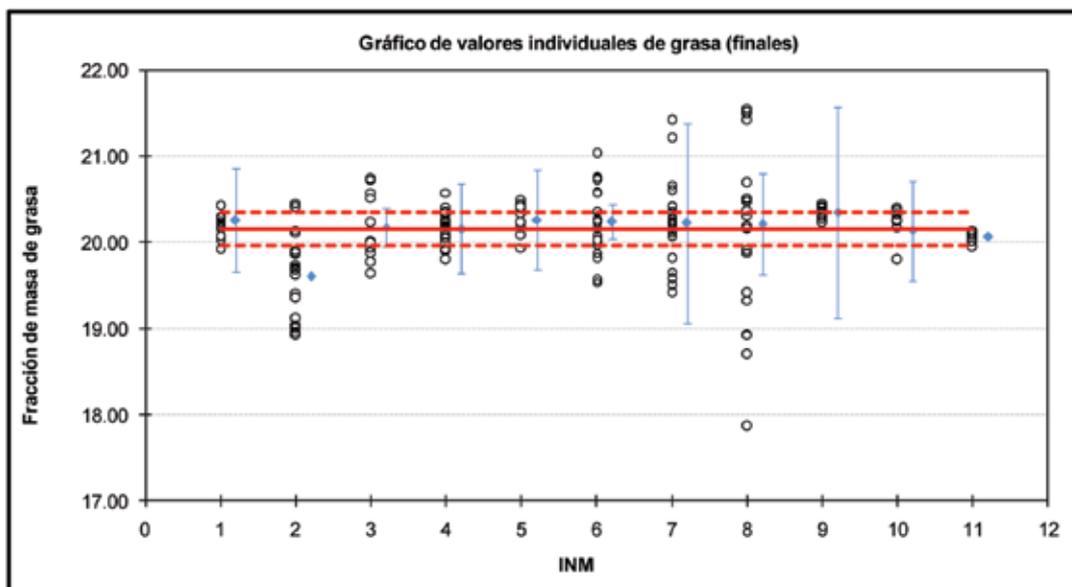


Figura 3. Resultados finales de la medición de grasa en carne.

## Sodio

Los resultados de sodio se expresan en la Figura 4. Para dicho analito los resultados de los laboratorios 1, 2, 3, 5, 6 y 7 fueron obtenidos por EAAF, mientras que los resultados de los laboratorios 9 y 11 por ICP-AES, el 10 proviene de ICP-MS y los de los laboratorios 4 y 8 fueron obtenidos por HPLC.

Conforme a los resultados, se les recomendó a los laboratorios 2 y 7 volver a medir para mejorar la dispersión entre sus mediciones y/o el sesgo respecto a la mayoría. Los resultados que fueron reportados se muestran en la Figura 5.

## Potasio

Los resultados de potasio se presentan en la Figura 6. Al igual que en el caso de sodio, los resultados de los laboratorios 1, 2, 3, 5, 6, y 7 fueron obtenidos por EAAF, mientras que los resultados de los laboratorios 9 y 11 por ICP-AES, el 10 proviene de ICP-MS y los de los laboratorios 4 y 8 fueron obtenidos por HPLC.

En este caso, se le solicitó al laboratorio 7, entre otros, la revisión de sus resultados. Los finales son presentados en la Figura 7.

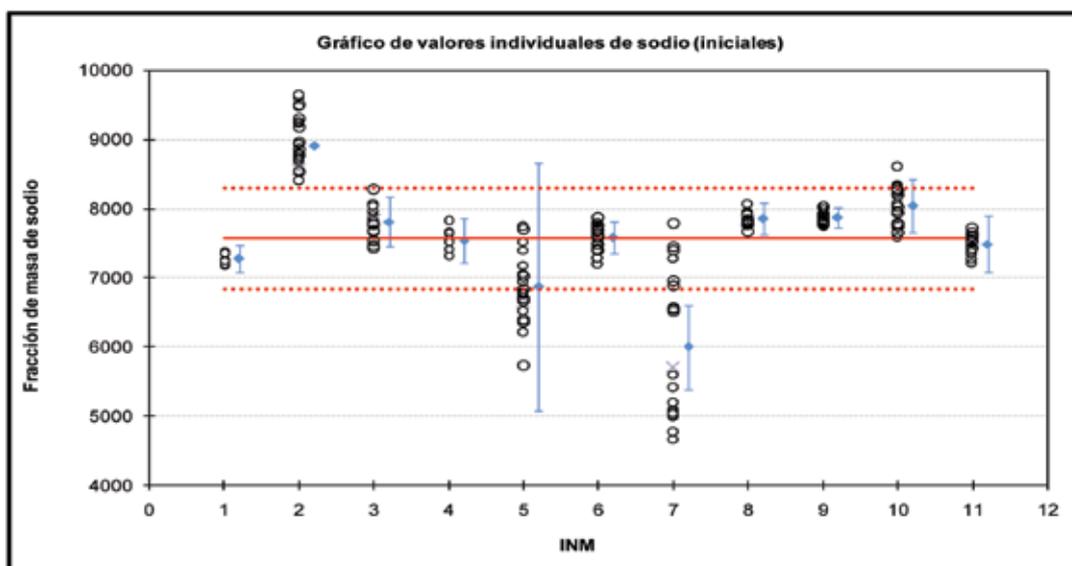


Figura 4. Resultados iniciales de la medición de sodio en carne.

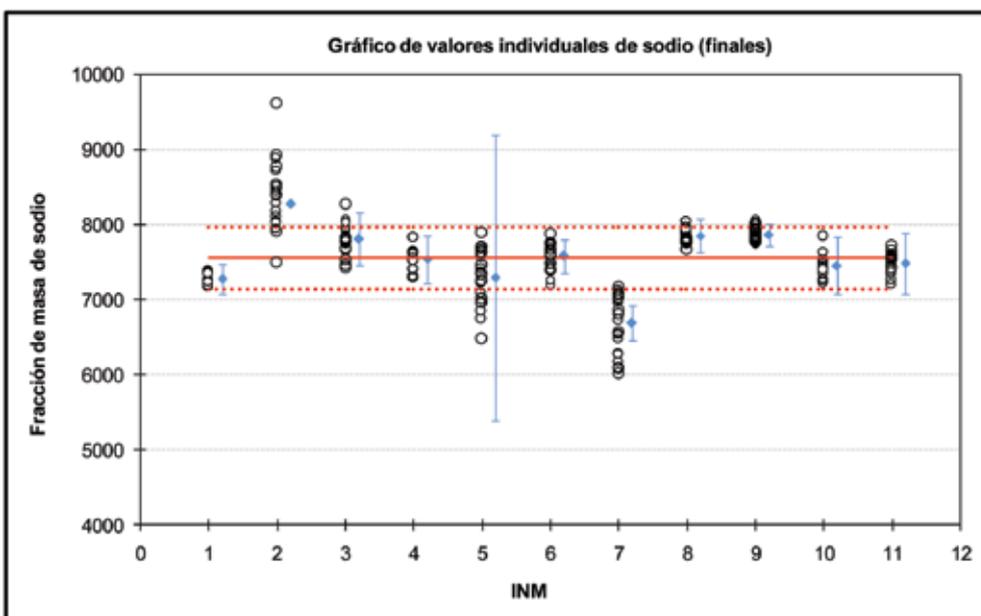


Figura 5. Resultados finales de la medición de sodio en carne.

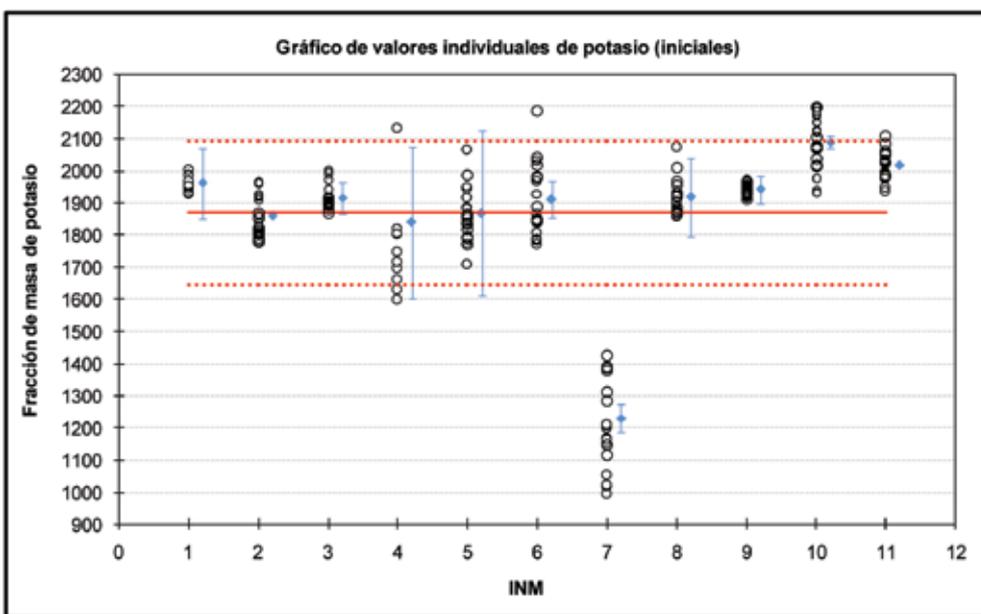


Figura 6. Resultados iniciales de la medición de potasio.

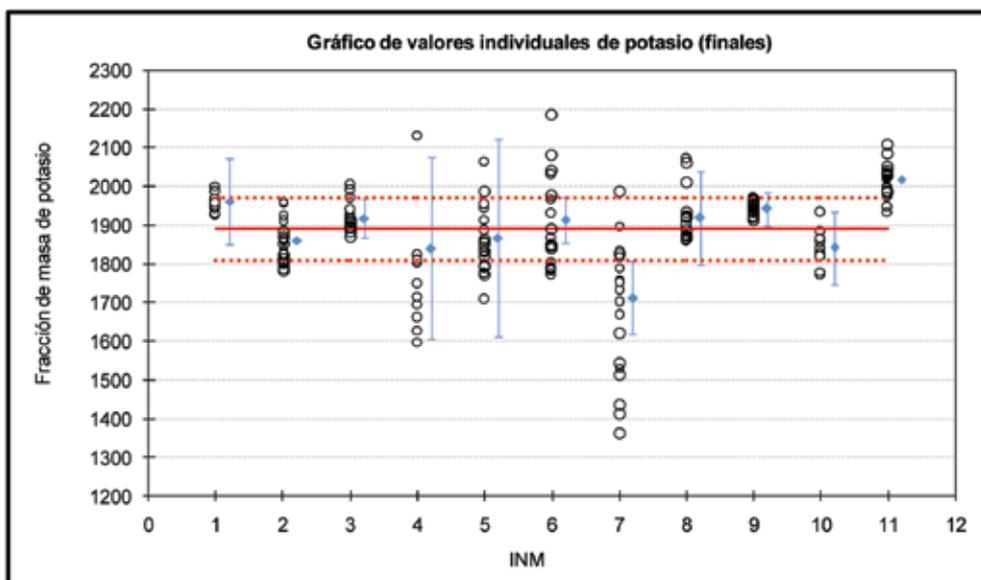


Figura 7. Resultados finales de la medición de potasio en carne.

## Discusión

En general, el ejercicio de armonización con un MRC permitió identificar las oportunidades de mejora para cada laboratorio, incrementando la calidad de los resultados para las muestras de candidatos a MR en cuanto a la consistencia, tal y como se observa en la Tabla 2.

Mensurando	Antes de la armonización		Después de la armonización	
	Promedio	Desviación Estándar Relativa (%)	Promedio	Desviación Estándar Relativa (%)
Nitrógeno	1,97 g/100g	4,5	1,99 g/100g	3,0
Grasa	19,83 g/100g	5,6	20,01 g/100g	2,4
Sodio	7456 mg/kg	13,7	7567 mg/kg	9,6
Potasio	1814 mg/kg	17,5	1847 mg/kg	11,5

Tabla 2. Resultados obtenidos antes y después de la fase de armonización.

Los ajustes realizados en la metodología armonizada de Kjeldahl permitieron obtener resultados congruentes. Dichos ajustes consistieron principalmente en la estandarización de la normalidad del ácido utilizado. El valor certificado obtenido fue de  $(1,99 \pm 0,078)$  g/100 g con una incertidumbre estándar relativa de 3,9 %, con lo que se logró el objetivo planteado para el esquema de colaboración.

Respecto a la grasa, al comparar las Figuras 2 y 3 puede apreciarse la considerable mejora que tuvo el laboratorio 4 al realizar ajustes en su procedimiento. En cuanto al resultado del laboratorio 2, a pesar de que aumentó el contenido de grasa extraída, se mantuvo un sesgo respecto al resto de los valores, por lo que se consideró pertinente la eliminación de sus datos para el estudio de ANOVA y la emisión del valor de referencia “más cercano al verdadero”. El valor medio de grasa resultó de 20,16 g/100g con una desviación estándar relativa de 1 %.

A la par de la revisión de los resultados de grasa, surgió entre los participantes el cuestionamiento del tipo de grasa cuantificada, debido a los tres procesos utilizados: grasa libre por soxhlet, grasa total por hidrólisis ácida y grasa total por soxhlet e hidrólisis ácida.

Por tal razón, en paralelo al estudio en conjunto y dadas la clasificación de la carne, la normativa oficial de cada región y las experiencias respecto a su determinación, se analizaron los resultados de acuerdo a las metodologías y al “tipo de grasa” extraída. Los valores obtenidos según las clasificaciones se presentan a continuación.

a) Grasa libre, extracción por Soxhlet. Fue determinada por los laboratorios 1, 3, 4, 6, 8 y 10. Para este grupo, el valor promedio fue de 19,97 g/100 g con una desviación estándar de 0,55 g/100g.

Laboratorio	Valor obtenido (g/100g)	Incertidumbre (g/100g)
1	20,27	0,60
3	20,18	0,22
4	18,86	0,49
6	20,25	0,20
8	20,22	0,59
10	20,07	0,11
Promedio	19,97	

Tabla 3. Resultados para grasa libre.

b) Grasa total, extracción con solvente previa hidrólisis ácida. Los resultados reportados por los laboratorios 5, 7 y 9 corresponden a este método.

En este caso, el promedio del grupo fue de 20,28 con una desviación estándar de 0,06 g/100 g.

Laboratorio	Valor obtenido (g/100g)	Incertidumbre (g/100g)
5	20,27	0,58
7	20,23	1,16
9	20,35	1,23
Promedio	20,28	

Tabla 4. Resultados de grasa total por hidrólisis ácida.

c) Grasa total, extraída mediante soxhlet, previa hidrólisis. Los resultados reportados por los laboratorios 2 y 10 corresponden a este método. Para el grupo el promedio fue de 19,68 con una desviación estándar de 0,65 g/100g.

Laboratorio	Valor obtenido (g/100g)	Incertidumbre (g/100g)
2	20,14	0,58
10	19,22	-
Promedio	19,68	

Tabla 5. Resultados de grasa total por método combinado.

De acuerdo a estos resultados, se observó que no existe una clara diferencia entre los valores del contenido de grasa para el tipo de producto en cuestión. Lo anterior es debido posiblemente a que las proteínas presentes en la muestra fueron desnaturalizadas en el proceso de cocción al que fue sometida durante la esterilización para su enlatado.

Respecto al nombre del mensurando, basados en que las definiciones de "grasa" van desde: "mezcla de ésteres resultantes de la combinación de glicerina con los ácidos grasos", hasta "extracto etéreo que se obtiene cuando la muestra es sometida a extracción, refiriéndose como 'extracto etéreo' al conjunto de las sustancias extraídas que incluyen, además de los ésteres de los ácidos grasos con el glicerol, a los fosfolípidos, lecitinas, esteroides, ceras, ácidos grasos libres, etc." (Egan et al., 1987), y que "grasa" es también el término que se emplea para aquellas "mezclas de lípidos que son sólidas o semisólidas a temperatura ambiente" (Badui, 1981), se acordó reportar en el certificado el contenido de "extracto etéreo" o "grasa", sin considerar si es el libre o total, o el método de extracción usado.

Con el fin de asignar el valor certificado, se compararon los valores estadísticos de promedio ponderado (Duewer, [s.d.]), el promedio aritmético (EURACHEM, CITAC, 2000; BIPM, 1995) y mediana

(Müller, 2000), con su respectiva incertidumbre asociada.

De acuerdo a los datos de la Tabla 6, tanto los valores como las incertidumbres son comparables, sin embargo se propone emplear como incertidumbre de este ejercicio dos veces la desviación estándar de la media de los participantes. Las incertidumbres evaluadas para estos casos fueron comprobadas mediante el uso de programas estadísticos para cálculo de valores ponderados (Duewer, [s.d.]).

En cuanto a los minerales, las nuevas mediciones reportadas para los analitos de sodio y potasio resultaron más apropiadas para la asignación como valores de referencia, ya que las desviaciones estándar relativas cumplían con los valores meta del proyecto.

No obstante, considerando que la emisión de un valor certificado obtenido mediante el uso de dos métodos de principios diferentes es una práctica aceptada por la Guía ISO 34 (EURACHEM; CITAC, 2000), el laboratorio coordinador propuso que se combinaran los resultados por HPLC e ICP-AES (ambos medidos por el mismo instituto y que corresponden a los resultados de los laboratorios 8 y 9 de las Figuras 4 y 6), y el valor resultante se tomó como valor final. En las Tablas 7 y 8 se detalla cada uno de los valores considerados para generar el valor combinado de sodio y potasio, respectivamente.

Analito		Valor Certificado	(Incertidumbre expandida k=2)	Unidad	Urel (%)
Nitrógeno	Media ponderada	1,994	0,052	g/100g	2,61
	Media aritmética	1,991	0,07		3,51
	Mediana	1,988	0,061		3,07
Grasa	Media ponderada	20,19	0,43	g/100g	2,13
	Media aritmética	20,16	0,53		2,63
	Mediana	20,23	0,43		2,13

Tabla 6. Valores estadísticos y sus respectivas incertidumbres.

Técnica	Fración de masa	U (k=2)	Unidades	Urel (%)
HPLC	7848	223	mg/kg	2,85
ICP-AES	7868	146	mg/kg	1,86
Combinación	7858	267	mg/kg	3,40

Tabla 7. Valores obtenidos para el contenido de sodio en el candidato a material de referencia de carne.

Técnica	Fración de masa	U (k=2)	Unidades	Urel (%)
HPLC	1924	121	mg/kg	6,31
ICP-AES	1943	33	mg/kg	1,68
Combinación	1934	63	mg/kg	3,26

Tabla 8. Valores obtenidos para el contenido de potasio en el candidato a material de referencia de carne.

## Acciones de mejora

Dentro de las acciones de mejora que se realizaron durante el proceso para poder concluir con éxito la etapa de certificación del material de carne, se encuentran:

- Armonización de métodos. La estandarización de condiciones de medición permitió a los laboratorios implementar y/o eliminar etapas en sus procedimientos, y así se lograron resultados consistentes con los del resto del grupo.
  - Para la determinación de nitrógeno los resultados mejoraron considerablemente al fijar y/o establecer la normalidad del ácido clorhídrico que se utilizó durante el procedimiento de titulación. Adicionalmente, se puso énfasis especial en que los participantes tomaran conciencia de que dicho proceso mejora al usar potenciómetros o voltímetros.
  - Para la determinación de grasa el análisis de los resultados según la técnica usada permitió enfatizar acciones importantes, como el secado previo de la muestra durante 5-6 h a 95-100 °C, debido a su alto contenido de agua (64%), lo que evitó que los lípidos se liguen de esta forma a proteínas y carbohidratos; la utilización de mezcla de éteres en lugar de uno en particular; el incremento de tiempo de extracción de 4 a 8 horas, etcétera.
  - Para minerales la medición de potasio se favoreció al establecer el modo emisión, así como el uso de supresores, lo cual permitió obtener valores menos dispersos. En cuanto a la digestión, fue posible establecer la temperatura de calcinación apropiada para evitar cualquier posible pérdida de los analitos.
- Revisión de resultados. La revisión de resultados, en la que se consideró tanto la dispersión entre muestras como el sesgo de la medición, dio a los laboratorios la pauta para promover programas y cursos de capacitación constantes entre su

personal, y al repetir las mediciones los valores obtenidos se observaron claramente más consistentes.

- Concientización del uso de materiales de referencia usados como controles de medición.
- Programas de capacitación técnica. Incluyen intercambios entre los institutos participantes para aprender y/o complementar los conocimientos en la aplicación de las metodologías utilizadas.

## Conclusiones

Se ha mostrado que la calidad de medición bajo el esquema de colaboración es decisiva para el proceso de certificación de materiales de referencia, ya que la contribución de cada participante es crítica para que se puedan lograr los valores certificados con incertidumbres asociadas razonables para la aplicación. Sin embargo, para poder lograrlo, es fundamental demostrar competencia de medición.

Mediante este estudio se comprobó que la utilización de métodos armonizados puede sustentar la emisión de valores congruentes aun entre diferentes regiones y legislaciones. Esto permite lograr la generación de materiales de referencia útiles y al alcance de un mayor sector de la industria alimenticia.

En este caso, para los parámetros dependientes de procedimientos operacionales como nitrógeno y grasa se pueden adoptar los valores de consenso, una vez evaluada la consistencia de los resultados; no obstante, para los parámetros independientes de método es necesario emplear métodos de alta jerarquía metrológica, o varios métodos de principios de medición independientes con la competencia apropiada para asignar valores de referencia confiables.

En las Tablas 9 y 10 se presentan los valores certificados y las incertidumbres que fueron adoptadas por los laboratorios para el lote de carne de res tipo paté.

Analito	Valor de referencia (mediana)	Incertidumbre (2 veces la Desviación estándar de la media)	Unidades	Urel (%)
Nitrógeno	1,988	0,078	g/100 g	3,65
Grasa	20,23	0,58	g/100 g	2,30

Tabla 9. Valores certificados obtenidos para los analitos de nitrógeno y grasa.

Analito	Valor de referencia combinado	Incertidumbre ( $k=2$ )	Unidades	Urel (%)
Na	7858	267	mg/kg	3,40
K	1934	63	mg/kg	3,26

Tabla 10. Valores certificados obtenidos para los analitos sodio y potasio.

País	Método	Peso muestra	Digestión			Destilación	Titulación	
			Equipo	Tiempo	Temperatura		Equipo	Instrumento
Argentina	AOAC 981.10 (2005)	2,0 g	Bucchi	100 min	450 °C	Bucchi (automático)	Bureta	cambio de color
Bolivia	Macro kejldahl	2,0 g	Digestor macrokejldahl	De 1,5 a 2 h	Nivel 6	Destilador macrokejldahl (manual)	Bureta clase A	cambio de color
Brasil	Horwitz, W AOAC, 18 ed	1,5 g	TE 008/50 - 04 TECNAL	150 min	-----	Kjeltec Sistem 1026 Distiling	Bureta BUT 0384	cambio de color
Colombia	AOAC 981.10 (2005)	2 g	Digestor Bucchi 435	3 h	Nivel máximo (10)	Destilador Bucchi 323 (automático)	Titulador Metrohm 702 SM Titrimo	automático
Ecuador	AOAC 960.52	0,1 a 0,3 g	Labconco	1,5 h	Nivel máximo	Labconco manual	Bureta 10 ml; 0,04 ml	ph 4,6
Jamaica	Kjeldahl	1 g	Foss 2020 digester	2 h	440 °C	Foss 2020 digester (automático)	Kjeltec 2300	cambio de color
México	Kjeldahl	1 g	Bucchi	2 h	380 - 450 °C	Bucchi (semiautomático)	Bureta clase A	cambio de voltaje
Perú - SENASA	Kjeldahl	0,5 g	Digestor DIGIPREP HT250	2 h	400 °C	Digestor DIGIPREP 200 (automático)	Bureta de 25 mL	cambio de color
Perú - INDECOPI	Kjeldahl	0,5 g	Bucchi	2 h	400 °C	Bucchi (automático)	Bureta	cambio de color
Uruguay	ISO 937:1978	1 g	Gerhardt	95 min, previa clarificación	400 °C	Gerhardt (manual)	Bureta	-----

Tabla 11. Diferencias en las metodologías para el análisis de nitrógeno.

País	Método	Peso muestra	Digestión			Evaporación	
			Agitación	Temperatura	Tiempo	Instrumento	Temperatura
Argentina	960.39	5 - 10 g	-----	65 °C	6 h	Twissel estufa	102 °C
Bolivia	Soxhlet con hidrólisis previa	3 g	-----	15 sifoneadas por hora	6 h	Baño María	60 ± 5 °C
Brasil	Horwitz, W AOAC, 18 ed, 2005. (Soxhlet)	10 g	-----	130 °C	8 h	Baño de evaporación	60 °C
Colombia	AOAC 991.36 (2005) (Soxhlet)	3 g	-----	60 °C	6 h	Rotavapor	40 °C por 45 min
Ecuador	*CENAM (hidrólisis ácida)	1,5 g	Vortex, 60 seg	-----	5 extracciones	Estufa Heraus	80 °C
Jamaica	Soxhlet	1 g	-----	155 °C	-----	-----	-----
México	Hidrólisis ácida	1 - 2 g	Manual	70 - 80 °C	40 min	Estufa	80 °C por 8 h
Perú - SENASA	AOAC 2003.06 (Soxhlet con hidrólisis previa)	1 g	-----	180 °C	2 h	Aparato de extracción	180 °C por 1 h
Perú - INDECOPI	AOAC 2003.06	1 - 2 g	Manual, 60 seg	-----	3 extracciones	-----	40 °C por 1 h
Uruguay	ISO 1443:1973 (soxhlet)	4 g	----- por 1 h	Adecuada para obtener 20 extracciones por hora	4 h	Buchi	75 °C por 10 min

Tabla 12. Diferencias en las metodologías para el análisis de grasa.

País	Método	Peso muestra	Digestión			Medición	
			Equipo	Tiempo	Temperatura/potencia	Instrumento	Calibrante
Argentina	Emisión	0,5 g	Horno mufla	16 h	550 °C	Espectro AA	Na trazable NIST 1 g/L lote: 735845
Bolivia	AA (Flama)	0,2 - 0,3 g	Anton Paar Microwave	40 min	180 °C	Analyst 700 de Perkin Elmer	Patrones certificados de Na Perkin Elmer
Brasil	AA (Horno de grafito)	0,5 g	Anton Paar Microwave	50 min	1400 W	Perkin Elmer model 800 atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction, THGA 800 graphite furnace and an As-800 autosampler	SRM-3152a
Colombia	Journal of Food Science, Vol 56, no. 5, 1991. (EAAF)	0,5 g	Horno de microondas CEM	14 min	1400 W	AA Thermo Elemental	Estándar de sodio de 0,5 mg/L
Ecuador	AOAC 985.35 (EAAF)	1 g	Mufla	Hasta cenizas	500 °C	Perkin Elmer. Atomic absorption spectrometry	Disolución de NaCl
Jamaica	EA (Calibración externa)	0,5 g	Estufa carbolite	4 h	600 °C	Flame atomic emission spectrometry	Estándar de Na
México - CLAR	CLAR (estándar interno)	3 g	Digestor Buchi	2 h	380 -450 °C	Cromatógrafo de líquidos WATERS	NaCl, disoluciones de 2 a 1000 mg/kg
México - ICP-AES	CLAR (calibración externa)	0,5 g	Horno de microondas MARSx	100 min	1400 W	ICP-AES Iris Intrepid	NaCl, disoluciones de 2 a 1000 mg/kg
Perú - SENASA	USDA CLG-TM 3.00	0,3 - 0,6 g	Microondas	10 min	120 °C	ICP-MS	Estándar multielemental de 1000 ppm
Uruguay	Emisión atómica (estándar interno)	0,5 g	Microondas Anton Paar Multiwave 3000	---	---	ICP-OES/optima 3300	SRM-3141a

Tabla 13. Diferencias en las metodologías para el análisis de sodio.

País	Método	Peso muestra	Digestión			Medición	
			Equipo	Tiempo	Temperatura/potencia	Instrumento	Calibrante K
Argentina	Emisión	0,5 g	Horno mufla	16 h	550 °C	Espectro AA	K trazable NIST 1 g/L
Bolivia	AA (Flama)	0,2 - 0,3 g	Anton Paar Microwave	40 min	180 °C	Analyst 700 de Perkin Elmer	Patrones certificados de K de Perkin Elmer
Brasil	Emisión atómica	0,5 g	Anton Paar Microwave	50 min	1400 W	Perkin Elmer model 800 atomic absorption spectrometry	SRM-3141a
Colombia	Journal of Food Science, Vol 56, no. 5, 1991. (EAAF)	0,5 g	Horno de microondas CEM	14 min	1400 W	AA Thermo Elemental	Estándar de potasio de 0,8 mg/L
Jamaica	EAAF (calibración externa)	0,5 g	Estufa carbolite	4 h	600 °C	Flame atomic emission spectrometry	Estándar de K
México - CLAR	CLAR (estándar interno)	3 g	Digestor Buchi	2 h	380 -450 °C	Cromatógrafo de líquidos WATERS	KCl, disoluciones de 2 a 1000 mg/kg
México - ICP-AES	ICP-AES (calibración externa)	0,5 g	Horno de microondas MARSx	100 min	1400 W	ICP-AES Iris Intrepid	KCl, disoluciones de 2 a 1000 mg/kg
Perú - SENASA	USDA CLG-TM 3.00	0,3 - 0,6 g	Microondas	10 min	120 °C	ICP-MS	Estándar multielemental de 1000 ppm
Uruguay	ICP-AES (estándar interno)	0,5 g	Microondas Anton Paar Multiwave 3000	---	---	ICP-OES/optima 3300	SRM-3141a

Tabla 14. Diferencias en las metodologías para el análisis de potasio.

## Reconocimientos

A la Organización de los Estados Americanos por el apoyo del proyecto SEDI/AICD/AE/033/08 “Colaboración para Soportar con Metrología Química la Evaluación de la Calidad e Inocuidad de los Productos del Sector Agroalimentario”, y a la Dra. Mariana Arce Osuna por su implantación. A la I.Q. Judith García Escalante por su apoyo logístico de coordinación. A los participantes en las mediciones en esta etapa. A los coordinadores de los institutos participantes: Celia Puglisi, Juan Carlos Castillo, Mabel Delgado, Janaina Marques, Carlos Eduardo Porras, Mónica Gualotuña, James Kerr, Dwight Random, Yoshito Mitani, José Dajes, Elizabeth Ferreira, Claudia Santo.

## Referencias

- BADUI, Dergal S. *Química de los alimentos*. México: Alhambra Mexicana, 1981.
  - BIPM; IEC; IFCC; ISO; IUPAC; IUPAP; OIML. *Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Geneva: International Organization for Standardization, 1995.
  - DUEWER, D. L. A robust approach for the determination of CCQM key comparison reference values and uncertainties [En línea]. Gaithersburg: NIST, [s.d.]. [Consulta: 25 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://www.bipm.net/cc/CCQM/Allowed/10/CCQM04-15.pdf>
  - EGAN, H.; KIRK, R.S.; SAWYER, R. *Análisis químico de alimentos de Pearson*. México: Compañía Editorial Continental, 1987.
  - EURACHEM; CITAC. *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2da. ed. [s.l.]: EURACHEM, 2000. ISBN 0 948926 15 5.
  - MÜLLER, J. W. Possible advantages of a robust evaluation of comparisons. En: *Journal of Research at the National Institute of Standards and Technology*. 2000, 105:551.
  - SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN S.C. (NORMEX). (México). NMX-F-615-NORMEX-2004: *Alimentos – Determinación de extracto etéreo*. México: NORMEX, 2004.
-

# Influencia de la aplicación de ultra alta presión de homogeneización (UAPH) y de la $[Ca^{++}]$ en la estabilidad de la leche de arroz

## Study of the influence of the application of ultra-high pressure homogenization (UAPH) and $[Ca^{++}]$ on the stability of rice milk

Jorcín, Santiago <sup>(1)</sup>, Guamis, Buenaventura <sup>(2)</sup>, López, Tomás <sup>(1,2)</sup>

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

<sup>(2)</sup> Centre Especial de Recerca, Planta de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Contacto: [tlopezp@gmail.com](mailto:tlopezp@gmail.com)

Recibido: 26/7/2011 - Aprobado: 25/10/2012

### Resumen

Se analizaron bebidas de arroz sometidas a diferentes tratamientos térmicos y a UAPH. Se midió su tamaño de partícula y se correlacionó con medidas de estabilidad; se observó que las muestras procesadas por UAPH tienen una estabilidad significativamente mayor. Se estudió la interacción entre micronutrientes ( $Ca^{++}$ ) y las proteínas de la bebida y se halló que al aumentar la concentración de  $Ca^{++}$  la estabilidad de la bebida disminuye hasta alcanzar 80 ppm de  $Ca^{++}$ , a partir de la cual se mantiene constante. Los recuentos de mesófilos aerobios totales, esporas, *Bacillus Cereus* y *Enterobacteriaceae* para muestras tratadas por UAPH (temperatura de entrada 85 °C, 300 MPa temperatura en válvula 135 °C) y UAT (142 °C 6 seg) muestran una supervivencia menor a 1 UFC/mL en ambos tratamientos para todos los recuentos. Se incubaron las muestras UAPH y UAT a 30 °C durante dos semanas sin desarrollo microbiano o alteración alguna. El proceso de ultra alta presión de homogeneización (UAPH) demostró ser una tecnología válida para estabilizar y preservar la leche de arroz al reducir el tamaño de las partículas por debajo del micrómetro, favoreciendo la estabilidad fisicoquímica de la bebida y generando, concomitantemente, una reducción de la flora alterante.

Palabras clave: Bebida vegetal, UAPH, arroz, estabilidad.

### Abstract

Designed rice milk formulations were submitted to different thermal treatments and UHPH treatments. Particle size profiles were measured and related to physicochemical stability. The samples processed by UHPH showed higher stability than milk processed thermally only. From the study of the interaction between micronutrients ( $Ca^{++}$ ) and rice proteins it was found that increasing  $Ca^{++}$  concentration up to 80 ppm decreases the stability of the beverage to a minimum. For UHPH treated samples (inlet temperature 85 °C, 300 MPa valve temperature 135 °C) and UHT (142 °C 6 s), total counts, spores, *Bacillus Cereus* and *Enterobacteriaceae* remained all below the detection limit of 1 UFC/mL. UHPH and UHT samples were incubated at 30 °C for two weeks without microbial growth or alteration. UHPH proved to be a valid technology to stabilize and preserve rice milk by reducing particle size below 1  $\mu$ m and reducing spoiling bacteria.

Keywords: Vegetable drink, UHPH, rice, stability.

## Introducción

El arroz (*Oriza sativa* L.) es uno de los cultivos más extendidos en el mundo y el principal alimento de más de la mitad de la población mundial (Álvarez et al., 2008). Uruguay se muestra como país netamente exportador de arroz y productos derivados y ha realizado estudios que permitieron obtener granos de gran calidad, mayormente enfocados hacia la mejora de los cultivos, las variedades y los rendimientos de producción. En el arroz blanco, la glutelina es la fracción proteica predominante y contiene un alto contenido de lisina, a diferencia del resto de los cereales (exceptuando la avena), que presentan a la prolamina como mayoritaria. Los valores de fibra cruda y de lípidos son bajos; P y K son los minerales mayoritarios y

niacina, inositol y colina las vitaminas predominantes. El arroz blanco se compone básicamente del endosperma con un alto contenido de almidón (aproximadamente 78 % en base húmeda o 90 % en base seca).

El salvado de arroz es una muy buena fuente energética (12-15 % grasa), cuenta con un alto contenido de fibras (20 %) y un 13 % de proteína de buena calidad biológica, la mayor parte albúmina y globulina, consideradas como hipoalergénicas (Helm y Burks, 1996). La fracción lipídica contiene un perfil de ácidos grasos balanceado y rico en antioxidantes como vitaminas (por ejemplo, complejo B y alfa-tocoferol; Carroll, 1990). La fracción serosa del salvado contiene policosanol, eficiente para disminuir los niveles de LDL-colesterol (lipoproteínas de baja densidad transportadoras de colesterol) e incrementar los de HDL-colesterol (lipoproteínas de alta densidad

transportadoras de colesterol; Zardoya et al., 1996).

Existe un porcentaje de arroz partido que es vendido a bajo precio o destinado a la alimentación de animales. Por otra parte, el salvado de arroz desgrasado se infravalora cuando es destinado para ración animal o como combustible y fuente de sílice. Debido a su bajo costo y composición, resulta pertinente considerar estas fracciones para su utilización como ingredientes principales de formulaciones de leche de arroz y bebidas funcionales de arroz. En consecuencia, las bebidas a base de arroz están compuestas por almidón de arroz, proteínas del grano y lípidos agregados (aceite de girasol con alto contenido de oleico). Comparada con la leche bovina, contienen menor tenor en proteínas y mayor en carbohidratos y pueden considerarse como una alternativa hipoalérgica. Presentan, además, deficiencias en su contenido de minerales como el calcio y vitaminas.

El proceso de ultra alta presión de homogeneización (u homogeneización a altas presiones) acapara actualmente la atención por su capacidad para reducir el tamaño de las partículas por debajo del micrómetro, generar nanoemulsiones y la posibilidad que ofrece de encapsular compuestos bioactivos con el fin de introducirlos posteriormente en matrices alimentarias (Gracia et al., 2008).

Los homogeneizadores utilizados tradicionalmente operan en el rango de 20 a 60 MPa (200-600 bar). Se utilizan para disminuir el tamaño de partículas, gotas de emulsiones o glóbulos grasos de la leche con el propósito de mejorar su estabilidad y evitar los fenómenos de coalescencia y cremado durante su preparación y almacenamiento (Walstra, 2003). La UAPH consiste en forzar el pasaje de un fluido llevado a 200-400 MPa (2000-4000 bar) a través de un orificio de escasos  $\mu\text{m}$  (Floury et al., 2002; Thiebaud et al., 2003; Floury et al., 2004; Diels et al., 2005; Gracia-Julia et al., 2008). La brusca bajada de presión en la válvula se acompaña de la generación de fuerzas mecánicas importantes (fuerzas de cizalla elongacionales, turbulencias, cavitación, impactos). Todas estas fuerzas, así como la rapidez elevada del fluido, contribuyen al fraccionamiento de las partículas presentes en el líquido tratado. Este fraccionamiento permite aumentar considerablemente el área interfasial de las partículas en suspensión en el líquido tratado. De esta manera se pueden obtener emulsiones muy finas y estables, con una textura particular. El calentamiento del fluido que acompaña su pasaje por la válvula HP puede ser moderado y controlado gracias a un sistema de refrigeración eficaz colocado a la salida de la válvula (Picart et al., 2006; Gracia-Julia et al., 2008). Resulta particularmente interesante remarcar que la reducción del tamaño de partícula se acompaña de una higienización del fluido tratado (Briñez et al., 2006). El proceso de UAPH permite también inactivar las enzimas o microorganismos presentes en los fluidos alimentarios (Moroni et al., 2002; Vachon et al., 2002; Thiebaud et al., 2003; Vannini et al., 2004; Datta et al., 2005; Diels et al., 2005; Hayes et al., 2005; Picart et al., 2006; Briñez et al., 2006).

Los efectos de la UAPH (200-300 MPa) fueron estudiados sobre una formulación base tradicional de leche de soja y comparados con un tratamiento de ultra alta temperatura (UAT) por Cruz et al. (2007), quienes muestran resultados prometedores en relación a la aplicación de UAPH para estabilizar bebidas vegetales. El análisis de perfil de tamaño de partícula evidenció una intensa reducción de las partículas, aunque también se observaron fenómenos de agregación. Las muestras procesadas por UAPH resultaron más estables respecto a la sedimentación, estabilidad que se mantuvo por 60 días. Los análisis de calorimetría diferencial de barrido indicaron que las proteínas de soja se encontraban parcialmente desnaturadas a 200 MPa, mientras que los tratamientos de 300 MPa mostraron el mismo grado de desnaturación que el tratamiento UAT.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la aplicación de UAPH en leche de arroz en comparación con tratamientos térmicos tradicionales e investigar la influencia de la  $[\text{Ca}^{++}]$  en la estabilidad de la leche de arroz.

## Materiales y Métodos

### Estudio de diferentes procesos de preparación de la bebida

La bebida de arroz se preparó a partir de arroz integral (arroz El Paso 144, Saman, Uruguay), aceite de girasol con alto contenido de oleico y agua destilada. Para cada producción se obtuvieron cuatro tipos de bebidas en función del procesamiento recibido: cruda (sin procesamiento posterior a la elaboración), pasteurizada, UAT y tratada a UAPH.

### Estudio de la interacción entre el $\text{Ca}^{++}$ y las proteínas de la bebida de arroz

Se preparó bebida de arroz como se describió anteriormente, utilizando agua destilada, y se tomaron cinco pares de alícuotas. A una de las alícuotas se le agregó  $\text{CaCl}_2$  y se le midió el pH, a la otra alícuota solo se le corrigió el pH con  $\text{HCl}$  0,05 M para que fuera igual al de la alícuota que contenía el  $\text{CaCl}_2$  (esto se realizó para las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  de 0, 31, 63, 105 y 144 ppm).

Luego se centrifugaron las muestras a 10000 g a 4 °C durante 20 min y se midió la concentración de proteínas en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). En todos los casos fue utilizada como blanco la bebida de arroz adicionada de ácido tricloroacético 20%.

### Tratamientos

Leche cruda: se calentó la mezcla de agua, aceite de girasol con alto contenido de oleico y arroz hasta 80 °C bajo agitación, se mantuvo la temperatura durante 10 min y luego se deja enfriar.

Las fracciones de leche de arroz cruda fueron procesadas por triplicado según:

Pasteurización (76 °C 90 segundos, pasteurizador ATI Granollers España tipo intercambiador tubos concéntricos) previo homogeneizado 180 bar (en homogeneizador de simple etapa Rannie mod lab 22.51, Dinamarca); ultra alta temperatura (142 °C 6 segundos, equipo de UAT intercambiador tubular indirecto multitubo GEA Finnan mod 6500, Alemania) previa homogeneización primera etapa 180 bar y segunda etapa 40 bar (homogeneizador doble etapa NIRO SOAVI mod X68IE Italia); ultra alta presión de homogeneización, presión de homogeneización de 300 MPa, temperatura de entrada 85 °C, que alcanza una temperatura de 135 °C durante 0,6 segundos y temperatura de salida de 15 °C (Benchtop Homogenizer FPG 12500 Stansted Fluid Power LTD., UK) sistema patentado (Guamis, 2010).

### Medición del tamaño de partícula

Para todas las preparaciones se determinó el perfil de tamaño de partícula (Mastersizer 2000 Malvern instruments LTD, United Kingdom). El tamaño de partícula se caracterizó analizando los diámetros de partícula equivalentes  $D_{3,2}$  (diámetro medio de las esferas de área superficial equivalente) y  $D_{4,3}$  (diámetro medio de las esferas de masa equivalente), utilizando el valor del índice de refracción 1,330.

### Estabilidad

Se centrifugaron las muestras a 1046 g durante 20 min a 4 °C, se midió el peso del precipitado (ppto) y se expresaron los resultados en relación al ppto más estable del tratamiento UAPH.

## Microbiología

Se realizó para todas las preparaciones: recuento microbiológico de mesófilos aerobios totales (Plate Count Agar, PCA), esporas (PCA), *Bacillus cereus* (Bacillus brillante) y coliformes totales (Violet Red Bile Agar, VRBG). Inmediatamente después de su tratamiento, las muestras recogidas de forma aséptica de los procesos UAT y UAPH fueron incubadas a 30 °C durante dos semanas.

## Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó en todos los casos con el programa XLSTAT 2009, con el que se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones por pares de Tukey (HSD) con nivel de significancia de 0,05.

## Resultados y Discusión

### Interacción del Ca<sup>++</sup> con las proteínas de arroz

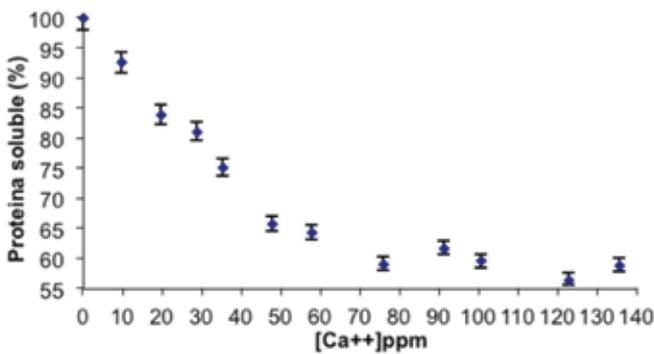


Figura 1. Valores medios de porcentaje de proteína soluble en función de la concentración de Ca<sup>++</sup> (ppm) (expresados en relación de porcentaje respecto a la concentración de proteína soluble de la bebida sin calcio adicionado). Las bandas horizontales indican intervalo de confianza con un nivel de significación de 0,05.

El efecto ejercido por el incremento del Ca<sup>++</sup> sobre las proteínas del arroz se traduce en una desestabilización de la bebida (precipitación de las proteínas), que aumenta con la concentración de Ca<sup>++</sup> hasta que alcanza 80 ppm, a partir de la cual se mantiene constante (Figura 1). Este efecto se atribuye a que la concentración de proteína presente en la leche de arroz es capaz de interactuar con una concentración de hasta 80 ppm de Ca<sup>++</sup>, y llega al máximo de desestabilización ante la presencia de calcio en esas condiciones. Como explicación del efecto se propone la teoría de que el Ca<sup>++</sup> interactúa con las proteínas de manera tal que modifica su conformación exponiendo grupos carbonilos, lo que promueve una leve disminución de pH y, concomitantemente, la precipitación de las proteínas. En las Figuras 2 y 3 es posible discriminar el efecto provocado sobre las proteínas por el cambio de pH del efecto netamente provocado por el Ca<sup>++</sup>.

Otros autores reportan para la leche de soya interacciones similares que provocan desestabilización en mayor o menor medida según el tipo de sal de calcio agregada y la concentración. Según Pattavara et al. (2010), la adición de 25mM de cloruro de calcio a la leche de soya reduce el pH, aumenta la fuerza iónica y provoca coagulación de las proteínas.

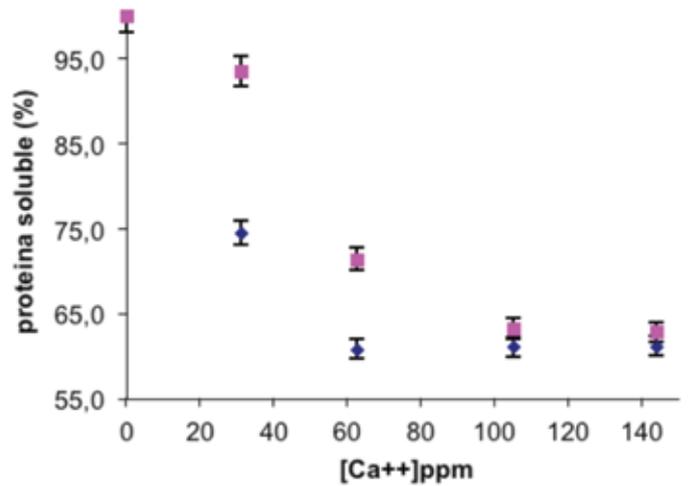


Figura 2. Valores medios de porcentaje de proteína soluble en función de la concentración de Ca<sup>++</sup> (ppm, ◆) y porcentaje de proteína soluble en función del pH generado luego de la adición de Ca<sup>++</sup> (ajustado para cada concentración de calcio, ■). Se tomó en ambos casos como 100 % la concentración de proteína soluble en la leche de arroz sin la adición de Ca<sup>++</sup>. Las bandas horizontales indican intervalo de confianza con un nivel de significación de 0,05.

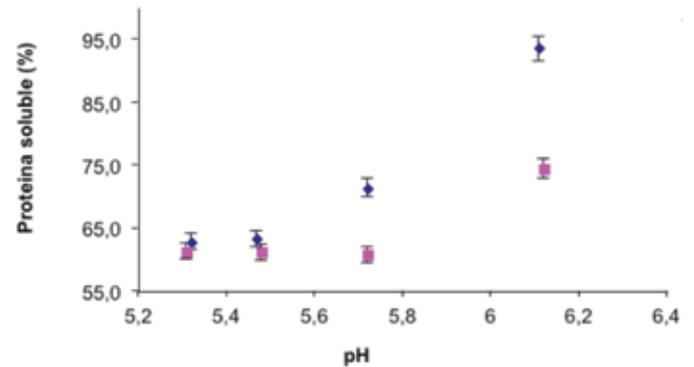


Figura 3. Valores medios de porcentaje de proteína soluble en función del pH para la bebida sin Ca<sup>++</sup> (◆) y porcentaje de proteína soluble en función del pH para la bebida con Ca<sup>++</sup> (■). Se tomó en ambos casos como 100 % la concentración de proteína soluble en la leche de arroz sin la adición de Ca<sup>++</sup>. Las bandas horizontales indican intervalo de confianza con un nivel de significación de 0,05.

### Estabilidad frente a la centrifugación

La influencia de la disminución en el tamaño de partícula puede observarse en los estudios de estabilidad forzados mediante centrifugación a 1046 g (Tabla 1). Esto explica la menor separación de fases y estabilidad observada en las leches de arroz procesadas mediante UAPH.

Leche de arroz	Relación de ppto en bae a la UAPH
Cruda	5.38 ± 0.16
Pasteurizada	2.49 ± 0.11
UAT	1.54 ± 0.11
UAPH	1.00 ± 0.05

Tabla 1. Relación de ppto en base a la bebida tratada por UAPH.

La distribución del tamaño de partícula de los tratamientos se muestra en la Figura 4 y los diámetros medios ponderados de superficie y volumen de las esferas equivalentes se presentan en la Tabla 2.

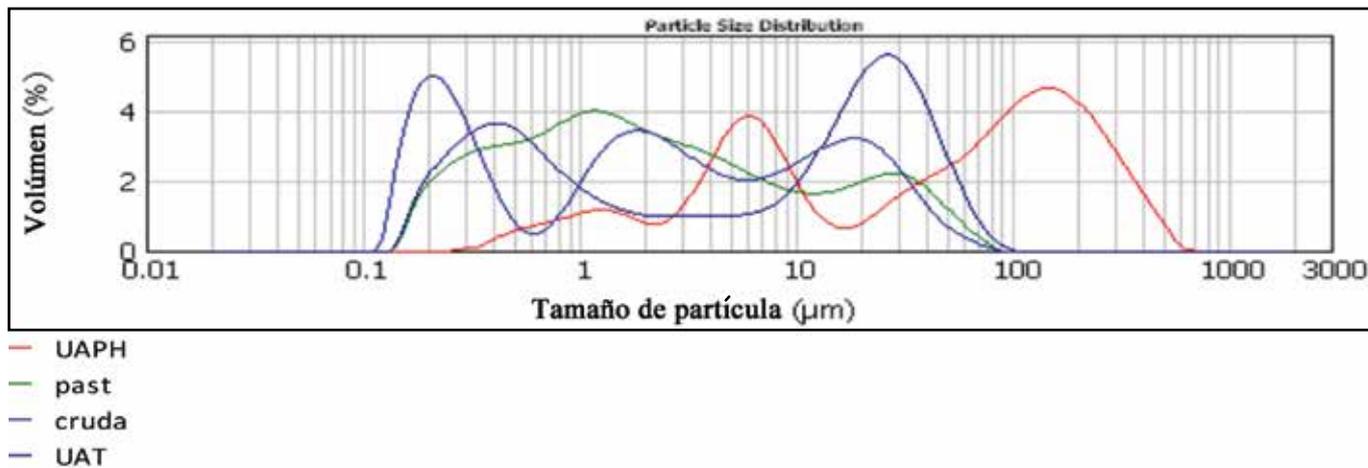


Figura 4a. Distribución de tamaño de partícula en relación al porcentaje de volumen para los diferentes tratamientos.

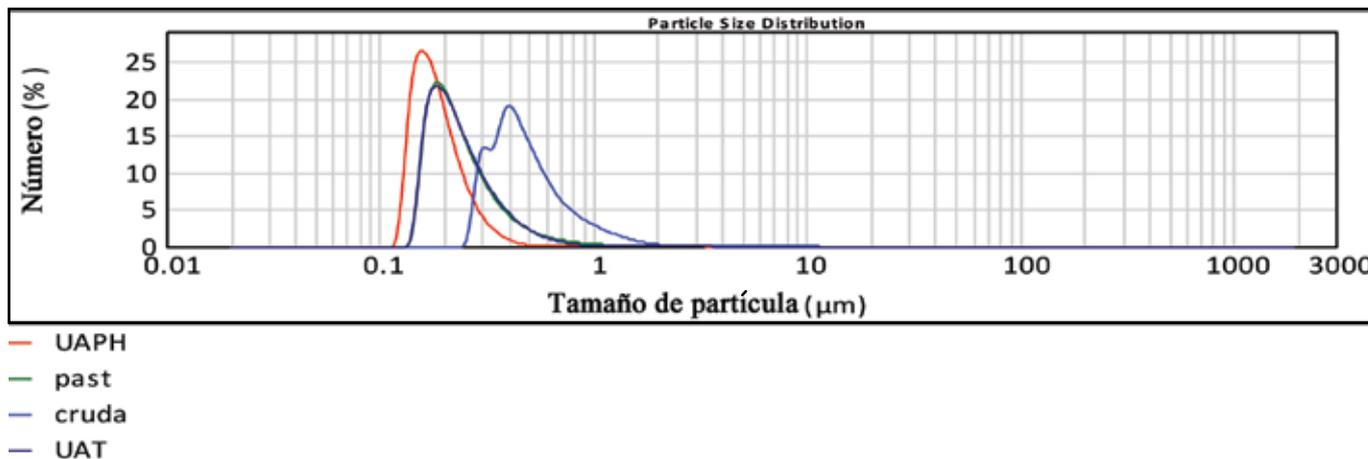


Figura 4b. Distribución de tamaño de partícula en relación al porcentaje de partículas totales para los diferentes tratamientos.

Leche de arroz	D[3,2] µm	D[4,3] µm
Cruda	5.829	95.541
Pasteurizada	0.934	7.754
UAT	0.997	15.098
UAPH	0.0651	7.889

Tabla 2. Diámetros medios de partículas en las distintas muestras de leche de arroz expresado como diámetro de esfera de superficie y volumen equivalente D[3,2] y D[4,3], respectivamente.

Leche de arroz	PCA recuento total UFC/ml	PCA esporas UFC/ml	Bacillus brillante <i>Bacillus cereus</i> UFC/ml	VRBG coliformes UFC/ml
Cruda	(2.62 ± 0.6) E+05	(8.67 ± 1.6) E+01	(1.17 ± 0.7) E+03	(2.50 ± 0.4) E+03
Pasteurizada	(1.00 ± 0.3) E+02	(6.02 ± 1.2) E+01	(5.17 ± 0.3) E+01	≤1
UAT	≤1	≤1	≤1	≤1
UAPH	≤1	≤1	≤1	≤1

Tabla 3. Recuento microbiológico de las cuatro preparaciones, realizados inmediatamente después de cada tratamiento.

Si bien para todos los tratamientos el tamaño de partícula máximo (Figura 4a) se reduce a 100  $\mu\text{m}$ , para el proceso UAPH la reducción del tamaño medio de partícula es significativo con respecto a la leche cruda y a los tratamientos térmicos. El D<sub>4,3</sub> también expresa que la formación/presencia de partículas/agregados de tamaño superior a la media es menor (Tabla 2). El 90 % de las partículas de la bebida procesada por UAPH tiene un diámetro de partícula menor a 0,262  $\mu\text{m}$ ; esto condice con lo reportado por Polisel-Scopel (2011) para bebidas de soya donde el 80-95% del volumen total de partículas está en el rango de 0 - 0,6  $\mu\text{m}$ .

## Microbiología

### Recuentos microbiológicos de los distintos tratamientos

Luego de una y dos semanas de incubación, los recuentos para todos los microorganismos de las leches UAT y UAPH fueron inferiores a 1 UFC/mL, por debajo del límite de detección de la técnica. Los resultados microbiológicos indican que es posible comparar el proceso UAPH con la aplicación de tratamientos térmicos tradicionales; resultados similares se reportan para bebidas de soya tratadas por UAT (142 °C, 6 segundos) y UAPH (300 MPa, temperatura de entrada 75 °C) en la que una incubación por 20 días a 30 °C no mostró desarrollo microbiano (Polisel-Scopel et al., 2011).

## Conclusiones

La interacción del  $\text{Ca}^{++}$  con las proteínas de arroz provoca posos en las bebidas de arroz. Para la formulación estudiada la desestabilización de la bebida aumenta con la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  hasta que alcanza 80 ppm, concentración a partir de la cual se mantiene constante.

Los resultados microbiológicos indican que es posible comparar el proceso UAPH con la aplicación de tratamientos térmicos tradicionales, con el beneficio agregado de un aumento en la estabilidad de la bebida frente a la formación de sedimento y el cremado. Así, resulta evidente el gran potencial que presenta la UAPH para ser aplicada en leche de arroz, cuya materia prima es una de las de mayor producción en Uruguay.

## Referencias

- ÁLVAREZ, ROSA. M.; PÉREZ, MÓNICA.; REYES EDICTA.; MORENO ORLANDO. J.; DELGADO NELLY.; TORREALBA, GELIS. T.; ACEVEDO MARCO. A.; CASTRILLO WILLIAM .A.; NAVAS MARÍA. I.; SALAZAR MARBELYS.; TORRES ORLANDO. J.; TORRES EDGAR. A.; GARCÍA PEDRO. J.; PÉREZ ALBERTO. Evaluación comparativa de híbridos y variedades de arroz en los llanos centroccidentales de Venezuela. En: *Agronomía Trop.* 2008, 58(2):101-110.
- BRIÑEZ, W.J.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.M.; GUAMIS-LÓPEZ, B. Inactivation of *Listeria innocua* in milk and orange juice by ultrahigh-pressure homogenization. En: *Journal of Food Protection.* 2006, 69(1):86-92.
- CARROLL, L.E. Functional properties and applications of stabilized rice bran in bakery product. En: *Food Technology.* 1990, 44(4):74-76.
- CRUZ, N.M.; CAPELLAS, M.; HERNÁNDEZ, A.J.; TRUJILLO, B.; GUAMIS, V.; FERRAGUT. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. En: *Food Research International.* 2007, 40:725-732.
- DATA, N.; HAYES, M. G.; DEETH, H. C.; KELLY, A. L. Significance of frictional heating for effects of high pressure homogenisation on milk. En: *J. Dairy Res.* 2005, 72:1-7.
- DIELS, A. M. J.; CALLEWAERT, L.; WUYTACK, E.Y.; MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C.W. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity

but not by water activity and product composition. En: *International Journal of Food Microbiology.* 2005, 101:81-291

- FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M. A. V.; LEGRAND, J. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenisation. En: *Food Hydrocolloids.* 2002, 16:47-53.
- FLOURY, J.; BELLETTRE, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A. Study of the flow pattern. En: *Chemical Engineering Science.* 2004, 59:843-853.
- GRACIA-JULIA, A.; RENE, M.; CORTES-MUÑOZ, M.; PICART, L.; LOPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. En: *Food Hydrocolloids.* 2008, 22:1014-1032.
- GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.; FERRAGUT, V.; QEVEDO, J.M.; LOPEZ, T.; BUFFA, M. *Sistema continuo y procedimiento de esterilización y estabilización física de fluidos bombeables mediante UAPH.* Patente Europea 10380094.2. 2010-07-21.
- HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. 2005. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of milk. En: *J. Dairy Res.* 2005, 71:1-9.
- HELM; BURKS. Hypoallergenicity of rice bran protein. En: *Cereal Foods World.* 1996, 41:839-843.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. En: *Journal of Biological Chemistry.* 1951, 193:265-275.
- MORONI, O.; JEAN, J.; AUTRET, J.; FLISS, I. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. En: *Int. Dairy J.* 2002, 12:907-913.
- PATAVARA PATHOMRUNGSIYOUNGGUL, MICHAEL J. LEWIS, ALISTAIR S. GRANDISON. Effects of calcium-chelating agents and pasteurisation on certain properties of calcium-fortified soy milk. En: *Food Chemistry.* 2010, 118:808-814.
- PICART, L.; THIEBAUD, M.; RENÉ, M.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTEL, J. C.; DUMAY, E. Effects of high pressure homogenization of raw bovine milk on alkaline phosphatase and microbial inactivation. A comparison with continuous short-time thermal treatments. En: *J. Dairy Res.* 2006, 73:1-10.
- POLISELI-SCOPEL FÁBIO H.; HERNÁNDEZ-HERRERO MANUELA; GUAMIS, BUENAVENTURA; FERRAGUT, VICTORIA. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. En: *Food Science and Technology.* 2011, 46:42-48.
- THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTEL, J.C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. En: *Int. Dairy J.* 2003, 13:427-439.
- VACHON, J. F.; KHEADR, E. E.; GIASSON, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. En: *J. Food Prot.* 2002, 65(2):345-352.
- VANNINI, L.; LANCIOTTI, R.; BALDI, D.; GUERZONI, M.E. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. En: *Int. J. of Food Microbiol.* 2004, 94:123-135
- WALSTRA, P. Formation of emulsions and foams. En: WALSTRA, P. *Physical chemistry of foods.* New York: Marcel Dekker, 2003. pp. 397-436.
- ZARDOYA, R.; TULA, L.; CASTAÑO, G.; MÁS, R.; ILLNAIT, J.; FERNÁNDEZ, J. C.; DÍAZ, E.; FERNÁNDEZ, L. Effects of serum biochemistry on hypercholesterolemic patients with abnormal serum biochemical indicators of hepatic function. En: *Curr. Ther. Res.* 1996, 57:568-577.

# Vida útil de tapas de empanadas con películas biodegradables como separadores

## Shelf life of pie caps with biodegradable films as spacers

Escobar Gianni, Daniela Verónica <sup>(1)</sup>, Sala, Angelina <sup>(2)</sup>, Silvera, Carlos <sup>(2)</sup>, Harispe, Rodrigo <sup>(3)</sup>, Márquez Romero, Rosa <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Gerencia de Proyectos Alimentarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - <sup>(2)</sup> Universidad Católica del Uruguay Dámaso Antonio Larrañaga, UCU, Uruguay - <sup>(3)</sup> Alimentos RH, Uruguay

Contacto: descobar@latu.org.uy

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 28/9/2012

### Resumen

Las tapas de empanadas utilizan películas de polietileno como separadores. Este trabajo estudia la sustitución de los separadores convencionales por películas comestibles en base a aislado de proteína de suero (WPI) con sorbato de potasio como conservador. La finalidad es reemplazar una película convencional por una biodegradable, que no se pega en la masa y facilita la separación, buscando también un aumento de vida útil. Las películas elaboradas por el método de moldeo por compresión se utilizaron como separadores en tapas de empanadas sin sorbato de potasio en la masa (A) y con sorbato de potasio en la masa (B), y se compararon con los separadores convencionales de polietileno (C). Mensualmente y durante cuatro meses se realizó el análisis sensorial, microbiológico y de humedad de las tapas, así como de humedad y solubilidad en las películas. Ninguna de las muestras presentó deterioro microbiológico ni sensorial en los cuatro meses estudiados; los atributos presentaron ninguna o ligera diferencia en el tiempo de estudio. Entre muestras, las diferencias fueron ligeras: las mejores puntuaciones las tuvieron en color la muestra A, en sabor la muestra C y en textura y agrado general las muestras B y C. Las películas comestibles tienen un interesante potencial para esta aplicación, aunque se debe trabajar en enmascarar el flavor del suero.

Palabras clave: Películas biodegradables, tapas de empanadas, vida útil, conservador.

### Abstract

Commonly pie caps at market use polyethylene films as spacers between them. This paper studies the conventional spacers replacement with edible and biodegradable films made with whey protein isolate (WPI) and potassium sorbate as a preservative. Besides facilitating the separation of pie caps, with this application is intended to increase their shelf life. The films made by the compression molding method were used as spacers in pie caps without preservative in their formula (A) and with preservative (B) and they were compared with conventional polyethylene spacers (C). During four months, monthly sensory, microbiological and physicochemical (humidity) evaluations were done on the pie caps, together with humidity and solubility evaluations of the films. None of the samples showed microbiological or sensory deterioration. The sensory attributes showed no or slight difference in study time. Between samples the differences were minor: the best scores were for sample A in color, sample C in flavor, and samples B and C in texture and overall liking. The edible films have an interesting potential for this application, although studies in disguise the flavor of serum should be done.

Keywords: Biodegradable films, pie caps, shelf life, preservative.

## Introducción

Por su carácter biodegradable y flexible, las películas comestibles tienen un amplio potencial de uso como alternativa de empaque de alimentos. Éstas son utilizadas en contacto directo con el alimento, cubriendo su superficie externa para separarlo del ambiente exterior o separando superficies internas para aislar la interacción entre sus componentes. En los últimos años se han estudiado una gran diversidad de aplicaciones en películas elaboradas con diferentes matrices alimentarias de polímeros naturales obtenidos de proteínas animales y vegetales, lípidos, polisacáridos, gomas, etcétera, con una extensa variedad en propiedades mecánicas y de barrera (Daraba, 2008).

Existen estudios de aplicación de películas para la mejora de

la calidad y vida útil de los alimentos, con el fin de ser utilizadas como empaque para pequeñas porciones, entre otras, peras, frijoles, nueces y frutillas. También se utilizan en las interfases heterogéneas de algunos alimentos como pizzas y tartas para la prevención de su deterioro (Bourtoom et al., 2008). Una de las ventajas que presentan es el control del desarrollo microbiano, en algunos casos formando parte de la matriz, en el quitosano, por ejemplo, y en otros con el agregado de aditivos, alcanzando buenos resultados (Dutta et al., 2009; Kristo et al., 2008; Lungu y Johnson, 2005; McCormick et al., 2005).

Las películas producidas con aislado de proteínas lácteas (WPI) son excelentes candidatos por sus características funcionales y nutricionales, pues presentan buenas propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno (Escobar et al., 2008). Adicionalmente, el uso de

proteínas lácteas para elaboración de películas biodegradables a nivel industrial tendría un beneficioso impacto ambiental, con otro producto para el aprovechamiento del suero de quesería.

Las tapas de empanadas utilizan películas de polietileno como separadores entre una y otra. Presentan dificultad de separación debido a la adherencia de los separadores utilizados, los cuales son, además, un desecho para el medio ambiente.

La sustitución de los separadores de polietileno por las películas de aislado de suero de proteína láctea tiene la ventaja de que las segundas pueden ser comestibles, son biodegradables, facilitan más la separación de las tapas y permiten incluir un conservante en la película, evitando que sea incorporado en la formulación de la masa.

En la actualidad la empresa RH, productora de las empanadas, las comercializa con una vida útil de dos meses.

Este trabajo estudia la vida útil de las tapas de empanadas, utilizando películas comestibles y de polietileno tradicional durante cuatro meses. Se evalúan la calidad microbiológica y sensorial de las tapas de empanadas, su variación de humedad y de actividad de agua. Se estudian, también, los cambios de humedad y la solubilidad de las películas a lo largo de ese tiempo.

## Materiales y Métodos

### Preparación de las películas por método de compresión y moldeo

Las películas se prepararon a partir de una mezcla de WPI (proteína aislada de suero lácteo PROVON® 290, 90 % p/p de Glanbia Nutritionals, WI, USA), glicerol (Merck) y agua. Se elaboraron manteniendo una relación de WPI/plastificante 2,3/1 y un 18 % (p/p) de humedad. La mezcla se batió en batidora manual a la mínima velocidad durante 15 minutos y se amasó; posteriormente se almacenó en bolsas de polietileno a 5 °C durante 24 horas para equilibrar sus componentes. Se colocaron esferas de 3 g de mezcla entre las placas de la prensa de laboratorio (Toyoseiki, P2-25T), se sometieron a temperatura de 140 °C y presión de 1 MPa durante 2 minutos y se retiraron luego de 3 minutos de enfriamiento. En las películas con sorbato de potasio en una proporción del 10 % éste fue disuelto en el agua de la mezcla antes de agregarse.

### Elaboración de tapas de empanadas y utilización de las películas

Según la formulación tradicional de la empresa RH alimentos, se realizaron dos tipos de formulaciones de las tapas de empanadas: con y sin sorbato de potasio en la masa. El peso de cada tapa de empanada fue de 33 g. Las tapas se envasaron en bolsas de polietileno que contenían 10 unidades cada una.

Una vez elaboradas las masas de las tapas empanadas, se colocaron los separadores entre las tapas según los casos de estudio:

A: Tapas de empanadas sin sorbato de potasio en la masa, con película como separador.

B: Tapas de empanadas con sorbato de potasio en la masa, con película como separador.

C: Tapas de empanadas con sorbato de potasio en la masa, con separador de polietileno tradicional.

Luego de colocar los separadores entre las tapas (polietileno o película, dependiendo del caso), fueron envasadas en las bolsas de polietileno que utiliza la empresa habitualmente al comercializar. Las

muestras se mantuvieron refrigeradas a 4 °C durante los cuatro meses de estudio.

Todos los análisis fueron realizados a tiempo cero (24 horas luego de elaboradas las películas y/o envasadas las tapas de empanadas) uno, dos, tres y cuatro meses.

### Humedad y solubilidad en agua de las películas

La solubilidad en agua se definió como el porcentaje de materia seca de la película solubilizada después de 24 horas de inmersión en agua (Gontard et al., 1994). El contenido inicial de materia seca (%) y de humedad se determinó gravimétricamente secando las muestras de las películas a 105 °C en una estufa con circulación de aire por 24 horas. Se cortaron tres discos de película de 2 cm de diámetro, se pesaron y se colocaron en un vaso de bohemia con 50 mL de agua. Se llevaron a una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Co., modelo G25) a 20 °C y 62 rpm. A continuación, las muestras de películas se quitaron de los vasos y se secaron en una estufa a 105 °C durante 24 horas, para así determinar la materia seca no soluble en agua. Restando este valor del peso de materia seca inicial se obtuvo el peso de materia seca que se solubilizó en agua durante 24 horas y se expresó como un porcentaje de la materia seca inicial. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

### Humedad y actividad de agua de las tapas de empanadas

La humedad se determinó por método gravimétrico en estufa a 105 °C con circulación de aire durante 24 horas. Se determinó actividad de agua con equipo Aqualab Series 3TE (a 25 °C). Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Evaluación sensorial y vida útil de tapas de empanadas

Las tapas de empanadas se calentaron en horno a 230 °C durante 5 minutos y se realizó con consumidores la evaluación sensorial de los atributos color, sabor, textura y agrado general, utilizando una escala hedónica de nueve puntos (1-Me disgusta muchísimo a 9-Me gusta muchísimo), a los 0, 1, 2, 3 y 4 meses.

Las tapas sin hornear fueron evaluadas por un panel de siete jueces, quienes evaluaron el color, el olor y la dificultad de separación de las tapas.

### Recuento de hongos y levaduras de las tapas de empanadas

Se determinó según APHA. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados utilizando análisis de varianza (ANOVA), con el software Infostat, y las comparaciones fueron realizadas por test de Tukey.

## Resultados y Discusión

### Humedad y solubilidad de películas. Humedad y actividad de agua en tapas de empanadas

	Muestra	Tiempo (meses)				
		0	1	2	3	4
Humedad (%)	A	35.8 b	42.4 d	44.5 de	45.8 e	44.4 de
	B	31.7 a	38.8 c	43.0 d	42.7 d	43.0 d
Solubilidad (%)	A	27.8 de	21.2 ab	22.2 ab	20.5 a	21.0 ab
	B	29.8 e	26.0 cd	22.0 a b	23.9 bc	22.2 ab

Tabla 1. Humedad y solubilidad de las películas comestibles A y B durante los cuatro meses de estudio. Medias con letras iguales no representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los separadores de tapas de empanadas A y B (sin y con conservador) presentaron un aumento de la humedad de las películas en los dos primeros meses de almacenamiento, y no se registraron diferencias significativas de humedad entre las muestras durante los meses posteriores (Tabla 1). Esta tendencia se observó en los dos casos estudiados; la humedad de las películas utilizadas en las muestras con sorbato de potasio (B) fue menor a las sin sorbato (A) en todo el estudio. La humedad aumentó tras dos meses de almacenamiento, de 35,8 a 44,5 % y de 31,7 a 43,0 % en las muestras A y B, respectivamente.

Contrariamente al aumento de humedad, se produjo una disminución de la solubilidad de las películas, desde 27,8 a 21,2 al mes de almacenado en las películas sin conservador (A) y de 29,8 a 22,0 luego de dos meses de almacenadas en las películas con conservador (B). La disminución de solubilidad al agua de las películas es deseada para la mejora de la estabilidad de la película en contacto con alimentos que presentan humedad, por lo que el almacenamiento le confiere mayor estabilidad desde el punto de vista de solubilidad a la película. Los valores de solubilidad encontrados fueron de 29,8 %, los cuales disminuyeron con el tiempo de almacenamiento y fueron menores que los presentados en el estudio realizado por Escobar et al. (2009), de 39 % de solubilidad al agua.

	Muestra	Tiempo (meses)				
		0	1	2	3	4
Humedad (%)	A	30.3 abc	30.9 c	30.8 c	30.8 c	30.7 c
	B	30.7 c	30.5 bc	29.5 ab	29.9 abc	29.7 ab
	C	32.7 d	32.7 d	31.9 d	31.9 d	32.1 d
$a_w$	A	-	0.923 a	0.930 b	0.930 b	0.931 b
	B	-	0.920 a	0.932 b	0.930 b	0.927 ab
	C	-	0.949 c	0.948 c	0.942 c	0.945 c

Tabla 2. Humedad y actividad de agua de las tapas de empanadas con los distintos separadores utilizados A, B y C, durante los 4 meses de estudio. Medias con letras iguales no representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Las tapas de empanadas en las que se usó polietileno como separador siempre mantuvieron un nivel de humedad superior al de las tapas de empanadas que usaron películas como separadores. Esto puede deberse a que en las 24 horas de almacenamiento que transcurrieron entre el envasado y la realización del primer análisis (tiempo cero) haya existido una migración de humedad de las tapas hacia las películas comestibles, lo cual no ocurrió con los separadores de polietileno. En estudios reportados por Escobar et al. (2009) de películas de WPI

con sorbato de potasio como conservador se encontraron valores de humedad de películas del 19 %. La diferencia entre este valor y los hallados en este estudio, de 31,7 %, podría también fundamentar la migración de humedad de las tapas hacia las películas, teniendo en cuenta además que la relación en peso de tapa de empanada con la película comestible es de 33:3. Una pequeña diferencia de humedad en la tapa se transforma en una mayor diferencia en la película.

### Evaluación sensorial

Atributo	Muestra	Tiempo (meses)				
		0	1	2	3	4
Sabor	A	5.8 ab	5.8 ab	5.7 ab	5.4 ab	5.6 ab
	B	6.1 ab	5.7 ab	6.0 ab	6.6 b	4.8 a
	C	6.4 b	6.4 b	6.6 b	5.5 ab	6.7 b
Textura	A	5.4 abc	4.8 ab	5.4 abc	5.3 abc	4.7 a
	B	5.6 abc	5.9 abc	5.8 abc	6.5 c	4.8 ab
	C	5.6 abc	5.9 abc	6.2 bc	5.5 abc	6.4 c
Color	A	6.5 ab	6.4 ab	6.3 ab	6.4 ab	6.2 ab
	B	6.8 b	6.9 b	6.9 b	6.9 b	6.2 ab
	C	5.4 a	5.9 ab	5.9 ab	6.4 ab	6.5 ab
Agrado general	A	5.6 ab	5.4 ab	5.4 ab	5.5 ab	5.3 ab
	B	5.9 ab	5.8 ab	5.9 ab	6.7 b	5.0 a
	C	6.0 ab	6.6 ab	6.2 ab	5.3 ab	6.6 b

Tabla 3. Resultados de análisis sensorial con panel de consumidores, evaluando sabor, textura, color y agrado general. Escala utilizada del 1 al 9. Medias con letras iguales no representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 3 se presentan los resultados de evaluación sensorial con el tiempo. Se observa que en todos los casos de estudio los valores son menores que 7, atribuible a que las tapas son horneadas y se consumen sin relleno, lo cual no lo hace tan atractivo al consumidor.

Se constata que las muestras de tapas de empanadas sin sorbato de potasio con película como separador (muestras A) tuvieron como único atributo variable a lo largo del tiempo la textura, con el puntaje más bajo a los cuatro meses, el cual disminuyó ligeramente de 5.4 a 4.7.

Las tapas de empanadas envasadas de la forma tradicional (muestras C) mantuvieron los valores de los atributos estables durante los cuatro meses de estudio y presentaron en todos los atributos estudiados el mayor valor en el tiempo 4.

En sabor y textura las tres muestras estudiadas no presentaron diferencias significativas hasta los tres meses. La muestra B presentó el menor valor de sabor en el cuarto mes, mientras que en textura el menor valor lo tuvo la muestra A.

Las muestras A y B obtuvieron mayor puntuación en el atributo color que la muestra C hasta los dos meses del estudio. Esto puede deberse a que en el caso de las muestras en contacto con películas comestibles se haya dado una migración de proteínas de suero a las tapas, lo cual pudo conferir un color más brillante.

De la evaluación que realizaron los jueces acerca de las tapas sin hornear, todos constataron que las tapas de las muestras A y C tenían un color y olor característico, mientras que solamente un juez halló en la muestra B un color amarillento en la masa. En cuanto al olor, solo dos jueces consignaron una diferencia en las tapas de las muestras A y los demás lo consideraron característico. En relación a la dificultad de separar las tapas de empanadas de los separadores, todos los jueces evaluaron fáciles de separar a las muestras B y un juez vio dificultad en la separación de la muestra A. Respecto a las muestras

con separadores de polietileno, cinco de los siete jueces encontraron dificultad en la separación.

## Recuento de hongos y levaduras

En la Tabla 4 se expresan los valores microbiológicos estudiados, donde se observa que no hubo variación del recuento de hongos y levaduras durante los cuatro meses de estudio.

Muestra		Tiempo (meses)				
		0	1	2	3	4
A	A1	<10 (-)	20 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
	A2	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
	A3	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
B	B1	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
	B2	<10 (-)	<10 (-)	20	<10 (-)	<10 (-)
	B3	2100 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
C	C1	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
	C2	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)
	C3	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)	<10 (-)

Tabla 4. Valores de recuento de hongos y levaduras en UFC/g. Se muestran los triplicados de cada tipo de muestra.

(-): Límite de detección de la técnica.

(-): El recuento corresponde a UFC de levaduras. No se detectaron hongos filamentosos.

## Conclusiones

El estudio fue diseñado inicialmente hasta los cuatro meses de almacenamiento a 4 °C para superar el tiempo de vida útil que manejaba la empresa, de dos meses. Sin embargo, no se observó un deterioro del producto que permita afirmar que la vida útil hubiera concluido.

Ninguna de las muestras presentó deterioro microbiológico ni sensorial en los cuatro meses estudiados y los atributos presentaron ninguna o ligera diferencia en el tiempo de estudio. Entre muestras las diferencias fueron ligeras; las mejores puntuaciones las tuvieron en color las muestras A y B, en sabor, la muestra C, y en textura y agrado general, las B y C. La utilización de películas realizadas por compresión como método de elaboración permitió que las películas no se solubilizaran en todo el tiempo de estudio debido a los bajos valores de solubilidad presentados. Las películas comestibles tienen un interesante potencial para esta aplicación, aunque se debe trabajar en enmascarar el flavor del suero.

## Referencias

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*. Capítulo 20, 4ta ed. Washington: APHA, 2001.
- BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. En: *International Food Research Journal*. 2008, 15(3).
- DARABA, A. Future trends in packing: edible, biodegradable coats and films. En: *Journal of Environmental Protection and Ecology*. 2008, 9(32):654-664.
- DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; y DUTTA,

- J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. En: *Food Chemistry*. 2009, 114:1173-1182.
- ESCOBAR, D.; MÁRQUEZ, R.; REPISO, L.; SALA, A.; SILVERA, C. Elaboración, caracterización y comparación de películas comestibles en base a aislado de proteínas de suero lácteo (WPI). En: *INNOTEC*. 2008, 3:57-62.
- ESCOBAR, D.; MÁRQUEZ, R.; REPISO, L.; SALA, A.; SILVERA, C. Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. En: *INNOTEC*. 2009, 4:33-36.
- GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite \_ lms of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. En: *International Journal of Food Science and Technology*. 1994, (29):39-50.
- KRISTO, E.; KOUTSOUMAINS, K.P.; BILIADERIS, C.G. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. En: *Food Hydrocolloids*. 2008, 22(3):373-386.
- LUNGU, B.; JOHNSON, M.G. Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4°C. En: *Journal of Food Protection*. 2005, 68:855-859.
- McCORMICK, K.E.; HAN, I.Y.; SHELDON, B.W.; DAWSON, P.L. In-package pasteurization combined with biocideimpregnated films to inhibit *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in turkey bologna. En: *Journal of Food Science*. 2005, 70:53-57.

# Estudio de la composición fisicoquímica de harina de semillas de zapallo como ingrediente alimentario

## Study of the physicochemical composition of pumpkin seeds flour as a food ingredient

Escobar Gianni, Daniela Verónica <sup>(1)</sup>, Curutchet, Ana <sup>(2)</sup>, Zirbesegger, Heinz <sup>(3)</sup>, Márquez Romero, Rosa <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Gerencia de Proyectos Alimentarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay - <sup>(2)</sup>Gerencia de Análisis y Ensayos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay - <sup>(3)</sup>Empresa Uru – Kürbis, Uruguay

Contacto: [descobar@latu.org.uy](mailto:descobar@latu.org.uy)

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 13/12/2012

### Resumen

La harina proveniente de la torta del prensado en la elaboración del aceite virgen de semilla de zapallo *Cucurbita pepo* var. *styriaca*, presenta características que la hacen interesante para su utilización en panificados y pastas, por su color verde característico, sabor intenso y valor nutricional. Para caracterizar este nuevo producto según su composición se realizaron elaboraciones de harina con semillas cultivadas en Uruguay y en Europa. Se determinaron humedad, materia grasa, proteínas, cenizas, fibras, sodio, vitamina B1, vitamina E, perfil de ácidos grasos, esteroides, aminoácidos y carbohidratos totales. Se estudió la estabilidad fisicoquímica y microbiológica durante 12 meses con la harina envasada en trilaminado de polietileno y poliéster aluminizado, almacenado en condiciones ambientales. La harina caracterizada es un producto proteínico vegetal (48,3 % proteína) y una importante fuente de fibras (11 % fibra). Tiene un 21,7 % de lípidos, del cual el 38 % son Ácidos grasos monoinsaturados AGM y el 53,4 % Ácidos grasos poliinsaturados AGP, destacándose el ácido oleico y el linoleico que lo hacen deseable desde el punto de vista nutricional y culinario. Presenta 3,7 mg de vitamina E cada 100 g y 2967 mg/kg de esteroides. En la harina proveniente de la torta de prensado como subproducto del aceite virgen de la semilla de zapallo la acidez y la humedad se mantienen estables, mientras que la carga de hongos y levaduras disminuye a lo largo de 12 meses en el envase utilizado en este estudio, de trilaminado de polietileno, poliéster y aluminizado almacenado en condiciones ambientales.

Palabras clave: Harina, zapallo, panificados, pastas, celíacos.

### Abstract

The flour from the presscake in the production of *Cucurbita pepo* var. *styriaca* seed virgin oil has features that make it interesting for use in baked goods and pasta production because of its characteristic green color, intense flavor and nutritional benefits. To determine the nutritional composition of this new product, elaborations of flour were made with seeds from Uruguay and Europe. They were analyzed for moisture, fat content, protein, ash, fiber, sodium, vitamin B1, vitamin E, fatty acid profile, sterols, amino acids and total carbohydrates. Physicochemical and microbiological stability have been studied for 12 months at ambient conditions with the flour packaged with a polyethylene, polyester and aluminum tri-laminate. The flour is characterized as a vegetable protein product (48,3 %) and as an important source of fiber (11 %). It has 21,7 % of lipids of which 38 % are MUFA and 53,4 % are PUFA, highlighting the oleic and linoleic acid contents what makes it desirable from nutritional and culinary standpoints. It features 3,7 mg of vitamin E per 100 g and 2967 mg / kg of sterols. In flour from the presscake in the production of pumpkin seed virgin oil acidity and moisture remains stable, while the fungi and yeasts number decrease during 12 months in ambient conditions used in this study, with trilaminate polyethylene aluminized polyester.

Keywords: Flour, pumpkin, baked goods, pasta, celiac.

## Introducción

*Cucurbita pepo* var. *styriaca* es una variedad de zapallo que se cultiva en Austria, Hungría, China, México y Nueva Zelanda. Posee una película exterior delicada en vez de una cáscara dura, lo que la hace atractiva tanto para su consumo como para el prensado directo para extraer el aceite.

En nuestro país es cultivada en distintas regiones (Montevideo, Canelones, Tacuarembó).

Hoy en día el cultivo de esta variedad del zapallo en Uruguay se destina a la producción de aceite virgen a partir de la semilla y a la

venta de la semilla de zapallo tostada.

Como subproducto de la elaboración del aceite virgen de la semilla de zapallo *Cucurbita pepo* var. *styriaca* se obtiene la torta de prensado, con la harina como resultado de su molienda. En estudios realizados en aceite proveniente de cultivares de semilla de zapallo se encontró que dicho aceite es rico en vitamina E y esteroides vegetales, y que los ácidos grasos presentes en cantidad mayoritaria son el linoleico, oleico, palmítico y esteárico (Nyam et al., 2009; Stevenson et al., 2007). En torta de prensado de semilla de zapallo, Zdunczyk et al. (1999) reportaron valores de 59,8 % de proteínas y al ácido oleico y linoleico como ácidos grasos encontrados en mayor proporción. Debido a su origen vegetal, al alto contenido de proteínas vegetales y

la ausencia de contaminantes químicos, es atractiva para su uso en el área alimentaria.

En los países que actualmente producen este tipo de aceite el uso de la torta de prensado se aplica mayormente a la fabricación de raciones de animales (Vaštag et al., 2011).

La utilización de la harina proveniente de la torta de prensado como ingrediente en alimentos podría ser sin duda una innovación en la industria alimentaria local e internacional.

Aunque no existen antecedentes de la sustitución de harina de trigo por harina de torta de prensado de *Cucurbita pepo var. styriaca*, se encontraron estudios de sustitución de derivados de zapallo o de su semilla en productos panificados. El-Soukkary et al. (2001) sustituyeron la harina de trigo en un 21 % por concentrado de proteína de semilla de zapallo en panes. Rakcejeva et al. (2011), por su parte, sustituyeron entre un 10 y un 25 % de la harina de trigo por harina de zapallo en panes.

Rienet S.A. es una pequeña empresa agroindustrial de Uruguay que actualmente produce y comercializa el aceite virgen de la semilla de zapallo *Cucurbita pepo var. styriaca* y la semilla de zapallo tostada con marca de "Uru-kürbis". La empresa produce diversos productos y ha elaborado panes y pastas artesanalmente, sustituyendo hasta un 30 % de la harina de trigo por la harina generada de la molienda de la torta de prensado del aceite, tal como se muestra en las Figuras 1 y 2. Si bien han sido degustados con éxito en varias oportunidades, no son comercializados actualmente.

Por todo esto podría ser interesante su utilización como ingrediente alimentario, con un uso potencial en pastas y productos panificados que le conferiría a éstos el carácter de productos enriquecidos en proteínas. Según el Codex Alimentarius, para que un producto pueda ser comercializado como "producto proteínico vegetal" tiene que ser definido como producto alimentario obtenido de materias primas vegetales mediante la reducción o eliminación de algunos de los principales constituyentes no proteínicos (agua, aceite, almidón, otros carbohidratos), de manera que se obtenga un concentrado de proteínas del 40 % en base seca, o más.

Considerando el potencial que podría ofrecer esta harina como ingrediente, este trabajo pretende determinar la composición de la harina elaborada a partir de la molienda de la torta de prensado (subproducto de la producción del aceite virgen de semilla de zapallo), a los efectos de que pueda ser utilizada como ingrediente y determinar si puede cumplir los estándares para la futura categorización como "producto proteínico vegetal". Para todo esto se analizó la composición de la harina, sus fitoesteroles, el perfil de ácidos grasos, el contenido de sodio, vitaminas y aminoácidos en muestras provenientes de seis regiones de cultivo de semilla de zapallo y se estudió su estabilidad durante un año.

## Materiales y Métodos

### Estudio de la composición fisicoquímica de la harina

Para el estudio de la composición la empresa "Uru-kürbis" proporcionó el producto obtenido de la molienda de la torta de prensado del aceite, partiendo de seis muestras de distintas producciones de la harina. Se realizaron cuatro elaboraciones con semillas provenientes de cultivos de distintas regiones de Uruguay y las otras dos con semillas de Austria y Hungría.

Las semillas utilizadas fueron de *Cucurbita pepo var. styriaca*, la misma variedad tanto en Uruguay como en los dos países europeos, y por cada elaboración realizada se obtuvieron 50 kg de harina.

Se realizó prueba t de student a un 95 % de confianza entre las muestras de la harina proveniente de las semillas producidas en Uruguay y de la harina con las semillas importadas de Austria y Hungría, para ver si existían diferencias significativas por la diferencia geográfica de las mismas.

A cada una de las muestras se les realizaron los siguientes ensayos según los métodos citados:

- Humedad: método gravimétrico, secado a 70 °C en estufa a vacío hasta peso constante, basado en "Pearson's Composition and Analysis of Foods".
- Materia grasa: extracción con éter de petróleo Método Soxtec, Foss-Tecator.
- Proteínas: método de Kjeldahl, basado en manual FOSS, método Application Note AN 3001.
- Cenizas: método gravimétrico, por incineración en mufla, norma UNIT 548-82.
- Fibra alimentaria total: por método enzimático gravimétrico según AOAC 2007, método 985.29.
- Sodio: Espectrometría de Absorción Atómica por FAAS (llama aire-acetileno), según Método AOAC 973.54 adaptado, en muestra digerida según ISO 15587-2, Anexo C, adaptada.
- Vitamina B1: método de Sims y Shoemaker. AOAC Vol 76, N° 5, 1993.
- Vitamina E (Alfa tocoferol): según norma BS EN 12822, que consta en una saponificación y posterior extracción con solvente orgánico. La capa orgánica se inyectó directamente en HPLC luego de filtrar por 0,22 micras. La separación cromatográfica se hizo en fase normal (Phenomenex Silica) usando un detector de fluorescencia a 290-330 nm.



Figuras 1 y 2. Pastas y panes elaborados por la empresa "Uru-Kurbis" con harina de la torta de prensado de la semilla del zapallo (*Cucurbita pepo var. styriaca*).

- Perfil de ácidos grasos: realizado por cromatografía gaseosa - espectrometría de masa siguiendo método oficial de AOCS Ce 2-66, AOCS Ce 1-62 y AOCS Ce 1-91.
- Composición y contenido de esteroides: basado en norma IRAM 5660.
- Aminoácidos: Análisis basado en AOAC 982.30.
- Carbohidratos Totales: por cálculo: 100 - (Humedad + Cenizas + Materia Grasa + Proteínas + Fibra Alimentaria Total).
- Valor energético: según el cálculo: 4 x (Carbohidratos Totales + Proteínas) + 9 x (Materia Grasa).

### Estudio de estabilidad en el tiempo

Se estudió la estabilidad, fisicoquímica y microbiológica durante 12 meses con la harina envasada en trillaminado de polietileno, poliéster y aluminio, almacenado en condiciones ambientales (20 °C). Debido a que la torta utilizada para obtener la harina es producto de un primer prensado y presenta cantidades importantes de aceite, se considera necesario medir la estabilidad del producto según la acidez, índice de peróxidos.

Los métodos y las frecuencias de los análisis fueron:

- Humedad: por método gravimétrico, secado a 70 °C en estufa a vacío hasta peso constante basado en "Pearson's Composition and Analysis of Foods". Este análisis se realizó a tiempo cero y una vez por mes.
- Índice de Peróxidos: Determinación sobre la materia grasa extraída. Método basado en la norma UNIT 642-82. Se determinó a tiempo cero y una vez por mes.
- Acidez: La materia grasa fue extraída con éter de petróleo utilizando soxtec y se disolvió en una solución de tolueno alcohol fenolftaleína, la cual es titulada con NaOH 0.02 N (basado en la norma AACC 0201). Este análisis se realizó a tiempo cero y una vez por mes.
- Recuento de hongos y levaduras: según APHA, "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of

Foods". Se analizó a tiempo cero y luego cada cuatro meses.

## Resultados y Discusión

### Composición fisicoquímica de la harina

Se presentan en las Tablas 1 a 4 los resultados del estudio de composición fisicoquímica de la harina. Los valores detallados corresponden a los valores medios obtenidos con sus desviaciones estándar (DS).

La Tabla 1 especifica los valores de composición nutricional y de las vitaminas B1 y E en las muestras de harina de zapallo analizadas.

La harina producto de la molienda de la torta de prensado es una excelente fuente de proteínas y puede ser clasificada como "producto proteínico vegetal", dado que presenta en promedio un 48,3 % de proteína en base seca. Entre las harinas provenientes de la producción de aceites, hoy en día solo son utilizadas para consumo humano la de harina de soja desgrasada y la de harina de copra, cuyos porcentajes de proteínas promedio son del 43 % para la soja y 22 % para la copra (Centro de Comercio Internacional), valores superados por el nivel de proteínas en la harina de semillas de zapallo.

Presenta un aporte de fibra de 10,8 g / 100 g de harina. Según el Codex Alimentarius, es un alimento de alto contenido de fibra dietética si tiene más de 6 g por 100 g de alimento. El valor obtenido es similar al de harina de copra (12 %) y supera al de harina de soja (entre 6,5 y 7,0 g / 100 g), según el Centro de Comercio Internacional. La recomendación actual de consumo para la población en general es de 8 a 10 g de fibra / 1000 kcal consumidas, de acuerdo al Manual para la Promoción de Prácticas Saludables de Alimentación en la Población Uruguaya.

La vitamina E, de interés por su capacidad antioxidante, se encontró en niveles de 3,4 mg / 100 g en promedio. Esta vitamina es esencial para el organismo, ya que es un antioxidante que evita la destrucción normal de glóbulos rojos, evita trastornos oculares, anemias y ataques cardíacos. Su dosis diaria recomendada es de 15 mg para adultos y 6 mg para niños (NAP).

	Harina de Uruguay		Harina europea (Austria y Hungría)		TOTAL	
	Valor medio	Desviación standard DS	Valor medio	DS	Valor medio	Desviación standard DS
Humedad (g/100g)	2,5	0,2	2,6	1,2	2,5	0,6
Cenizas (g/100g)	8,1	0,3	8,5	0,6	8,2	0,4
Proteínas (g/100g)	49,1	3,8	46,8	0,1	48,3	3,2
Materia grasa (g/100g)	21,7	2,7	25,1	2,3	22,8	2,9
Fibra alimentaria total (g/100g)	10,6	1,2	11,3	0,1	10,8	1,0
Carbohidratos totales (g/100g)	8	3	6	1	7	2
Valor energético (Kcal/100g)	425	18	436	15	429	17
Sodio (g/100g)	1,1	0,4	0,73	0,01	1,0	0,3
Alfa tocoferol (mg/100g)	3,7	1,3	2,8	0,5	3,4	1,2
Tiamina (mg/kg)	0,9	0,2	1,3	0,2	1,0	0,2

Tabla 1. Composición nutricional y valores de vitaminas E y B1 en la harina proveniente de las tortas de prensado de semillas de los distintos orígenes (Uruguay, y Austria y Hungría, según se indica en fila superior de la tabla).

No existe diferencia significativa al 95 % de confianza entre las harinas de las semillas elaboradas con semillas de Uruguay y con semillas importadas de Europa.

	Harina de Uruguay		Harina europea (Austria y Hungría)		TOTAL	
	Valor medio	DS	Valor medio	DS	Valor medio	DS
Grasa total (g/100g)	21,7	2,7	25,1	2,3	22,8	2,9
AGS (g/100g)	3,3	0,3	4,4	1,4	3,7	0,9
AGMI (g/100g)	6,9	2,2	10,3	3,5	8,0	2,9
AGPI (g/100g)	11,5	1,3	10,4	0,3	11,1	1,2
Grasa trans (g/100g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AGI / AGS	5,7	1,1	5,1	2,5	5,5	1,4
AGPI / AGS	3,5	0,7	2,5	0,9	3,2	0,8

Tabla 2. Tipos de grasas y relaciones en la harina proveniente de las tortas de prensado de semillas de los distintos orígenes (Uruguay, y Austria y Hungría, según se indica en fila superior de la tabla).

ND: no detectable.

AGS: Ácidos grasos saturados

AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados

AGI: Ácidos grasos insaturados = AGMI + AGPI

No existe diferencia significativa al 95 % de confianza entre las harinas de las semillas elaboradas con semillas de Uruguay y con semillas importadas de Europa.

La vitamina B1, cuya dosis diaria recomendada es de 0,6 mg en niños y 1,2 mg en adultos (WHO/FAO 2002), presenta un nivel promedio en las muestras estudiadas de 1,0 mg/Kg de harina.

La Tabla 2 muestra las cantidades de los distintos tipos de grasa encontrados y sus relaciones más interesantes. La materia grasa total es de 22,8 % en promedio. Este valor elevado era esperable porque la harina es el subproducto principal de la producción de aceite virgen de un solo prensado. Comparado con los niveles en las harinas de soja y de copra es mucho mayor (0,5 y 6,0 % para soja y copra, respectivamente, de acuerdo al Centro de Comercio Internacional).

La harina presentó una mayor proporción de AGI que de AGS (relación 5,5 en promedio total). La mayor ingesta de AGI favorece la disminución de colesterol, precursor de enfermedades cardiovasculares. También se encontró una relación favorable de AGPI/AGS (3,2 en promedio total), que se recomienda sea mayor a 1.

		Harina de Uruguay		Harina europea (Austria y Hungría)		TOTAL	
		Valor medio	DS	Valor medio	DS	Valor medio	DS
C 16:0	Palmitico	10,4	1,5	11,7	4,7	10,8	2,5
C 18:0	Esteárico	4,4	0,7	5,5	2,2	4,7	1,3
C 18:1 cis	Oleico	31,1	7,3	40,1	10	34,1	8,6
C 18:2 cis	Linoleico	53,1	6,5	41,1	2,1	49,1	8,0

Tabla 3. Principales ácidos grasos (% masa) encontrados en la harina proveniente de las tortas de prensado de semillas de los distintos orígenes (Uruguay, y Austria y Hungría, según se indica en fila superior de la tabla).

No existe diferencia significativa al 95 % de confianza entre las harinas de las semillas elaboradas con semillas de Uruguay y con semillas importadas de Europa. En el ácido linoleico se encontró diferencia significativa al 10 % con p-valor de 0.727.

Como se ve en la Tabla 3, el ácido graso principal encontrado en la composición lipídica de la harina fue el linoleico (C 18:2 cis), con el 49,1 %, seguido por el oleico, con el 34,1 %, y luego el palmitico, con el 10,8 %.

Se halló una diferencia (al 90 % de confianza) en los perfiles estudiados en las semillas provenientes de Uruguay que presentaron mayor porcentaje de ácido linoleico (53,1 % en promedio) que las provenientes de Europa (41,1 % en promedio). En estudios realizados por Applequist et al. (2006) del perfil de ácidos grasos en semillas de *Cucurbita pepo* de distintas especies, el ácido linoleico fue el que se presentó en mayor proporción, con valores que variaron entre 40,4 y 57,2 %. El mismo autor reporta en segundo lugar al oleico, con valores entre 21,0 y 37,2 %, y en tercer lugar al palmitico, con valores entre 11,7 y 15,6 %.

Desde el punto de vista nutricional, los aportes de ácido linoleico, ácido graso esencial y de ácido oleico son beneficiosos dados los aspectos favorables que representan para la salud humana. Además, el ácido oleico beneficia la disminución de la oxidación del colesterol-LDL y mejora la palatabilidad del producto final.

El ácido palmitico desde el punto de vista tecnológico es favorable para la plasticidad y estabilidad en productos finales.

Respecto al contenido de esteroides, se encontraron en niveles promedio de 2967 mg / kg de harina de las muestras estudiadas. El esteroide encontrado en mayor proporción en todas las muestras (57,7 g / kg de harina promedio) no pudo ser identificado, y presenta un tiempo de retención que coincide con el del  $\beta$ -sitosterol. Le siguen en proporciones variables el D7,25-estigmastadienol y el D7-avenasterol, completando entre estos tres esteroides el 91 % de los esteroides totales. La presencia de esteroides en la dieta es de interés para la prevención de enfermedades cardiovasculares.

Aminoácidos (mg/g proteínas)	Requerimiento WHO/FAO/ONU para niños de 3 a 10 años	Requerimiento WHO/FAO/ONU para adultos	Harina de semilla de zapallo (valores promedio obtenidos)
Histidina	16	15	27,8
Isoleucina	31	20	48,5
Lisina	48	30	33,9
Leucina	61	39	66,6
Metionina + Cisteína	24	15	23
Fenilalanina + Tirosina	41	25	91,9
Treonina	25	15	31,6
Triptofano	6,6	4	7,7
Valina	40	26	48,3

Tabla 4. Comparación de necesidades de aminoácidos esenciales en diferentes grupos etáreos con su cantidad en la harina de zapallo.

La harina proveniente de la semilla de zapallo contiene todos los aminoácidos esenciales, tal como lo muestra la Tabla 4, y estos son el 45 % de los aminoácidos totales encontrados. De acuerdo a los requerimientos diarios que recomiendan WHO/FAO/ONU (2007), presentan interés para la población infantil todos los aminoácidos esenciales excepto la lisina, metionina y cisteína, que se encuentran por debajo de las necesidades establecidas para dicha población. Para la población de adultos son de interés los niveles de todos los aminoácidos esenciales presentes en la harina de zapallo.

### Estabilidad en el tiempo

En la Tabla 5 se expresan los resultados de los parámetros analizados en los 12 meses del estudio.

Tiempo (meses)	Humedad (g/100g)	Acidez (g oleico/100 g materia grasa)	Índice de peróxidos (meq. peróx/kg materia grasa)	Recuento de hongos y levaduras (UFC/g)
0	3,7	0,70	6 (Rango = 1)	1700
1	3,3	0,80	-	-
2	3,2	0,60	9 (Rango = 2)	-
3	3,6	0,63	12 (Rango = 3)	-
4	3,8	0,48	7 (Rango = 3)	250
5	2,9	0,53	9 (Rango = 1)	-
6	2,5	0,83	9 (Rango = 1)	-
7	2,4	0,61	9	-
8	2,6	0,52	8 (Rango = 2)	160
9	2,7	0,55	10	-
10	2,5	0,58	8	-
11	2,6	0,54	9	-
12	3,1	0,80	12 (Rango = 4)	55

Tabla 5. Resultados de los análisis realizados a lo largo del estudio de estabilidad.

De los estudios fisicoquímicos se observa que la humedad de la harina que inicialmente es de 3,7 % presenta valores menores a 3,1 % entre los 5 y 12 meses, mientras que la acidez se mantiene estable durante el tiempo de estudio. Desde el punto de vista microbiológico se produce una disminución con el tiempo del recuento de hongos y levaduras.

## Conclusiones

La harina presenta un porcentaje de proteína del 48,3 g /100 g en base seca, lo que permite que pueda ser comercializada como "producto proteínico vegetal" según Codex Alimentarius, que establece que se deberá presentar por lo menos un 40 % de proteína en base seca. Es fuente de fibra, con 10,8 g /100 g, así como de vitamina E, con 3,4 mg /100 g de harina, además de contener aminoácidos esenciales.

Adicionalmente, tiene ventajas en su composición nutricional, ya que presenta una relación de grasas insaturadas/saturadas de 5,5 y su ácido graso principal es el ácido linoleico cis (49,1 %), el cual se considera esencial para el crecimiento.

La harina proveniente de la torta de prensado como subproducto del aceite virgen de la semilla de zapallo mantiene estables la acidez y humedad, mientras que la carga de hongos y levaduras disminuye a lo largo de 12 meses, en el envase utilizado en este estudio, de trilaminado de polietileno, poliéster y aluminizado almacenado en condiciones ambientales.

Con este trabajo se tiene una base de información para una próxima caracterización de producto que pueda permitir su introducción en forma comercial. Por otra parte, se entienden convenientes los estudios a futuro de la incorporación de la harina como ingrediente en productos panificados y de aceptación de los productos por parte de los consumidores.

## Reconocimientos

LATU: Departamento de Desarrollo de Métodos Analíticos, Departamento de Productos Lácteos, Cárnicos, Hortifrutícolas y de la Colmena, Departamento de Cereales, Oleaginosos y productos derivados, Centro de Información Técnica.

## Referencias

- AACC INTERNATIONAL. *Approved methods of analysis*. 10a ed. St. Paul: AACC International, 2000. Method 02-01 A.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Ce 1-62.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 4a ed., reapproved 1993. Urbana: AOCS, 1995. Official Method Ce 1-91.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Ce 2-66.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4a ed. Washington: APHA, 2001. Capítulo 20.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18a ed., 2da. rev. Gaithersburg: AOAC, 2007. Official Method 973.54.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18a ed., 2da. rev. Gaithersburg: AOAC, 2007. Official Method 982.30.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18a ed., 2da. rev. Gaithersburg: AOAC, 2007. Official Method 985.26.
- APPLEQUIST, W.; AVULA, B.; SCHANEBER, B.T.; WANG, Y.; KHAN, I.A. Comparative fatty acid content of seeds of four Cucurbita species grown in a common (shared) garden. En: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19:606-611.

- BRITISH STANDARD INSTITUTION (Inglaterra). BS EN 12822: *Foodstuffs. Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography. Measurement of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ - tocopherols*. Londres: BSI, 2000.
- CENTRO DE COMERCIO INTERNACIONAL. *Tortas de aceite y harinas oleaginosas : los desafíos del mercado para los países en desarrollo*. Ginebra: CCI, 2000.
- EL-SOUKKARY, F.A. Evaluation of pumpkin seed products for bread fortification. En: *Plant Foods for Human Nutrition* 2001, 56(4):365-384
- FAO; OMS. *Comisión del Codex Alimentarius: Directrices generales del Codex para la utilización de productos proteínicos vegetales (PPV) en los alimentos. CAC/GL 4-1989*. Roma: FAO, 1996.
- FAO; OMS. *Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation*. Roma: FAO, 2002.
- FAO; WHO; UNU. *Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation*. Ginebra: OMS, 2002 (WHO technical report series; 935).
- INSTITUTO ARGENTINO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (Argentina). IRAM 5660: *Aceites comestibles e industriales. Método de análisis de la fracción de esteroides extraída de la materia insaponificable por cromatografía en fase gaseosa*. Buenos Aires: IRAM, 1981.
- INSTITUTO URUGUAYO DE NORMAS TÉCNICAS (Uruguay). UNIT 548: *Productos para alimentación animal. Determinación del contenido de cenizas. Método de referencia*. Montevideo: UNIT, 1982.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (Suiza). ISO 15587-2: *Water quality. Digestion for the determination of selected elements in water. Part 2: Nitric acid digestion*. Ginebra: ISO, 2002.
- KIRK, R.S.; SAWYER, R. *Pearson's composition and analysis of foods*. 9a ed. Nueva York: Longman, 1991.
- NYAM, K.L.; TAN, C.P.; LAI, O.M.; LONG, K.; CHE MAN, Y.B. Physicochemical properties and bioactive compounds of selected seed oils. En: *Food Science and Technology*. 2009, 42(8):1396-1403.
- RAKCEJEVA, T.; GALO BURDA, R.; CUDE, L.; STRAUTNIECE, E. Use of dried pumpkins in wheat bread production. En: *Procedia Food Science* 2011, 1:441-447.
- SIMS, A.; SHOEMAKER, D. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiamine and riboflavin in selected foods. En: *Journal of AOAC International*. 1993, 76(5):1156-1160.
- STEVENSON, D.; ELLER, F.; WANG, L.; JANE, J.; WANG, T.; INGLETT, G. Oil and tocopherol content and composition of pumpkin seed oil in 12 cultivars. En: *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55:4005-4013.
- URUGUAY. MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. *Manual para la promoción de prácticas saludables de alimentación en la población uruguaya*. Montevideo: MSP. Dirección general de la salud. Programa Nacional de Nutrición, 2005.
- VAŠTAG, Z.; POPOVIC, L.; POPOVIC, S.; KRIMER, V.; PERICIN, D. Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. En: *Food Chemistry*. 2011, 124:1316-1321.
- ZDUNCZYK, D.; MINAKOWSKI, S.; FREJNAGEL, S. *Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean and casein*. En: *Food / Nahrung* 1999, 43(6):392-395. 1974, 22:796-800.

# Evolución de la calidad de frutos de butiá (*Butia capitata*, Mart. Becc.) en almacenamiento refrigerado

## Quality evolution of butiá fruits (*Butia capitata*, Mart. Becc.) in refrigerated storage

Zaccari, Fernanda <sup>(1)</sup>, Crosa, María José <sup>(2)</sup>, Irisity, Mariana <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Grupo Poscosecha de Frutas y Hortalizas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(2)</sup> Gerencia de Proyectos Alimentarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - <sup>(3)</sup> Departamento de Gestión y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Local, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay.

Contacto: fzaccari@fagro.edu.uy

Recibido: 12/6/2012 - Aprobado: 26/9/2012

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la evolución de la calidad de frutos de butiá, cuantificar e identificar las principales causas de su deterioro, y caracterizarlos física y químicamente conservados a 5, 15 y 20 °C durante 0, 7, 21 y 28 días. A la semana de almacenamiento el 47 %, 24 % y 22 % del peso de frutos no presentaba defectos visibles a 5, 15 y 20 °C, respectivamente. A los 21 días a 15 y 20 °C se observó pudriciones y manchas en todos los frutos. A mayor temperatura y tiempo de conservación aumentó el tono del color de la pulpa (76,7 a 80,5 °hue). En cáscara no se encontró efecto de temperatura ni del tiempo de almacenamiento en el contenido de materia seca (MS, 21,1 %) y trans-β-caroteno (1,96 mg/100 g fresco). En la pulpa el contenido de trans-β-carotenos/100 g aumentó de 1,06 a 1,15 mg. Los sólidos solubles totales (SST) y la acidez titulable (AT) del jugo disminuyeron con el tiempo de conservación: 14,8 a 10,1 °Brix y 1,60 a 1,37 % ácido cítrico, respectivamente. En las condiciones de este estudio se concluye que el butiá almacenado a 5 °C durante 7 días mantiene un 47 % de los frutos sin defectos y con aptitud para su consumo in natura o industrializado.

Palabras clave: *Butia capitata*, fruto nativo, poscosecha.

### Abstract

The aim of this study was to quantify and identify the main causes of butia fruits deterioration and to characterize physical and chemically composition changes during their storage at 5, 15 and 20 °C for 0, 7, 21 and 28 days. After a storage week 47 %, 24 % and 22 % of fruits (by weight) did not show visible defects at 5, 15 and 20 °C, respectively. After 21 days, all the fruits were rotted and stained when stored at temperatures of 15 and 20 °C. The higher temperature and storage time increased the pulp color tone of the fruits (76,7 to 80,5 ° hue). The effects of skin temperature or time storage were null both on dry matter (DM, 21,1%) or trans-β-carotene (1,96 mg/100 g fresh) fruit contents. The trans-β-carotene/100 g content in pulp increased from 1,06 to 1,15 mg. Soluble solids (SST) and titratable acidity of juice decreased during storage time from 14,8 to 10,1 °Brix and 1,60 to 1,37 (% citric acid), respectively. Under study conditions it is concluded that 47 % of butia fruits remained without defects for consumption in natura or processed when stored for 7 days at 5 °C.

Keywords: *Butia capitata*, native fruit, postharvest.

## Introducción

Las palmas de *Butia capitata* (Mart.) Becc. son parte de la Reserva de Biosfera Bañados del Este Programa MAB, 1976 (Rivas y Barilani, 2004). Estas palmas forman un ecosistema particular con alto valor paisajístico, cultural y socio económico, y sus riesgos y amenaza de extinción han sido ampliamente reportados (Báez y Jaurena, 2000; Rivas y Barilani, 2004). Las palmas tienen más de 300 años y están ubicadas dentro de sistemas de producción ganadero y agrícola (arroz y soja), en los cuales se hace muy difícil su reposición natural (Báez y Jaurena, 2000; Rivas, 2001). Se han realizado varios estudios, trabajos de investigación y de capacitación para frenar la pérdida del palmar y a la vez promover su regeneración y la elaboración de nuevos productos (Rivas 2001; Crosa, 2011).

Los frutos de butiá son consumidos *in natura* e industrializados artesanalmente por los habitantes de la región (Betancurt et al., 2008; Crosa et al., 2011; Burzaco et al., 2011). En las condiciones tradicionales de cosecha, almacenamiento y procesamiento se ha constatado una pérdida muy rápida de la calidad de los frutos que aún no ha sido cuantificada. Una propuesta conducente a preservar las palmas y la biodiversidad de su ecosistema es encontrar sistemas de explotación racional en los cuales esté incluido un procedimiento de colecta y de almacenamiento de los frutos *in natura* o con algún grado de elaboración.

Estos frutos silvestres tienen propiedades de interés nutricional, funcional y medicinal atribuida a compuestos antioxidantes, como polifenoles, Vitamina C, Vitamina A y fibra alimentaria (Schwartz et al., 2007; Faria et al., 2008, Crosa et al., 2011). La técnica utilizada en la cosecha y en poscosecha de los frutos son factores determinantes de

la calidad composicional y nutricional de los butiá para su consumo directo, así como de la materia prima que se utiliza para la obtención de subproductos.

Este trabajo tuvo como objetivos: caracterizar la conservación de frutos de butiá *in natura* almacenados en tres temperaturas, 5, 15 y 20 °C, durante 0, 7, 21 y 28 días, identificar las principales causas de deterioro y cuantificar la evolución del color, el contenido de materia seca, trans-β-caroteno, sólidos solubles totales, pH y acidez titulable expresado en ácido cítrico en la pulpa y cáscara.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

Los frutos fueron obtenidos en la “Vuelta del Palmar” en el área de Castillos, Rocha, Uruguay. Se seleccionaron las palmas que presentaban frutos de butiá de color anaranjado según Pantone 152C (L 49,6; °Hue 64,6; Croma 58,9) y de ellas se cosecharon los frutos que no se desprendieron del racimo durante el proceso del corte y caída. Los frutos cosechados en abril de 2011 fueron trasladados a LATU (Montevideo) donde se lavaron y desinfectaron. La desinfección consistió en inmersión de los frutos en agua con hipoclorito de sodio (NaClO, 100 ppm) durante 5 min. Luego se enjuagaron y se seleccionaron frutos sin daños, pudriciones y/o alteraciones visibles (Figura 1).



Figura 1. Selección de frutos para almacenar.

Los frutos sin defectos fueron colocados en bandejas de PVC al azar (50 frutos por repetición por tratamiento). Las bandejas fueron almacenadas durante 7, 21 y 28 días dentro de cámaras acondicionadas a tres temperaturas 5, 15 y 20 °C y a 90 %HR. Se utilizaron tres repeticiones (bandejas) para cada tratamiento para las evaluaciones realizadas.

### Pérdida de peso

Al instalar el estudio (0 días) y en cada momento de salida de cámara (7, 21 y 28 días) se determinó el peso total de los frutos y el peso de frutos sin defectos y con defectos visibles en una balanza digital (Shimadzu, Modelo: Bx 22 KH, 20000 g ± 0.1 g). Se calculó la pérdida de peso durante el almacenamiento con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = [\text{peso a la salida de cámara}] \times [\text{peso inicialmente almacenado}]^{-1} \times 100$$

### Determinación de defectos en la calidad en la fruta

En cada salida de cámara se cuantificó el número y el peso de frutos sin defectos y con defectos. Los defectos identificados fueron frutos con pudriciones, manchados y arrugados y se expresaron como porcentaje del peso inicialmente almacenado. A fin de identificar los patógenos causantes de las pudriciones se enviaron muestras al Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de la Facultad de Agronomía (Universidad de la República, Montevideo).

### Color en cáscara y pulpa

El color fue medido en 20 frutos en la zona ecuatorial en zonas opuestas, por duplicado, para la cáscara y la pulpa en cada salida de cámara y para cada temperatura de conservación. La medición se realizó por el sistema CIE L\*a\*b\*, utilizando un colorímetro tri-estimulo (Minolta CR-10, Japón). Se midieron las variables L\* (Luminosidad, 0 = negro a 100 = blanco), a\* (-a = verde, a = rojo) y b\* (-b = amarillo, b = azul). Se calculó la saturación del color (Croma), el tono (ángulo Hue, °hue) y el índice de color (IC) con las siguientes ecuaciones (Jiménez et al., 1981):

$$\text{Croma} = (a^*^2 + b^*^2)^{1/2}$$

$$^{\circ}\text{hue} = \text{arco tangente}(b^*/a^*)$$

$$\text{IC} = (1000 \times a^*) / (b^* \times L)$$

### Contenido de materia seca

Se pesó una muestra fresca de 5 g de pulpa o cáscara y se secó en estufa (Blue.M., EUA) con ventilación cenital a 105 °C hasta peso constante. La medición se realizó por triplicado. Se calculó el porcentaje de materia seca (% MS) de cada muestra de la siguiente manera:

$$\text{Materia Seca (\%)} = (\text{peso seco muestra}) \times (\text{peso fresco muestra})^{-1} \times 100$$

### Contenido de sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) se determinaron en la pulpa de 20 frutos con un refractómetro digital (ATAGO Poquet PAL-10 a 53 ± 0,1° Brix, Japón). Las mediciones se realizaron en el jugo extraído de la pulpa por compresión. Los valores se expresaron en °Brix sin corrección por acidez.

### Determinación del pH y la acidez titulable del jugo

Se obtuvo el jugo de la pulpa de 20 frutos sobre el cual se determinó por triplicado el pH y la acidez titulable (AT). El pH del jugo fue medido mediante un pHmetro digital (± 0,01; DigySense® Cole-Parmer). La acidez titulable fue determinada en una muestra de 10 mL de jugo, por triplicado, con una solución de NaOH 0,1 N. Los resultados fueron expresados en % de ácido cítrico.

### Determinación del contenido de trans-β-caroteno

La cuantificación de trans-β-caroteno fue realizada de acuerdo a Szpylka y De Veris (2005) con modificaciones (Zaccari, 2010). Para la extracción se utilizó 1 g de pulpa y 0,5 g de cáscara en una solución de extracción de tetrahidrofurano y metanol (25:75 v/v).

El procedimiento se repitió hasta pérdida total de color en la muestra. La cantidad de trans- $\beta$ -caroteno se cuantificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Spectral Series P100, Thermo Separations Products, EUA), utilizando el estándar externo trans- $\beta$ -caroteno tipo I (Sigma-Aldrich), una columna C30 YMCTMCarotenoid S-5; 4,6  $\mu\text{m}$  x 250 mm (Waters, EUA) termostataada a 30  $^{\circ}\text{C}$ , y fase móvil de etanol, metanol y tetrahydrofurano (75:20:5 v/v/v). La detección se realizó en longitud de onda de 450 nm con un detector UV-visible (UV-2000 SpectralSytem®, EUA). Los resultados se expresaron en mg de trans- $\beta$ -caroteno /100 g peso fresco.

## Análisis Estadístico

El diseño experimental consistió en un diseño factorial de tres temperaturas (Temperatura) y cuatro tiempos de almacenamiento (Momento). Los datos obtenidos en la variable de pérdida de peso se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANOVA;  $\leq 0,05$ ), y en el caso que correspondió, las medias se separaron por test de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Dentro de cada temperatura y momento de almacenamiento, para las variables color, MS, STT, AT, pH y trans- $\beta$ -caroteno se realizó un ANOVA de una vía, y en el caso que correspondió se separaron las medias por el test de Tukey ( $P \geq 0,05$ ). Los análisis estadísticos fueron procesados en el programa InfoStat (2004)/Versión 2007p.

## Resultados y Discusión

### Pérdida de peso

En la Figura 2 se observa que los frutos "sanos", sin defectos visibles, conservados a 5  $^{\circ}\text{C}$  presentaron una pérdida diaria de peso cercano al 1 % del peso inicial y un 4 % en frutos almacenados a 15 y 20  $^{\circ}\text{C}$ .

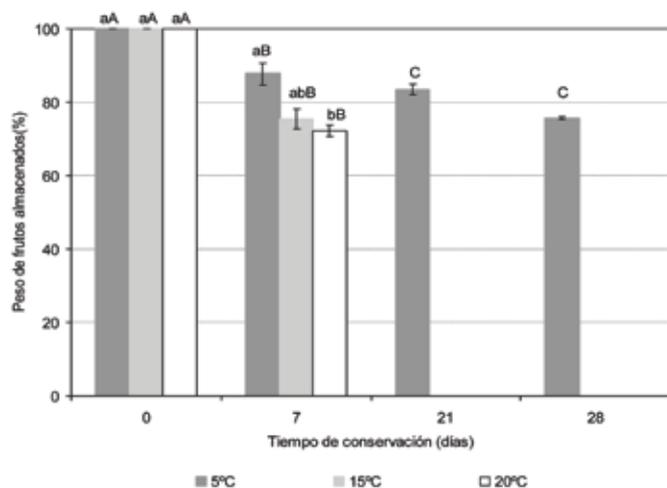


Figura 2. Pérdida de peso de los frutos sin defectos durante la conservación a 5  $^{\circ}\text{C}$ , 15  $^{\circ}\text{C}$  y 20  $^{\circ}\text{C}$  durante 7, 21 y 28 días. Media  $\pm$  EE. Letras minúscula iguales dentro de cada momento de evaluación indican que no hay diferencias estadísticas (Tukey  $\geq 0,05$ ). Letras mayúsculas iguales para cada temperatura de conservación indican que no hay diferencias estadísticas entre momentos de evaluación (Tukey  $\geq 0,05$ ).

Todos los frutos fueron descartados por pudrición, manchas u arrugamientos a los 21 y 28 días conservados a 15 y 20  $^{\circ}\text{C}$  (Figura 3 y 4 A). Estos resultados verificaron una alta tasa de deterioro de los frutos de butiá al incrementarse la temperatura a 20  $^{\circ}\text{C}$  (Salunkhe y Desai, 1984), coincidente con los resultados de Amarante y Megguer (2008). Estos autores determinaron una tasa de respiración en frutos de *Butia eriosphata* (Martius) almacenados a 0  $^{\circ}\text{C}$  de 50,26  $\text{nmol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y 10,7 veces superior a 20  $^{\circ}\text{C}$ , con un cociente de temperatura ( $Q_{10}$ ) = 4,3 cuando la temperatura se incrementó de 0  $^{\circ}\text{C}$  a 10  $^{\circ}\text{C}$ , y un  $Q_{10}$  = 2,5 al pasar de 10 a 20  $^{\circ}\text{C}$ .

## Defectos de calidad en la fruta

Las pudriciones por hongos, frutos manchados y arrugados fueron las tres causas de deterioro de la calidad de la fruta y de los descartes en este estudio (Figuras 3 y 4). En frutos conservados a 15 y 20  $^{\circ}\text{C}$  se observó la presencia de larvas de gorgojos y mosca. Los huevos de estos insectos estaban en el interior del coquito y/o pulpa, no fueron detectados síntomas en el momento de instalar el estudio, y se desarrollaron durante el almacenamiento. No se registraron pudriciones de frutos en el almacenamiento a 5  $^{\circ}\text{C}$ . En esta temperatura de conservación se observó arrugamiento y ablandamiento de los frutos que no puede atribuirse a la deshidratación, dado que se mantuvo la humedad relativa ambiente alta (90-95%) en las cámaras de conservación. Este fenómeno probablemente fue consecuencia de los procesos de deterioro ocasionado en parte por los daños en la cosecha y la alta tasa metabólica que aceleraron la senescencia de los tejidos, provocando a nivel de pared celular su colapso (Negi y Handa, 2008). Se aislaron dos hongos patógenos causantes de las pudriciones de frutos de butiá de este estudio, *Penicillium* sp. y otro hongo aún no reportado en el país que está siendo analizado para su identificación. *Penicillium* sp. es un hongo comúnmente observado como agente causal de patologías en poscosecha de frutos (Bartz y Brecht, 2003). Las manchas de color marrón que aparecieron en todas las temperaturas y tiempos de conservación puede deberse a procesos de deterioro, como oxidación enzimática y/o el inicio del desarrollo de los hongos que producen la pudrición en almacenamiento (Bartz y Brecht, 2003).



Figura 3. Frutos de butiá en el momento de salida de cámaras de almacenamiento a los 7, 21 y 28 días, conservados en tres temperaturas 5; 15 y 20  $^{\circ}\text{C}$ .

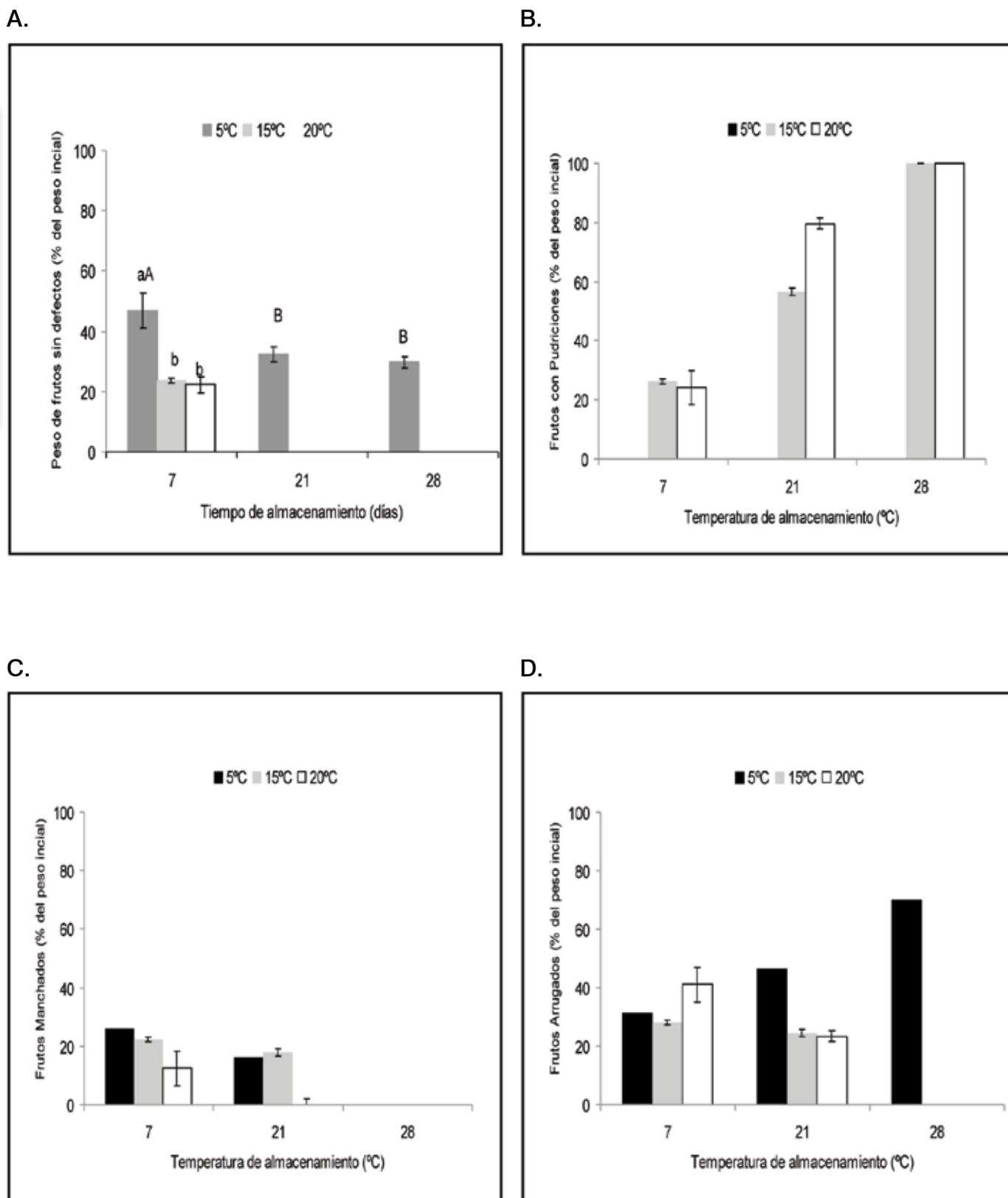


Figura 4. Frutos Sin Defectos (A), con Pudriciones (B), Arrugados (C) y Manchados (D), en tres temperaturas de conservación (5, 15 y 20 °C) y en cada momento de salida del almacenamiento (7, 21 y 28 días), expresado en porcentaje del peso inicialmente almacenado.

## Color

En este estudio no se observaron cambios de brillo (luminosidad) relevantes en la cáscara ni en la pulpa. Al mismo tiempo, el tono de color de la pulpa tendió a ser menos anaranjado y más amarillo a los 28 días de conservación a 5 °C, y menos saturado a mayor temperatura y tiempo de conservación (Tabla 1). El color de la cáscara de los frutos fue anaranjado más intenso a los 21 días de conservado a 5 °C, posiblemente debido a un incremento de las coloraciones más oscuras (marrones) que dieron lugar a manchas. A su vez, la pulpa tuvo un índice de color más claro (más amarillo, menos anaranjado) que la cáscara. Los cambios de color pueden estar asociados a la pérdida de pigmentos (carotenoides y flavonoides) y/o a procesos de oxidación enzimática (Saltveit, 2000). Sin embargo, como se describirá más adelante, el menor color anaranjado no se explicaría en este estudio por pérdida de trans- $\beta$ -caroteno.

	Cáscara				Pulpa			
	0	7	21	28	0	7	21	28
<b>Luminosidad (L)</b>								
5 °C	42,6 ± 0,3	43,7 ± 0,3a	41,7 ± 0,3	42,6 ± 0,2	42,6 ± 0,3	43,7 ± 0,3a	41,7 ± 0,3	42,6 ± 0,2
15 °C	42,6 ± 0,3	42,7 ± 0,7b	-	-	42,6 ± 0,3	42,7 ± 0,7b	-	-
20 °C	42,6 ± 0,3	42,9 ± 0,4a	-	-	42,6 ± 0,3	42,9 ± 0,4a	-	-
	* Temperatura ≥ 0,0133			Momento ≥ 0,1351	Temperatura P ≤ 0,2337			Momento P ≤ 0,0190
<b>Tono (°hue)</b>								
5 °C	68,4 ± 1,1	69,2 ± 0,6a	67,5 ± 0,7	68,3 ± 5,3	76,7 ± 1,7B	76,2 ± 0,6aA	78,1 ± 0,8AB	80,5 ± 0,5C
15 °C	68,4 ± 1,1	71,1 ± 0,4b	-	-	76,7 ± 1,7	75,6 ± 1,8a	-	-
20 °C	68,4 ± 1,1	69,2 ± 0,4a	-	-	76,7 ± 1,7	80,4 ± 0,6b	-	-
	Temperatura ≥ 0,0049			Momento ≥ 0,1406	Temperatura P ≤ 0,0074			Momento P ≤ 0,0001
<b>Saturación (Croma)</b>								
5 °C	48,8 ± 5,2A	45,1 ± 0,4aB	45,7 ± 0,7B	45,4 ± 0,3B	48,6 ± 1,5A	51,2 ± 0,6aB	48,6 ± 0,5a	52,7 ± 0,4B
15 °C	48,8 ± 5,2	46,8 ± 0,5b	-	-	48,6 ± 1,5	51,9 ± 1,4a	-	-
20 °C	48,8 ± 5,2	45,9 ± 0,4ab	-	-	48,6 ± 1,5	62,9 ± 0,6b	-	-
	Temperatura ≤ 0,0214			Momento ≤ 0,0001	Temperatura P ≤ 0,0001			Momento P ≤ 0,0001
<b>Índice de Color</b>								
5 °C	9,1 ± 2,5	9,1 ± 2,4	10,1 ± 2,6	9,4 ± 2,6	4,6 ± 0,9aA	5,3 ± 1,5aA	4,8 ± 1,7a	3,6 ± 1,2B
15 °C	9,1 ± 2,5	8,0 ± 1,9	-	-	4,6 ± 0,9a	4,8 ± 1,0a	-	-
20 °C	9,1 ± 2,5	8,9 ± 1,9	-	-	4,6 ± 0,9a	3,5 ± 1,2b	-	-
	Temperatura ≥ 0,1149			Momento ≤ 0,0988	Temperatura P ≤ 0,0001			Momento P ≤ 0,0001

Tabla 1. Luminosidad, Tono (°hue), Saturación (Croma) e Índice de color en cáscara y pulpa de butiá conservados a 5, 15 y 20 °C durante 0, 7, 21 y 28 días. Media ± EE. Letras minúsculas iguales dentro de la misma columna o mayúsculas dentro de la fila indican que no hay diferencia estadística \* Valor P de efectos principales (Temperatura y Momento).

## Materia seca, sólidos solubles totales, pH y acidez titulable

El contenido de materia seca (MS) de la cáscara fue similar en todas las temperaturas y tiempos de conservación con valores entre 18,9 y 22,3 % (Tabla 3). El contenido de MS de la pulpa fue menor que el de la cáscara, y se modificó con la temperatura de conservación. A 5 °C el contenido de MS estuvo entre 15,5 y 16,4 %, y temperaturas de 15 y 20 °C de conservación determinaron menor contenido de MS. Los sólidos solubles (SST) en el jugo de pulpa de butiá disminuyeron con el tiempo de conservación y al aumentar la temperatura. A la semana de almacenamiento se observó que elevar la temperatura de conservación 10 °C (de 5 °C a 15 °C) provocó una pérdida de 30 a 40 % de SST. El contenido de MS y de SST obtenidos en pulpa son similares a los reportados en pulpa de butiá por Faria et al. (2008) y Crosa et al. (2011). La disminución del contenido de MS y de SST al aumentar el tiempo y la temperatura de almacenamiento puede explicarse por la mayor respiración, el aumento de la permeabilidad de la membrana celular y la degradación de las paredes celulares (Salunkhe y Dasai, 1984; Saltveit, 2000).

Al igual que ha sido reportado por Faria et al. (2008) y Crosa et al. (2011) se obtuvo un pH del jugo de frutos de butiá muy ácido. Al mismo tiempo, se observó que el porcentaje de ácido cítrico, determinado por acidez titulable, bajó al aumentar el tiempo y la temperatura de conservación (Tabla 2).

	0	7	21	28
	<b>SST (°Brix)</b>			
5 °C	14,8 ± 0,7A	13,2 ± 0,6aB	11,8 ± 0,3B	10,1 ± 0,2C
15 °C	14,8 ± 0,7	8,9 ± 0,5b	-	-
20 °C	14,8 ± 0,7	8,7 ± 0,4b	-	-
	Temperatura P ≤ 0,0001			Momento ≤ 0,0001
<b>pH</b>				
5 °C	2,54 ± 0,01	3,15 ± 0,09aB	4,97 ± 0,15A	3,22 ± 0,01B
15 °C	2,56 ± 0,01	2,86 ± 0,04b	-	-
20 °C	2,54 ± 0,01	3,31 ± 0,01a	-	-
	Temperatura P ≤ 0,0031			Momento ≤ 0,0001
<b>Acidez titulable (% ácido cítrico)</b>				
5 °C	1,60 ± 0,01B	2,02 ± 0,02aA	1,37 ± 0,01C	1,37 ± 0,01C
15 °C	1,60 ± 0,01	1,48 ± 0,01b	-	-
20 °C	1,60 ± 0,01	1,28 ± 0,11c	-	-
	Temperatura P ≤ 0,0031			Momento ≤ 0,0001

Tabla 2. Sólidos solubles totales (°Brix), pH; acidez titulable (% ácido cítrico) en jugo de pulpa de butiá conservados a 5, 15 y 20 °C durante 0, 7, 21 y 28 días. Media ± EE. Letras minúsculas iguales dentro de la misma o mayúsculas dentro de la fila indican que no hay diferencia estadística \* Valor P de efectos principales (Temperatura y Momento).

	Cáscara				Pulpa			
	0	7	21	28	0	7	21	28
<b>Materia Seca (%)</b>								
5 °C	21,3 ± 0,1	20,7 ± 0,9	22,1 ± 0,1	21,9 ± 1,0	16,2 ± 0,1	16,5 ± 0,3a	15,5 ± 0,1	16,4 ± 0,3
15 °C	21,3 ± 0,1	18,6 ± 0,7	-	-	16,2 ± 0,1	12,3 ± 0,4b	-	-
20 °C	21,3 ± 0,1	18,9 ± 0,8	-	-	16,2 ± 0,1	13,2 ± 0,6b	-	-
	Temperatura P ≥ 0,2186		Momento P ≥ 0,266		Temperatura P ≤ 0,0001		Momento P ≥ 0,0697	
<b>trans-β-caroteno (mg/100g peso fresco)</b>								
5 °C	1,44 ± 0,01	1,85 ± 0,03	2,10 ± 0,31	2,05 ± 0,26	1,06 ± 0,01a	0,76 ± 0,03b	1,15 ± 0,25a	1,03 ± 0,06a
15 °C	1,44 ± 0,01	2,32 ± 0,15	-	-	1,06 ± 0,01	0,96 ± 0,15	-	-
20 °C	1,44 ± 0,01	2,36 ± 0,12	-	-	1,06 ± 0,01	0,81 ± 0,12	-	-
	Temperatura P ≤ 0,138		Momento P ≤ 0,257		Temperatura P ≤ 0,780		Momento P ≤ 0,029	

Tabla 3. Materia seca (%) y contenido de trans-β-caroteno (mg/100 g peso fresco) en cáscara y pulpa de butiá conservados a 5, 15 y 20 °C durante 0, 7, 21 y 28 días. Media ± EE. Para la cáscara o para la pulpa, letra dentro de la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas (Tukey ≥ 0,05). \*Valor P de efectos principales (Temperatura y Momento).

## Contenido de trans-β-caroteno

En las condiciones de este trabajo no se observaron modificaciones en el contenido de trans-β-caroteno en la cáscara por efecto de la temperatura y tiempo de conservación. El contenido trans-β-caroteno de la pulpa fue sensiblemente menor a los siete días de conservación a 5 °C (Tabla 3). En todos los casos se cuantificó mayor cantidad de trans-β-caroteno en cáscara que en pulpa. La estructura celular y la composición de la cáscara es diferente a la pulpa, probablemente con mayor contenido de ceras y cloroplastos a los cuales están asociados los carotenoides (Paliyath y Murr, 2008). Los frutos de butiá han sido reportados como una buena fuente de carotenoides, con 1,11 a 4,39 mg/100 g de pulpa fresca, con el β-caroteno dominante con 1,61 mg/100 g, seguido de otros carotenoides no pro-vitámicos como fitoeno y fitoflueno (Faria et al., 2011). A partir de los resultados obtenidos se puede estimar que la cantidad de β-caroteno aportados por 100 g de butiá enteros *in natura* (cáscara y pulpa) cubriría el 16,4 % de los requerimientos diarios de un niño (WHO/FAO, 2003).

En las condiciones de este estudio se concluye que el butiá puede conservarse a 5 °C durante siete días, manteniendo características de color, MS, pH y contenido de trans-β-caroteno para consumo en fresco (*in natura*) o para su industrialización. La cantidad de frutos que se mantiene con calidad a la semana de conservación a 5 °C es bajo (47 % del peso inicialmente almacenado), lo que verifica que es un fruto con alta tasa de deterioro. Para disminuir el deterioro de los frutos para su uso entero *in natura*, en el momento de la cosecha debe reducirse rápidamente la temperatura de pulpa (a menos de 5 °C); la temperatura de conservación óptima es menor a 5 °C. Asimismo, se debe considerar realizar modificaciones fundamentales en el proceso de cosecha de los frutos, que minimicen su daño físico. La información obtenida ha permitido caracterizar la evolución de atributos físicos y químicos de butiá en las condiciones de cosecha estudiadas y durante su almacenamiento en tres temperaturas.

## Reconocimientos

A la Gerencia de Proyectos Alimentarios y al equipo técnico del Departamento de Gestión y Transferencia Tecnológica para el Desarrollo Local del LATU, Carlos Ayres y Julio Sosa. Al Sr. Molina (cosechador) por sus aportes de conocimientos durante la cosecha de los frutos. A Roxana Las por realizar parte de los trabajos de análisis en el Laboratorio de Calidad de Alimentos y de Calidad de Productos de la Facultad de Agronomía. Este trabajo fue financiado por el INIA a través del Proyecto FPTA 178.

## Referencias

- AMARANTE, Cassandro Talamini do; MEGGUER, Clarice Aparecida. Qualidade pós-colheita de frutos de butiá em função do estado de maturação na colheita e do manejo da temperatura. En: *Ciencia Rural*. 2008, 38(1):46-53.
- BAEZ, Fernando; JAURENA, Martín. *Regeneración del palmar de butiá (Butia capitata) en condiciones de pastoreo: relevamiento de establecimientos rurales de Rocha*. Rocha: PROBIDES, 2000. (Documentos de Trabajo; 27)
- BARTZ, Jerry A.; BRECHT, Jeffrey K. *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. 2a. ed. New York: Marcel Dekker, 2003. (Food Science and Technology; 123).
- BETANCURT, Pablo; GIOSCIA, Diego; AYRES, Carlos; ARCIA, Patricia. Frutos autóctonos de butiá: innovación y transferencia tecnológica. En: *INNOTEC*. 2008, (3):63-71.
- BURZACO, Patricia; IRISITY, Mariana; RUIZ-DÍAZ, María Fernanda; SOSA, Julio; PINTO, Ángel. *Bombones*. Montevideo: LATU, 2011. (Serie Frutos Nativos: Butiá; 5).
- CROSA, María José; BURZACO, Patricia; PASTORINO, N.; IRISITY, Mariana; GIOSCIA, Diego; AYRES, Carlos. Caracterización fisicoquímica y nutricional del fruto *Butia capitata* y de su pulpa tamizada. En: *INNOTEC*. 2011, (6):3-6.
- FARIA, Juliana Pereira; ARELLANO, Daniel Barrera; GRINALDI, Renato; SILVA, Lucas Carvalho Ramos da; VIEIRA, Roberto Fontes; SILVA, Dijalma Barboza; AGOSTINI-COSTA, Tania da Silveira. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata var capitata*). En: *Revista Brasileira Fruticultura*. 2008, 30(3):827-829.
- FARIA, Juliana Pereira; SIQUEIRA, Egle; VIEIRA, Roberto Fontes; AGOSTINI-COSTA, Tania Da Silveira. Fruits of *Butia capitata* (Mart.) as good sources of β-carotene and provitamina. En: *Revista Brasileira Fruticultura*. 2011, Volumen Especial:612-617.
- JIMÉNEZ, M.; CUQUERELLA, J.; MARTINEZ-JAVEGA, José María. Determination of color index for citrus fruits degreening. En: *Proceeding International Society Citriculture*. 1981, (2):750-753.
- NEGI, Preadeep; HANDA, Avtar. Structural deterioration of the produce: the breakdown of cell components. En: PALIYATH, Gophinadhan; MURR, Dennis; HANDAR, Avtar; LURIE, Susan.

- Postharvest biology and technology fruits, vegetables and flowers.* San Francisco: Wiley-Blackwell, 2008. pp.162-194.
- PALIYATH, Gopinadhan; MURR, Dennis. Biochemistry of fruits. En: PALIYATH, Gopinadhan; MURR, Dennis; HANDAR, Avtar; LURIE, Susan. *Postharvest biology and technology fruits, vegetables and flowers.* San Francisco: Wiley-Blackwell, 2008. pp.19-50.
  - RIVAS, Mercedes. Conservación *in situ* de recursos fitogenéticos. En: IICA. *Estrategias en recursos fitogenéticas para países del Cono Sur.* Montevideo: IICA; PROCISUR, 2001. pp. 65-78.
  - RIVAS, Mercedes; BARILANI, A. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (Marc.) Becc. de Uruguay. En: *Agrociencia.* 2004, (8):11-20.
  - SALTVEIT, Mikael. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. En: *Postharvest Biology and Technology.* 2000, (21):61-69.
  - SALUNKHE, D.; DESAI, B. *Post harvest biotechnology of vegetables.* Vol. 1. Boca Raton: CRC Press, 1984.
  - SCHWARTZ, E.; NEITZEL, R.S.; BARBIERI, R.L.; FACHUNELLO, J.C. Variabilidade em inflorescências de butiazeiros de Santa Vitória do Palmar. En: EMBRAPA. *III Simpósio Nacional do Morango. II Encontro sobre Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul,* (Pelotas 7 a 10 de noviembre de 2006). Pelotas : Embrapa, 2007. (Documentos 203) pp. 250-252.
  - SZPYLKA, John; DE VRIES, Jonathan W. Determination of carotene in supplements and raw materials by reversed-phase high pressure liquid chromatography: collaborative study. En : *Journal of AOAC International.* 2005, (88):1279-1291.
  - WHO; FAO. *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation.* Geneve: WHO; FAO, 2003. (WHO Technical Report Series; 916)
  - ZACCARI, Fernanda. *Caracterización de seis cultivares de zanahorias (Daucus carota, L.), crudas y cocidas al vapor, por color y contenido y bioaccesibilidad in vitro de  $\beta$ -carotenos y minerales.* Montevideo: UDELAR. Facultad de Agronomía, 2010. (Tesis de Maestría).
-

# Evolución del desarrollo del color en sistema modelo de composición similar al dulce de leche. Influencia del tiempo de calentamiento y del pH

Color development in dulce de leche-like system.  
Effect of heating time and pH

Rodríguez, Analía <sup>(1)</sup>, Piagentini, Andrea <sup>(2)</sup>, Rozycki, Sergio <sup>(2)</sup>, Lema, Patricia <sup>(3)</sup>, Pauletti, Miguel S. <sup>(2)</sup>, Panizzolo, Luis Alberto <sup>(1)</sup>

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

<sup>(2)</sup> Instituto de Tecnología de Alimentos (FIQ-UNL), Santa Fe, Argentina - <sup>(3)</sup> Instituto de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República. Uruguay

Contacto: arodriguez@fq.edu.uy

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 17/11/2012

## Resumen

El color es un atributo importante en la elección del producto dulce de leche por parte del consumidor. El mismo se desarrolla en el proceso de elaboración debido principalmente a las reacciones de pardeamiento no enzimático, las cuales se ven influenciadas por varios factores. En este trabajo se evaluó el desarrollo de color, con el tiempo de tratamiento térmico y el pH inicial como variables tecnológicas, en un sistema modelo compuesto de caseinato, lactosa, sacarosa y agua destilada cuya composición fue similar a la del dulce de leche comercial. El estudio del color se realizó utilizando los parámetros de medición de color del sistema CIELAB y el índice de Kubelka Munk (K/S). Con ambos métodos se constató un aumento significativo del  $dE^*_{ab}$  y del K/S con el tiempo de tratamiento térmico y el pH inicial. Con el sistema CIELAB además se observó una tendencia a disminuir la luminosidad con el tiempo y el aumento del pH inicial, y el aumento de  $a^*$  con el tiempo.

Palabras clave: Dulce de leche, maillard, color, melanoidinas.

## Abstract

Color in dulce de leche is an important product attribute in consumers choice. Color development is mainly due to non-enzymatic browning reactions during the manufacture, which are influenced by several factors. In this work color development and the influence of technological variables, time of heat treatment and initial pH, were evaluated on a model system consisting of caseinate, lactose, sucrose and distilled water, which composition was similar to commercial dulce de leche. Color was studied using color parameters, the CIELAB system and the Kubelka Munk index (K/S). Both methods showed a significant increase in  $dE^*_{ab}$  and K/S with heat treatment time and initial pH. The CIELAB system also showed a Luminance decrease with time and initial pH increase, and  $a^*$  increase with time.

Keywords: dulce de leche, maillard, color, melanoidins.

## Introducción

El dulce de leche es el producto obtenido por el calentamiento de leche adicionada de sacarosa y su concentración (en algunos casos se reemplaza parcialmente por glucosa, fructosa u otro azúcar permitido según normativa vigente en el país donde se elabore), el cual adquiere coloración, consistencia y sabor característicos como consecuencia de las reacciones de pardeamiento no enzimático que ocurren, con la reacción de Maillard como la principal responsable de las transformaciones (Malec et al., 1999).

La reacción de Maillard es la descripción general de una serie de reacciones complejas debidas a la reacción de grupos amino libres como aminas, aminoácidos, péptidos y proteínas con compuesto carbonilo, particularmente azúcares reductores. Es especialmente importante en sistemas alimentarios en los que los productos de la reacción pueden ser responsables del aroma, gusto y apariencia de los alimentos (Fayle y Gerrard, 2005), entre ellos el color. El color pardo característico del dulce de leche es el resultante del desarrollo de los

compuestos coloreados denominados melanoidinas, que imparten un color marrón oscuro (pardo) en las etapas finales de la reacción de Maillard. Esta reacción es afectada por varios factores, como el pH (Petriella et al., 1985; Hayashi y Namiki, 1986; Pauletti et al., 1999; Davies y Labuza, 2003; Rozycki, 2003; Nursten, 2005; Dattatreya y Rankin, 2006;) y la temperatura (Pauletti et al., 1999; Nursten, 2005; Rozycki et al., 2007), entre otros (Davies y Labuza, 2003).

Considerando que en las etapas avanzadas de la reacción de Maillard se forman las melanoidinas, pigmentos pardos de elevado peso molecular (Ferrer et al., 1999), la medida de color brinda un índice útil para evaluar la intensidad de esta reacción (Jiménez et al., 2003), y puede ser un indicador no específico.

El color en el dulce de leche juega un rol preponderante en la evaluación de la calidad comercial y aceptación por parte de los consumidores. Hough et al. (1986; 1992) encontraron que para el consumidor el color y la textura eran más importantes que el sabor. En cuanto al color, las preferencias del mercado no son uniformes, hecho que se refleja en la gama de colores que allí se oferta (Pauletti, 2001). Sin embargo, a nivel industrial es de gran importancia mantener la

uniformidad del color (Hough et al., 1991), para lo cual se presenta la problemática de encontrar la metodología más adecuada para la medición del color en el dulce de leche. Son comúnmente usados los métodos de evaluación visual (subjetivos) y el uso de estándares de color, aunque la medida objetiva del color por métodos instrumentales es deseada y aplicada ampliamente en la industria de alimentos (Wrolstad y Smith, 2010).

El color se puede definir como la sensación que experimenta el observador cuando la energía radiante del espectro visible (380-770nm) alcanza la retina del ojo. Dentro de los métodos instrumentales de medición de color se halla el colorímetro, con el cual se puede medir cuánto se desvían parámetros del color de una muestra frente a un estándar, o cambios de *batch a batch*, cambios por proceso o almacenamiento, etcétera. Las diferencias de color son calculadas como la diferencia de  $L^*a^*b^*$  entre muestras, y es posible hacer las siguientes interpretaciones:  $dL^*$  positivo significa mayor luminosidad de la muestra vs. estándar y viceversa;  $da^*$  positivo significa más 'rojo' o menos 'verde' y viceversa;  $db^*$  positivo mas 'amarillo' o menos 'azul' y viceversa. Cuando se desea conocer si hay diferencias de color entre dos muestras y su magnitud, sin importar la dirección, se puede calcular la diferencia total de color  $dE^*_{ab} = (dL^{*2} + da^{*2} + db^{*2})^{1/2}$  (Wrolstad y Smith, 2010).

En el caso de alimentos translúcidos (no son totalmente opacos ni completamente transparentes), como lo es el dulce de leche, para detectar correctamente diferencias entre muestras (tanto visuales como instrumentales) resulta influyente la forma de presentación de la muestra. Los problemas pueden solucionarse aplicando el análisis de capa fina de Kubelka-Munk, por el cual se mide la reflexión en una muestra de poco espesor (4-5 mm) utilizando un fondo blanco y uno negro, relacionándolo con un coeficiente de absorción (K) y otro de dispersión (S), según:

$$\frac{K}{S} = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}}$$

$R_{\infty}$  = reflexión de una capa tan gruesa, llamada de espesor infinito, que al aumentar el espesor no varía la reflexión (Calvo y Durán, 1997).

El parámetro K está relacionado con la cantidad de grupos cromóforos presentes (Pauletti, 1999; Rozycki, 2003). El índice de Kubelka Munk ha sido ampliamente utilizado en medidas de color en dulce de leche o sistemas modelos representativos (Hough et al., 1991; Pauletti, 1999; Rozycki, 2003, 2007, 2010), por haberse demostrado que es representativo de la percepción sensorial (Buera et al., 1990).

Como fue mencionado anteriormente, la reacción de Maillard es afectada por varios parámetros, entre ellos el pH, debido a que varias de las etapas de la reacción son catalizadas por mecanismos ácido-básico. En la primera etapa de la reacción, la condensación amino-carbonilo, el medio ácido aumenta la polaridad del grupo carbonilo y el medio básico aumenta el carácter nucleofílico del grupo amino, el cual en condiciones ácidas no tiene participación activa porque pierde el par de electrones libres (Dattatreya y Rankin, 2006). Posteriormente, la degradación del compuesto de Amadori formado también es influenciada por el pH. A pH ácidos se ve favorecida la ruta 1,2 enolización con la formación de furfúrales, mientras que a pH básico se ve favorecida la vía de 2,3 enolización en la que se producen compuestos de seis carbonos y otras reductonas (Delgado, 1993; Nursten, 2005; Dattatreya y Rankin, 2006). La etapa de fragmentación de los azúcares, en la que se producen intermediarios de dos y tres carbonos muy reactivos, es altamente dependiente del pH. Hay gran formación de compuestos de fragmentación a pH básico y poca a pH ácido. Es al pH alcalino al cual se da mayor desarrollo de color y al cual se favorece la vía de la fragmentación (Hayashi y Namiki, 1986). El pH también afecta los compuestos pardos formados. Hayashi y Namiki (1985) encontraron que las melanoidinas formadas a pH ácido y alcalino son diferentes al estudiar la relación nitrógeno/carbono (N/C) de las mismas formadas a partir de mezclas equimolares de glucosa y  $\beta$ -alanina a diferentes pH. Observaron que esta relación

aumentaba significativamente con el aumento del pH inicial, dado que en esas condiciones está favorecida la vía de fragmentación de azúcares y el desarrollo de color.

El objetivo de este trabajo fue evaluar para un sistema lácteo de alto contenido de sacarosa la influencia del pH inicial (6; 6,8; 7,5) y el tiempo de calentamiento (0, 10, 30, 60 minutos) sobre el desarrollo del color, analizando cada componente del color del sistema CIELAB y el índice de Kubelka Munk (K/S).

## Materiales y Métodos

### Preparación del sistema modelo

Se preparó a partir de caseinato de sodio (LACTOPROT Deutschland GMBH, 95 % pureza),  $\alpha$ -lactosa (Sigma, Netherland), sacarosa comercial (azúcar blanco refinado ALUR, Uruguay) y agua destilada, en la proporción en que se encuentran en un dulce de leche comercial (7 % proteína; 11 % lactosa; 30 % agua y 44 % sacarosa), obteniéndose una  $a_w$  final de 0,85, dentro del rango encontrado para el producto (Tamime, 2009; Castañeda et al., 2004; Demiate et al., 2001). Los sólidos se mezclaron en seco y se agregó el agua a 80 °C con fuerte agitación hasta disolución de los sólidos, y posteriormente se homogeneizó a 18000 rpm por 3 minutos en homogeneizador Ultraturax T25 (IKA-Labortechnik) con dispersante S25N-25F. El pH se midió potenciométricamente con peachímetro (Orion Research digital ionalyzer/501) y se ajustó al valor de diseño (pH 6; 6,8; 7,5) utilizando ácido láctico o hidróxido de sodio según el caso, homogeneizando mediante agitación mecánica manual y magnética y, finalmente, con Ultraturax.

### Diseño experimental

El diseño consistió en Unidades experimentales (tubos cerrados) que contenían el sistema modelo, dispuestas al azar en una gradilla, que fueron sumergidas en un baño de aceite a la temperatura pre-establecida, constante e igual a 112 °C (con agitación y control automático de temperatura), utilizando una plancha calefactora (IKA C-MAG HS7) y termocupla (IKA ETS-D5). Las muestras fueron retiradas a los tiempos seleccionados (0, 10, 30, 60 minutos) y enfriadas inmediatamente con agua helada (2 °C). Las experiencias se realizaron por duplicado.

### Evaluación del color

Las medidas de color se realizaron en un colorímetro (Konica Minolta 600d) con iluminante D65, 10° de ángulo del observador y componente especular excluido (Dattatreya y Ranking, 2006).

Se utilizaron celdas no estándares de color blanco mate y negro mate de 28 mm diámetro y 4 mm altura. Para obtener el índice de Kubelka Munk se midió la reflectancia a 450, 560 y 685 nm, y se utilizó el software SBRT (Shelf Backing Reflectance Transformation Software), apropiado para pequeñas muestras (Pauletti et al., 1999; Rozycki et al., 2010). Para el sistema CIELAB (parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) se tomaron los datos obtenidos con la celda blanca (Dattatreya y Ranking, 2006) y se calculó la diferencia de color con la ecuación  $dE^*_{ab} = (dL^{*2} + da^{*2} + db^{*2})^{1/2}$ , tomando como estándar o referencia a la muestra a tiempo cero. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

### Análisis Estadístico

El tratamiento estadístico de datos se realizó mediante el método de ANOVA, con  $\alpha \leq 0,05$ , y en el caso de diferencias significativas se realizó la comparación de medias por el método de Tukey, con el programa Infostat/L versión libre, 2011.

## Resultados

En la Figura 1 se muestra la evolución con el tiempo de reacción de la diferencia de color ( $dE^*ab$ ) respecto a la muestra a tiempo cero, para los pH iniciales de estudio.

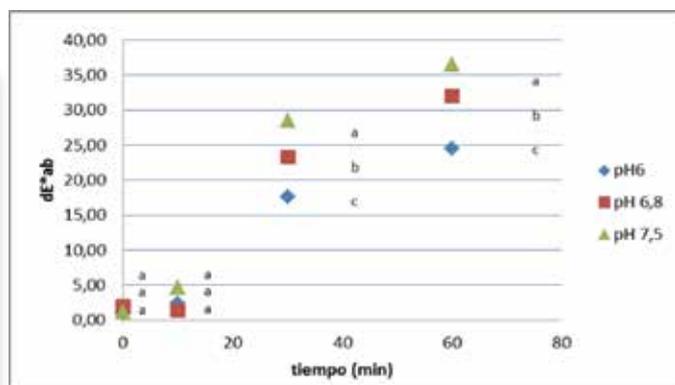


Figura 1. Evolución de  $dE^*ab$  vs. tiempo de tratamiento térmico para los 3 pH iniciales (medias con una letra común no son significativamente diferentes para cada tiempo,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Se observó un rápido aumento de color con el tiempo a partir de la muestra retirada a los 30 minutos; el mayor desarrollo de color se produce a pH inicial 7,5, seguido del pH inicial 6,8 y por último el pH inicial 6.

En la Figura 2 se observa la evolución del color medida con el índice de Kubelka Munk. Ambas funciones del color,  $dE^*ab$  y K/S, presentaron un comportamiento similar, con un periodo de inducción de corta duración seguido de un aumento rápido de los parámetros. El período de inducción puede ser explicado por el hecho de que los compuestos coloreados en las reacciones de pardeamiento no enzimático se desarrollan en las últimas etapas (Nursten, 2005; Ferrer et al., 1999).

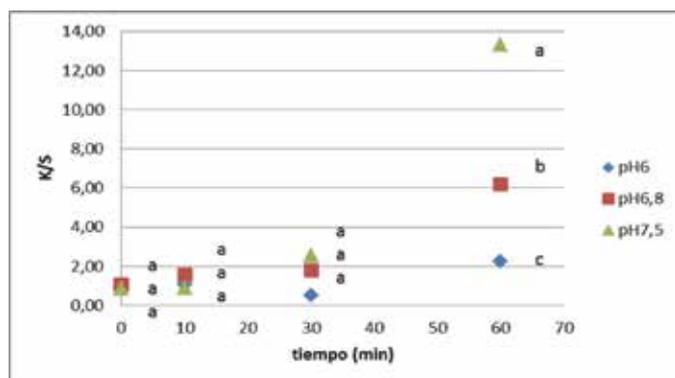


Figura 2. Evolución de K/S vs. tiempo de tratamiento térmico para los 3 pH iniciales (medias con una letra común no son significativamente diferentes para cada tiempo,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Se observó que el K/S, a 30 minutos de calentamiento, tiene un valor cercano al de las primeras etapas de calentamiento, mientras que los valores a 60 minutos fueron mayores a los anteriores; en el caso de  $dE^*ab$  a 30 minutos presentó valores significativamente mayores a los de las primeras etapas y similares a los correspondientes a las etapas finales de calentamiento (60 minutos). Con ambos métodos se pudo observar diferencias significativas en el desarrollo de color entre las diferentes condiciones de pH inicial, que aumentaron a medida que esta variable fue mayor, siendo una influencia muy relevante.

Los pH alcalinos aceleran la reacción de Maillard (Badui, 1990), lo cual fue observado para sistemas acuosos de azúcar-aminoácidos por el aumento de la tasa de pardeamiento (Kato et al., 1969; Wolfrom et al., 1974; Ashoor & Zent, 1984). Petriella et al. (1985) observaron que los valores de energía de activación de la reacción de Maillard varían según el pH. Pauletti et al. (1999) y Rozycki (2003), en estudios de la influencia de parámetros en la cinética del color (utilizando sistemas de composición similar al dulce de leche a partir de leche en polvo, sacarosa y agua destilada), encontraron influencia directa del pH en la cinética. Ambos parámetros, calculados en este trabajo, reflejan apropiadamente los cambios de color y resultarían muy útiles para cuantificarlo incluso a nivel industrial, lo cual permitiría el control de calidad del producto y el diseño adecuado de equipos, principalmente en el método continuo de producción de dulce de leche.

En el análisis de los parámetros del color, con respecto a la luminosidad ( $L^*$ ) se registró con el tiempo de tratamiento térmico valores de  $dL^*$  negativo (Figura 3), lo que significa menor luminosidad o mayor tendencia al negro de la muestra con respecto a la referencia (muestra a tiempo cero).

Con respecto al pH, hay mayor disminución de la luminosidad ( $L^*$ ) a mayor pH inicial.

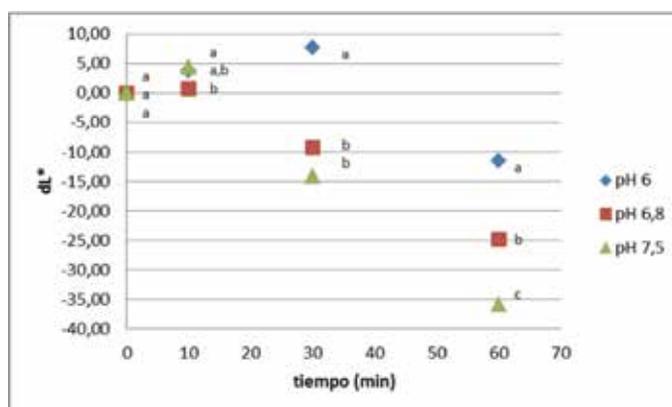


Figura 3. Diferencia de luminosidad vs. tiempo de tratamiento térmico para los 3 pH iniciales (medias con una letra común no son significativamente diferentes para cada tiempo,  $\alpha \leq 0,05$ ).

En cuanto a la evolución del parámetro del color  $a^*$  (Figura 4), se vio un aumento con el tiempo de tratamiento térmico y mayor  $da^*$  (colores más rojos) a mayor pH en las primeras etapas de calentamiento (tiempos menores), sin que se hallaran diferencias significativas en el tiempo final para los tres ensayos.

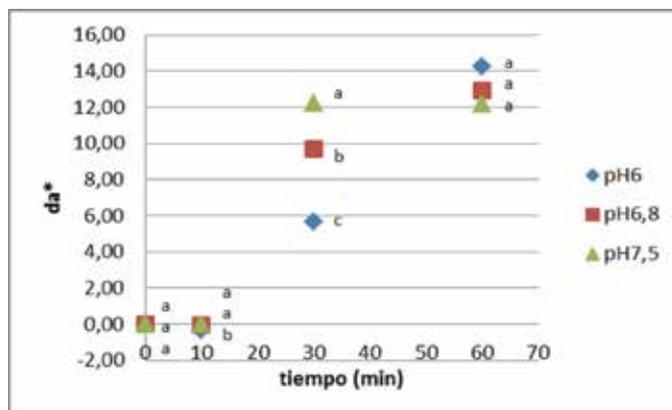


Figura 4. Diferencia del parámetro del color  $a^*$  vs. tiempo de tratamiento térmico para los 3 pH iniciales (medias con una letra común no son significativamente diferentes para cada tiempo,  $\alpha \leq 0,05$ ).

El parámetro del color  $b^*$  (Figura 5) aumentó en el tiempo de tratamiento térmico (colores más amarillos) con valores mayores a mayor pH inicial. Por el contrario, al tiempo final  $db^*$  disminuye (colores menos amarillos) para los pH iniciales 6,8 y 7,5, y es menor a mayor pH inicial.

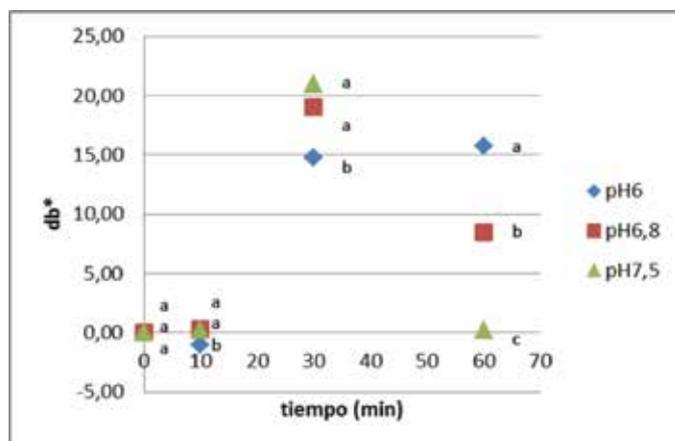


Figura 5. Diferencia del parámetro del color  $b^*$  vs. tiempo de tratamiento térmico para los 3 pH iniciales (medias con una letra común no son significativamente diferentes para cada tiempo,  $\alpha \leq 0,05$ ).

Ambas metodologías, K/S y  $dE^*ab$  permitieron evaluar en forma cuantitativa diferencias de color entre las muestras con distintos tratamientos (pH inicial y tiempo de calentamiento). Con la metodología CIELAB se pueden evaluar, además, las diferencias desde el punto de vista de la cromaticidad ( $a^*$ ,  $b^*$ ) y la luminosidad del color ( $L^*$ ).

El uso de estas metodologías se podría extender a la evaluación del color en muestras respecto a una muestra patrón, lo cual tendría gran aplicación en control de calidad e inclusive como herramienta en desarrollo, estandarización y/o caracterización de este tipo de productos.

## Conclusiones

Las diferencias en los parámetros del color investigados, en función del tiempo de reacción y el pH, permitieron demostrar que los pigmentos coloreados formados en las reacciones de Maillard en las condiciones estudiadas fueron diferentes y aumentaron con el tiempo y el pH.

La tendencia del color durante el calentamiento fue hacia el aumento del componente rojo y del color pardo global, y a la disminución de la luminosidad.

Las diferencias de color respecto al pH y tiempo presentaron cambios en la luminosidad y la cromaticidad ( $a^*$  y  $b^*$ ), que se pudieron observar con ambos parámetros ensayados (K/S y  $dE^*ab$ ).

Los parámetros estudiados, principalmente el índice K/S, serían muy adecuados para el seguimiento de la cinética de desarrollo del color y, por ende, para un control adecuado de la calidad final del producto y el diseño de equipos específicos utilizados en la industria del dulce de leche y de otros productos lácteos concentrados y azucarados.

## Reconocimientos

Por el soporte financiero a PEDECIBA, CSIC y LATU.  
Por la donación del caseinato de sodio a ERESUR S.A.

## Referencias

- ASHOOR, S. H.; ZENT, J. B. Maillard browning in common amino acids and sugars. En: *Journal of Food Science*. 1984, 49:1206-1207.
- BADUI, S. D. *Química de los alimentos*. 3ra ed. México: Addison Wesley Longman de México, 1999.
- BUERA, M. del P.; HOUGH, G.; MARTINEZ, E.; RESNIK, S. Colorimetric, spectrophotometric and sensory color measurements of a dairy product: dulce de leche. En: *Anales de la Asociación de Química Argentina*. 1990, 78(5):291-295.
- CALVO, C.; DURÁN, L. Propiedades físicas II. Ópticas y color. En: AGUILERA, J.M. *Temas en tecnología de alimentos*. Vol 1. México: Instituto Politécnico Nacional, 1997.
- CASTAÑEDA, R.; MUSSET, G.; CASTELLS, L.; ARANIBAR, G.; MURPHY, M.; RODRÍGUEZ, G. Dulce de leche argentino variedad tradicional. Su caracterización. En: INTI. *5ta Jornadas de Desarrollo e Innovación*. Buenos Aires: INTI, 2004.
- DATTATREYA, A.; RANKIN, S.A. Moderately acidic pH potentiates browning of sweet whey powder. En: *International Dairy Journal*. 2006, 16: 822-828.
- DAVIES, C.G.A.; LABUZA, T.P. *The Maillard reaction application to confectionary products*. Minnesota: University of Minnesota. Department of Food Science and Nutrition, 2003. pp. 1-33.
- DELGADO, T. *Informe de tesis: contenido en furosina, lactulosa y  $\beta$ -lactoglobulina como indicadores de calidad en leche líquida y en polvo*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Instituto de Fermentaciones Industriales, 1993.
- DEMIATE, I.M.; KONKE, F.E.; PEDROSO, R.A. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso, composição química. En: *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2001, 21(1):108-114.
- FAYLE, S.E.; GERARD, J.A. *La reacción de Maillard*. Zaragoza: Acribia, 2005.
- FERRER, E.; ALEGRÍA, A.; FARRÉ, R.; ABELLÁN, P.; ROMERO, F. Indicadores del deterioro de la calidad proteica y del valor nutritivo de la leche. En: *Food Science and Technology International*. 1999, 5(6): 447-461.
- HAYASHI, T.; NAMIKI, M. Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. En: *Agricultural and Biological Chemistry*. 1986, 50(8):1965-1970.
- HAYASHI, T.; NAMIKI, M. Role of sugar fragmentation in the Maillard reaction. En: FUJIMAKI, M.; NAMIKI, M.; KATO, H. Susono. *Amino-Carbonyl reactions in food and biological systems*. Tokio: Elsevier, 1986.
- HOUGH, G.; CONTARINI, A.; MORO O. Análisis sensorial de preferencia en dulce de leche. En: *La Alimentación Latinoamericana*. 1986, 20:72-74.
- HOUGH, G.; BUERA, M.P.; MARTINEZ, E.; RESNIK, S. Effect of composition on nonenzymatic browning rate in Dulce de Leche like systems. En: *An. Asoc. Quim. Arg.* 1991, 79:31-34.
- HOUGH, G.; BRATCHELL, N.; WAKELING, I. Consumer preference of dulce de leche among students in the United Kingdom. En: *J. Sensory Studies*. 1992, 7:119-132.
- JIMÉNEZ, A.R.; HERNÁNDEZ, G.E.; VILLANOVA B.G. Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. En: *Food Chemistry*. 2003, 83(2):219-225.
- KATO, H.; YAMAMOTO, M.; FUJIMAKI, M. Mechanisms of browning degradation of D-fructose in special comparison with Dglucose-glycine reaction. En: *Agricultural and Biological Chemistry*. 1969, 33:939.
- MALEC, L.S.; LLOSA, R.A.; VIGO, M.S. Sugar formulation effect on available lysine content of dulce de leche. En: *Journal of Dairy Research*. 1999, 66(2):335-339.
- NURSTEN, Harry. *The maillard reaction chemistry, biochemistry and implications*. London: The Royal Society of Chemistry, 2005.
- PAULETTI, M.S.; MATTA, E.J.; ROZYCKI, S. Kinetics of heat-induced browning in concentrated milk with sucrose as affected by pH and temperature. En: *Food Science and Technology International*. 1999, 5(5):407-413.
- PAULETTI, M.S. Fabricación de Dulce de Leche. En: PÉREZ ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ LÓPEZ, J.; SAYAS BARBERÁS, E. *Industrialización de productos de origen animal*. Alicante: Universidad Manuel Hernández, 2001. pp. 255-280. ISBN 84-95315-65-3.

- PETRIELLA, C.; RESNIK, S.L.; LOZANO, R.D.; CHIRIFE, J. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to nonenzymatic browning. En: *Journal of Food Science*. 1985, 50(3):622-626.
  - ROZYCKI, S.D. Browning kinetics in concentrated dairy systems: comparative analysis of models. En: *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2003, 4(2):95-102.
  - ROZYCKI, S. D.; PAULETTI, M. S.; COSTA, S. C.; PIAGENTINI, A. M.; BUERA, M. P. The kinetics of colour and fluorescence development in concentrated milk systems. En: *International Dairy Journal*. 2007, 17(8):907-915.
  - ROZYCKI, S.D.; BUERA, M.P.; PAULETTI, M.S. Heat-induced changes in dairy products containing sucrose. En: *Food Chemistry*. 2010, (118):67-73.
  - TAMIME A. Y. *Dairy powders and concentrated milk products*. Singapur: Wiley and Sons, 2009.
  - WROLSTAD, R.E.; SMITH, D.E. Color analysis. En: NIELSEN, S.S. *Food analysis*. 4a ed. New York: Springer, 2010.
  - WOLFROM, M. L.; KASHIMURA, N.; HORTON, D. Factors affecting the Maillard browning reaction between sugars and amino acids. Studies on the non-enzymatic browning of dehydrated orange juice. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1974, 22:796-800.
-

# Andamiajes tridimensionales tipo esponjas basados en bioconjugados colágeno-quitosano como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos

## Three-dimensional scaffolds Sponges type based in bioconjugates collagen-chitosan as a potential biomaterial for tissue engineering applications

Ramos, Mikol <sup>(1)</sup>, Zamora, Vanessa <sup>(1)</sup>, Rodríguez, Gerardo <sup>(1)</sup>, Sibaja, María <sup>(1)</sup>, Madrigal-Carballo, Sergio <sup>(1)</sup>, Lopretti, Mary <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup> Escuela de Química, Universidad Nacional, 86-3000 Heredia, Costa Rica - <sup>(2)</sup> Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay -

<sup>(3)</sup> Departamento de Proyectos de Bioprocesos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

Contacto: sergio-poliuna@gmail.com

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 14/12/2012

### Resumen

Nuestro trabajo utiliza quitosano aislado de líneas de desecho de la producción de camarón nativas y colágeno aislado de desechos de la piel de tilapia de cultivo; con estos biopolímeros se sintetizaron materiales compuestos a partir de la mezcla de quitosano y colágeno (80:20 v/v). Los composites de colágeno-quitosano fueron formulados como andamiajes en 3D similares a una esponja, aplicando tecnologías previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación basadas en evaporación de solvente mediante liofilización. Los andamiajes de colágeno-quitosano fueron caracterizados de acuerdo con sus propiedades térmicas (análisis termogravimétrico) y morfología (microscopía de barrido electrónico). Finalmente, se estudió el efecto de la adición de un agente porógeno en las propiedades de absorción de agua y la morfología de los andamiajes tridimensionales. Palabras clave: Quitosano, colágeno, andamiajes 3D, ingeniería de tejidos.

### Abstract

We isolated chitosan from native shrimp waste streams and collagen from tilapia skin waste; composite materials were successfully obtained by mixing chitosan with collagen (80:20 v/v). Chitosan-collagen composites were formulated as a 3D sponge-like scaffold, applying previously developed methodologies involving solvent casting and freeze drying. Chitosan-collagen 3D scaffolds were characterized according to its thermal behavior (TG) and morphology (SEM). Finally, we study the effect of the addition of a porogenic agent on the water absorption capacity and morphology of the 3D scaffolds.

Keywords: Chitosan, collagen, scaffolds 3D, engineering tissue.

## Introducción

El colágeno es la matriz extracelular (MEC) más abundante en la naturaleza. Tejidos como dermis y andamiajes fabricados a partir de colágeno han presentado una baja antigenicidad, biodegradabilidad y una biocompatibilidad (propiedades hemostáticas y ligando de células) muy superior en comparación con sistemas fabricados a partir de polímeros sintéticos, como el poliácido láctico (PAL), poliácido glicólico (PAG) y el polietilentereftalato (PET) (Lee et al., 2001; Chen et al., 2005; Pachence, 1996). En su función como andamiaje, los materiales basados en colágeno, en su forma de esponja, han sido considerados los andamiajes tridimensionales con mejores propiedades para la regeneración dérmica (Berthod et al., 1994; Berthod et al., 1993; Park et al., 2003; Ojeh et al., 2001).

Recientemente se ha prestado mucha atención a la utilización del quitosano en aplicaciones biomédicas, por ejemplo, en la cicatrización de heridas, como material para recubrimiento de heridas o quemaduras, agente mucoadhesivo y hemostático, membrana para hemodiálisis y

sistema para transporte de sustancias activas (Vasudev et al., 1997; Chandy y Sharma, 1990 y 1993; Hirano, 1996; Muzarelli, 1993; Patel y Amiji, 1996). El quitosano ha sido utilizado para promover la formación de MEC en terapias regenerativas de tejidos (Yaylaoglu et al., 1990; Hollinger y Battison, 1986; Cima et al., 1991; Laurencin et al., 1996; Muzzarelli et al., 1993; Mao et al., 2003). La compatibilidad tisular superior que exhibe el quitosano puede atribuirse en un principio a su similitud estructural con el glucosaminoglicano en la MEC (Hollinger y Battison, 1986; Cima et al., 1991).

El quitosano es un copolímero lineal de  $\beta$  (Lee et al., 2001; Chen et al., 2005; Pachence et al., 1996; Berthod et al., 1994) unido a 2-acetamido-2-deoxi-b-D-glucopiranosas y 2-amino-2-deoxi-b-D-glicopiranosas (Figura 1). Es fácilmente obtenido por deacetilación de quitina, un polisacárido ampliamente distribuido en la naturaleza (e.g. crustáceos, insectos y ciertos hongos) (Chandy y Sharma, 1990 y 1993; Hirano, 1996). El quitosano ha sido reportado como un polímero natural biocompatible, bioabsorbible y particularmente es considerado un excelente acelerador de los procesos de cicatrización celular. Adicionalmente, se encontró que los oligómeros de quitosano

producidos por la degradación enzimática por parte de enzimas tisulares resultan ser beneficiosos para la regeneración de los tejidos en las secciones cicatrizadas de las heridas.

Además, en contraste con la rápida degradación del colágeno, el quitosano es lentamente biodegradado *in vitro*, y se ha hallado que las esponjas de colágeno incorporadas con quitosano mejoran la resistencia mecánica (Yang et al., 2004). Estudios previos mostraron que las esponjas quitosano-colágeno fueron favorables para el crecimiento de fibroblastos, sin efectos inflamatorios o reacciones alérgicas presentadas después de la implantación (Pianigiani, 1999; Zamora, 2008).

Este trabajo utiliza quitosano nativo aislado de líneas de desecho de la producción de camarón y colágeno aislado de desechos de la piel de tilapia de cultivo; con estos biopolímeros se sintetizaron materiales compuestos a partir de la mezcla de colágeno y quitosano a diferentes proporciones molares. Los composites de colágeno-quitosano fueron formulados como andamiajes en 3D similares a una esponja, aplicando tecnologías previamente desarrolladas en nuestro grupo de investigación, basadas en evaporación de solvente mediante liofilización. Los andamiajes de colágeno-quitosano fueron caracterizados de acuerdo con sus propiedades térmicas (análisis termogravimétrico) y morfología (microscopía de barrido electrónico). Finalmente, se estudió el efecto de la adición de un agente porógeno en las propiedades de absorción de agua y la morfología de los andamiajes tridimensionales.

## Materiales y Métodos

### Materiales

Todos los reactivos fueron grado analítico o superior (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Quitosano grado farmacéutico (aislado de conchas de camarón), con 95 % de desacetilación, calculado empleando la técnica de <sup>1</sup>HMRN, Pm 185 kDa (calculado con la técnica de viscosidad específica) y colágeno (aislado de la piel de tilapia, *Oreochromis sp*), y gentilmente aportados por el Laboratorio de Investigación de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) de Costa Rica.

### Preparación del andamio

Una disolución de quitosano (2 %, m/v) (Sigma, USA) fue lentamente adicionada (por gotas) a una suspensión de colágeno (5 %, m/v) para formar una mezcla compuesta de quitosano-colágeno, en una proporción final de 80:20, v/v. Después de eliminar las burbujas de aire con vacío, la mezcla colágeno-quitosano fue colocada dentro de moldes de vidrio liofilizados hasta obtener una matriz porosa de colágeno y quitosano.

### Análisis térmico

Las propiedades térmicas de los andamiajes 3D elaborados a partir de los bioconjugados quitosano-colágeno se evaluaron mediante termogravimetría (TG) en un analizador termogravimétrico TA-Q50, en atmósfera de nitrógeno y un intervalo de temperaturas de 20 a 600 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

### Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua del andamio quitosano-colágeno fue determinada sumergiendo el andamio en un buffer salino de fosfato

7.4 (PBS), a temperatura ambiente. Un peso conocido del andamio quitosano-colágeno (200 mg) fue colocado en el medio por un periodo de tiempo requerido. El peso húmedo del andamio fue determinado primero secando la membrana con papel de filtro para remover el agua absorbida de la superficie, luego pesado inmediatamente en una balanza electrónica. El porcentaje de agua absorbido por el andamio de quitosano-colágeno en el medio es entonces calculado empleando la siguiente fórmula:

$$E_{sw} = \left[ \frac{W_e - W_0}{W_0} \right] \times 100$$

Donde  $E_{sw}$  es el porcentaje de agua absorbido del andamio al equilibrio,  $W_e$  denota el peso del andamio al equilibrio con el agua absorbida y  $W_0$  es el peso inicial del andamio. Cada experimento fue repetido tres veces y el valor promedio fue tomado como el porcentaje de agua absorbida.

### Análisis morfológico de superficie

La microestructura del andamio quitosano-colágeno (80:20, v/v) fue examinada sobre un microscopio de electrón explorador (SEM) a una magnificación de 20kx. El ángulo de inclinación de cada muestra fue de 30 grados.

### Introducción de agentes de formación de poro en los andamiajes tridimensionales

Con el objetivo de incrementar la porosidad de las matrices 3D bioconjugadas y potenciar sus propiedades para el crecimiento y la proliferación de células epiteliales sobre el andamio, se evaluó el efecto de introducción de agentes porogénicos en las matrices biopoliméricas compuestas. Para este efecto se mezclaron las disoluciones de bioconjugados preparadas con disoluciones de agentes formadores de poro (sacarosa, cloruro de sodio y glucosa) en concentraciones de 0,1 y 0,5 % m/v, respectivamente. Una vez mezclada la mezcla de bioconjugado con el agente porogénico, se prepararon los andamiajes 3D según la metodología descrita anteriormente y se procedió a su caracterización física y química.

## Resultados y Discusión

### Caracterización química y física del bioconjugado quitosano-polifenol

El quitosano se une físicamente al colágeno por medio de interacciones de puente de hidrógeno, debido a la disponibilidad del grupo amino y de los grupos hidroxilo. Esta interacción permite el desarrollo de biomateriales estables, tales como biomembranas de nanopartículas, bioespumas y andamios de tejido.

La Figura 1 presenta con fines ilustrativos una imagen del andamio de quitosano-colágeno tipo-esponja 3D.

El análisis térmico del andamio de quitosano-colágeno 3D por termogravimetría (TG) muestra un comportamiento intermedio para el biocompuesto quitosano-colágeno entre ambos de sus constituyentes en forma pura. La Figura 2 incluye el termograma TG del andamio modelo analizado.



Figura 1. Imagen ilustrativa que representa un andamiaje tridimensional (3D) de quitosano-colágeno (80:20, v/v) en su sección transversal (arriba) y superficial (abajo).

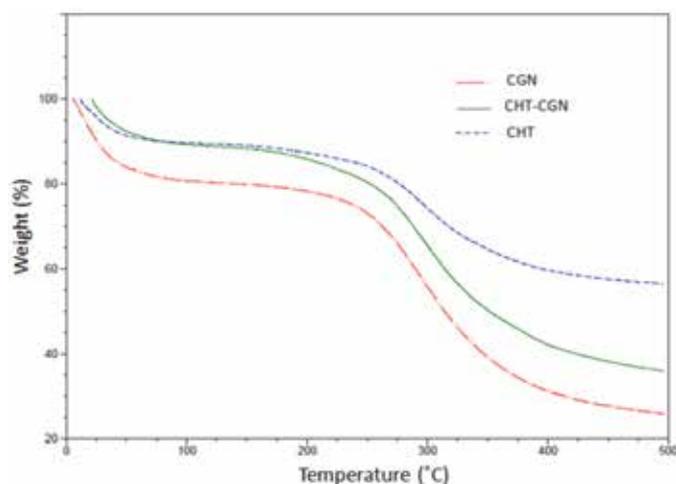


Figura 2. Termogramas por termogravimetría (TG) de andamiajes 3D de colágeno-quitosano seleccionados. Quitosano (CHT), colágeno (CGN) y andamiaje 3D quitosano-colágeno 80:20, v/v (CHT-CGN).

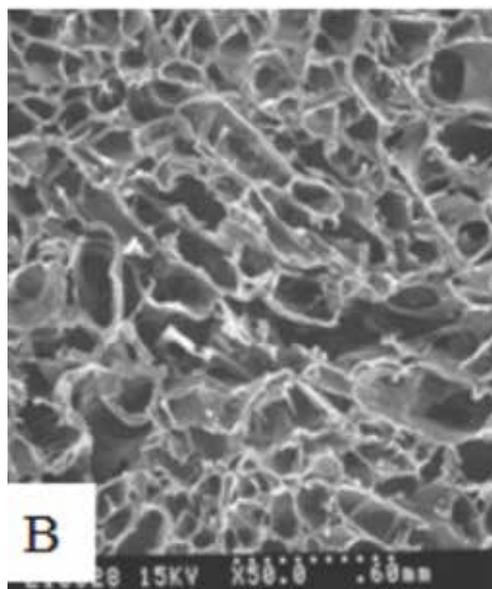
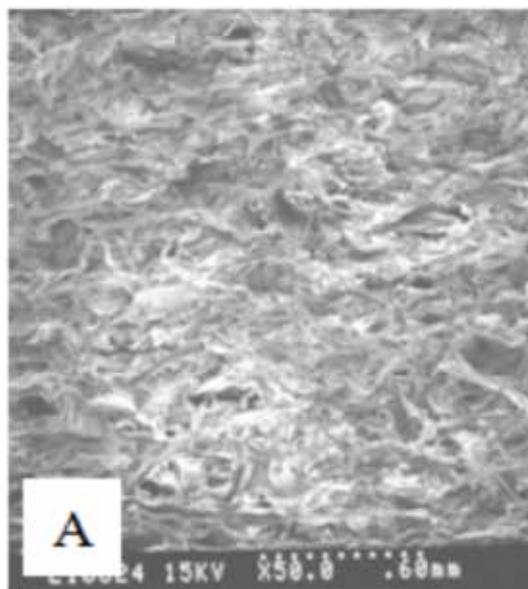


Figura 3. Micrografías SEM para andamiajes obtenidos a partir del bioconjugado quitosano-colágeno 80:20 v/v, sin proceso de liofilización (A) y posterior al proceso de liofilización (B).

### Análisis de morfología superficial

Las micrografías obtenidas por SEM muestran un cambio en la morfología superficial del sistema bioconjugado antes y después del proceso de liofilización. En la Figura 3 se representan las imágenes superficiales de un sistema bioconjugado sin liofilizar y luego del proceso de liofilización.

En la Figura 3B resulta sencillo percibir el efecto de la técnica de liofilización en la formación de poros en el interior del andamiaje, lo que le confiere las propiedades físicas similares a una esponja.

## Efecto de la adición de un agente porógeno en las propiedades físicas de los andamiajes 3D de colágeno-quitosano

La prueba de absorción de humedad es una técnica que da una idea de la capacidad de un soporte para absorber humedad, así como de la estabilidad durante su exposición a parámetros controlados. La habilidad que posea para retener cierto porcentaje de agua estará relacionada con la morfología de los apósitos biológicos. La prueba de absorción de humedad para los respectivos andamiajes 3D depende directamente de la naturaleza de los biopolímeros presentes en los andamiajes, así como de la proporción empleada. Si bien es acertado que las proporciones empleadas de los biopolímeros para la elaboración de los andamiajes es la recomendada por Zamora (2008), los mismos se mantienen constantes para todos los biocomposites como parte de un proceso de homologación en los respectivos andamiajes. Esta proporción corresponde a un 80 % de quitosano y a un 20 % de colágeno, en volumen, por lo que las variables presentadas por estos andamiajes se deben básicamente a la morfología, la cual se atribuye al agente porógeno utilizado para dicha matriz. En la Figura 4 se observa el comportamiento de los andamiajes durante el ensayo de absorción de agua.



Figura 4. Representación de la capacidad de absorción de agua de los andamiajes 3D de quitosano-colágeno (80:20 v/v).

En la Figura 5 se presenta la gran similitud por debajo del 70 % de humedad relativa para todos los diferentes andamiajes 3D; a partir del 85 % de humedad relativa se evidencia una diferencia en los andamiajes elaborados al 0,1 % m/v y 0,5 % m/v con NaCl y, de igual forma, a humedades relativas del 100 % ambos andamiajes 3D presentan las máximas absorciones de humedad.

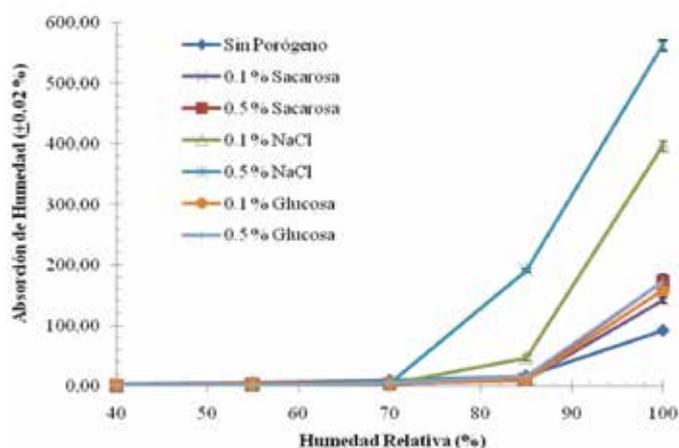


Figura 5. Efecto de la adición de agente porógeno en la capacidad de absorción de agua de los andamiajes quitosano-colágeno (20:80, v/v).

Se puede observar un ascenso para la absorción de humedad en cada uno de los andamiajes que emplean concentraciones del 0,5 % m/v, según los diversos agentes porógenos. Variables morfológicas como la densidad y tamaño de poro son prácticamente el efecto que produce diferencias en cada uno de los andamiajes 3D.

La absorción de humedad que presenta cada uno de los biocomposites altera significativamente las dimensiones de los soportes 3D, por lo que es importante conocer las condiciones de almacenamiento o preservación de los mismos. Las matrices sometidas a atmósferas controladas con condiciones superiores al 85 % de humedad relativa se alteran física y morfológicamente. El análisis de absorción de humedad no produce cambios importantes en los andamiajes como los presenta el análisis de hinchamiento. Un soporte 3D al 0,1 % m/v con sacarosa tenía originalmente dimensiones promedio de 0,7x0,7x0,25 mm, y posterior al análisis de absorción de humedad las dimensiones promedio variaron levemente a 0,8x0,7x0,30 mm, y a 1,1x1,0x0,43 mm después de un análisis de hinchamiento.

La elaboración de andamiajes 3D a partir de diferentes agentes porógenos presenta variedades morfológicas significativas y se atribuyen a efectos positivos en la absorción de humedad a través del soporte; los andamiajes al 0,1 % m/v y 0,5 % m/v con NaCl son los que presentaron los resultados más importantes como potenciales apósitos biológicos dentro del área de ingeniería de tejidos. Sin embargo, no se descarta la posible evaluación de un crecimiento celular en los demás andamiajes 3D.

El estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM) se llevó a cabo en todos los andamiajes 3D para conocer las variables morfológicas que determinan en gran medida el comportamiento de la matriz en los diferentes análisis realizados. Variables como el tamaño del poro, las interconexiones entre poros, la densidad de poros, así como la naturaleza del porógeno y la naturaleza química de los biomateriales empleados para la confección del soporte, son datos de relativa importancia.

Todos los andamiajes 3D tuvieron diferencias significativas en su morfología (Figura 6). Un soporte 3D elaborado a partir de 0,1 % m/v con NaCl presentó una pobre densidad del poro, en donde prácticamente no se definen claramente la presencia de poros y las interconexiones entre éstos. También presentaron una forma muy heterogénea, irregular y de apariencia rugosa a nivel superficial. Si bien no se observa una buena porosidad, el tamaño de poro reportado es de 136  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +34  $\mu\text{m}$ . Un soporte 3D creado con NaCl como agente porógeno al 0,5 % m/v presentó una alta densidad de poro, con interconexiones entre poros definidas. Los poros en esta matriz se observan de forma irregular a lo largo de toda la matriz con un tamaño de poro reportado de 272  $\mu\text{m}$  y una desviación estándar de +60  $\mu\text{m}$ .

El efecto que provoca una mayor concentración de este agente porógeno (NaCl) en el soporte es significativo. La diferencia respecto a la anisotropía se atribuye a la repulsión que proveen altas concentraciones de NaCl para sistemas poliméricos, en donde la naturaleza iónica del agente porógeno provee un efecto de repulsión entre las cadenas poliméricas resultado de la porosidad en la matriz. Al emplear bajas concentraciones de NaCl, hay un efecto contrario que podría deberse a las interacciones iónicas entre biopolímero/agente porógeno, por una pobre separación entre las cadenas poliméricas, atribuido a la pobre densidad de poros en la matriz.

Para un soporte 3D en el que se emplea sacarosa como agente porógeno al 0,1 % m/v, se observó una alta densidad de poro y una clara interconexión entre poros. Sin embargo, los tamaños de poro son muy heterogéneos y de forma muy irregular a lo largo de toda la matriz, y el tamaño del poro reportado para este soporte es de 215  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +36  $\mu\text{m}$ . No obstante, un soporte 3D creado a partir de 0,5 % m/v con sacarosa presentó una alta densidad de poro, con claras interconexiones entre ellos. De igual forma que en el soporte creado con bajas concentraciones del agente porógeno de la misma naturaleza, se observó una irregularidad y heterogeneidad entre poros a lo largo de la matriz, y el tamaño del poro reportado para este soporte es de 226  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +65  $\mu\text{m}$ .

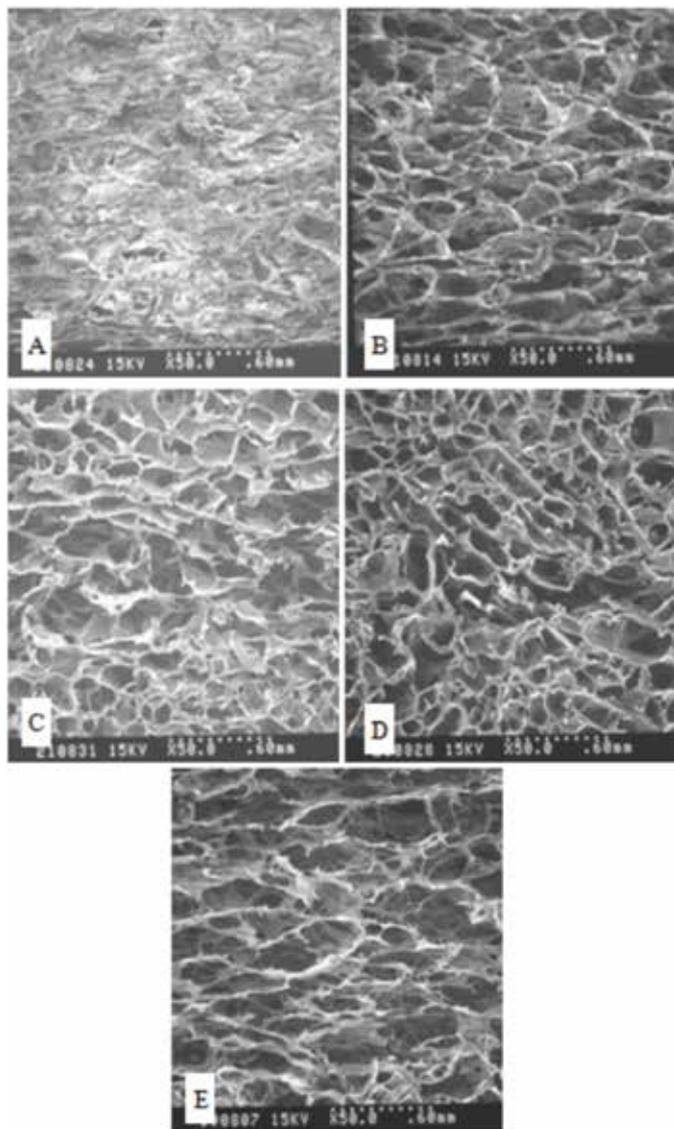


Figura 6. Efecto de la adición de agentes porógenos en la morfología superficial de andamiajes 3D colágeno-quitosano 20:80 visualizados por SEM.

Para un soporte 3D en el que se emplea glucosa como agente porógeno al 0,1 % m/v se observó una alta densidad de poros, así como buena interconexión entre cada poro, la cual se presenta de forma clara y de apariencia rígida; el tamaño de poro reportado para este soporte es de 211  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +35  $\mu\text{m}$ . El poro se observa de manera constante y heterogénea en todas sus dimensiones como resultado de una buena anisotropía en la matriz. Por otra parte, un soporte 3D elaborado a partir de 0,5 % m/v con glucosa presentó de igual forma una alta densidad de poro, con diferencias en las interconexiones porosas, ya que algunas son más definidas que otras. El tamaño de poro reportado para este soporte es de 239  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +51  $\mu\text{m}$ , y se observa de manera más homogénea y constante a lo largo de todo el soporte. Sin embargo, posee una apariencia irregular, lo cual significa que no es esférico.

Finalmente, un soporte 3D creado sin el uso de un agente porógeno presentó alta densidad de poro, con interconexiones entre poros en forma hilada. Este efecto se atribuye a la naturaleza fibrosa de los biopolímeros empleados en la elaboración de la matriz. Los tamaños de poro son muy heterogéneos y de forma irregular y el tamaño del poro reportado para este soporte es de 264  $\mu\text{m}$ , con una desviación estándar de +113  $\mu\text{m}$ . Con este soporte se concluye que el empleo de un agente porógeno en la matriz produce diferentes efectos morfológicos atribuidos a las interacciones físicas en un sistema polimérico como este, las cuales van a depender directamente de la naturaleza química del porógeno.

Andamiajes 3D elaborados con el uso de glucosa y sacarosa presentaron similitudes en cuanto al tamaño del poro en ambas concentraciones (0,1 y 0,5 % m/v). No obstante, el comportamiento presentado en los diferentes estudios de hinchamiento, absorción de humedad, análisis térmicos y análisis de determinación del perfil de grosores son aportes clave para descartar el uso de glucosa como agente porógeno en cualquiera de las concentraciones realizadas en este estudio.

Los parámetros que se reportan a partir del estudio de microscopía postulan los andamiajes 3D elaborados a partir de colágeno y quitosano como sustitutos dérmicos promisorios para llevar a cabo crecimientos celulares. El tamaño de poro es un requisito fundamental que potencializa un biocomposite. Cabe destacar que el proceso de obtención propuesto en este trabajo de investigación permitió obtener andamiajes 3D con condiciones y parámetros aptos dentro de lo propuesto en la literatura (Nazarov et al., 2004; Cao et al., 2006), en donde se plantean rangos fundamentales para el tamaño de poro con un mínimo de 100  $\mu\text{m}$  y un máximo de 300  $\mu\text{m}$ , parámetros obtenidos por este proceso de fabricación de andamiajes 3D.

## Conclusiones

Los andamiajes porosos 3D, similares a una esponja, preparados a partir de biocompositos quitosano-colágeno (80:20, v/v) para aplicaciones en ingeniería de tejidos han sido optimizados exitosamente en cuanto a sus propiedades térmicas (TG) y morfológicas (SEM), y se estudió el efecto de la adición de diferentes agentes formadores de poro en la capacidad de absorción de agua y morfología superficial de los andamiajes modelo. Actualmente nos encontramos iniciando ensayos de viabilidad para crecimiento de líneas celulares sobre los andamiajes 3D desarrollados utilizando modelos *in vitro* con células epiteliales. Los resultados obtenidos hasta el momento evidencian que los andamiajes 3D de colágeno-quitosano pueden constituir un sistema modelo apropiado para el crecimiento celular y con un gran potencial para su aplicación en el desarrollo de piel artificial mediante las herramientas de la ingeniería de tejidos. De forma general, las investigaciones presentadas en este trabajo permiten concluir que los desechos de tilapia y de camarón pueden considerarse como fuentes apropiadas para la obtención de derivados de mayor valor agregado con potencial innovador para aplicaciones biomédicas.

## Referencias

- BERTHOD, F.; SAINTIGNY, G.; CHRETIEN, F.; HAYEK, D.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Optimization of thickness, pore size and mechanical properties of a biomaterial designed for deep burn coverage. En: *Clin. Mater.* 1994, 15:259-65.
- BERTHOD, F.; HAYEK, D.; DAMOUR, O.; COLLOMBEL, C. Collagen synthesis by human fibroblasts cultured within a collagen sponge. En: *Biomaterials.* 1993, 14:749-54.
- CAO, Y.; CROLL, T.I.; LEES, J.G.; TUCH, B.E.; COOPER-WHITE, J.J. Scaffolds, stem cells and tissue engineering: A potent combination. En: *Chem. Inform.* 2006, 37:15-21.
- CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicillin En: *Biomaterials.* 1993, 14:939-944.
- CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan: as a biomaterial. En: *Biomater. Artif. Cell Artif. Org.* 1990, 18:1-24.
- CHEN, G.; SATO, T.; OHGUSHI, H.; USHIDA, T.; TATEISHI, T.; TANAKA, J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. En: *Biomaterials.* 2005, 26:2559-66.
- CIMA, L.G.; VACANTI, J.P.; INGBER, D.; MOONEY, D.; LANGER, R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substitutes. En: *J. Biomech. Eng.* 1991, 113:143-151.
- HIRANO, S. Chitin biotechnology applications. En: *Biotechnol Annu. Rev.* 1996, 2:237-258.
- HOLLINGER, J.O.; BATTISON, G.C. Biodegradable bone repair materials: synthetic polymers and ceramics. En: *Clin. Orthop.* 1986, 207:290-305.
- LAURENCIN, C.T.; EL-AMIN, S.F.; IBIM, S.E.; WILLOUGH, D.A.; ATTAWIA, M.; ALLOCK, H.R. AMBROCIO, A.A. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. En: *J. Biomed. Mater. Res.* 1996, 30:133-138.
- LEE, CH.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. En: *Int. J. Pharm.* 2001, 221:1-22.
- MA, J.B.; WANG, H.J.; HE, B.L.; CHEN, J.T. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. En: *Biomaterials.* 2001, 22:331-6.
- MAO, J.; ZHAO, L.; YAO, K.; SHANG, Q.; YANG, G.; CAO, Y. Study of novel chitosan-gelatin artificial skin in vitro. En: *J Biomed Mater Res A.* 2003, 64:301-8.
- MUZARELLI, R.A.A. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. En: *Carbohydr. Polym.* 1993 20:7-16.
- MUZZARELLI, R.A.A.; ZUCCHINI, C.; ILARI, P.; PUGNALONI, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. En: *Biomaterials.* 1993, 14:925-929.
- NAZAROV, R.; JIN, H.J.; KAPLAN, D.L. Porous 3D scaffolds from regenerated silk fibroin. En: *Biomacromolecules.* 2004, 5:718-726.
- OJEH, N.O.; FRAME, J.D.; NAVSARIA, H.A. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. En: *Tissue Eng.* 2001, 7:457-72.
- OKAMOTO, Y.; SHIBAZAKI, K.; MINAMI, S.; MATSUHASHI, A.; TANIOKA, S.; SHIGEMASA, Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. En: *J Vet Med Sci.* 1995, 57:851-4.
- PACHENCE, J.M. Collagen-based devices for soft tissue repair. En: *J Biomed Mater Res.* 1996, 33:35-40.
- PARK, S.N.; LEE, H.J.; LEE, K.H.; SUH, H. Biological characterization of EDC crosslinked collagen-hyaluronic acid matrix in dermal tissue restoration. En: *Biomaterials.* 2003, 24:1631-41.
- PATEL, V.R.; AMIJI, M.M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. En: *Pharm. Res.* 1996, 13:588-593.
- PIANIGIANI, E.; ANDREASSI, A.; TADDEUCCI, P.; ALESSANDRINI, C.; FIMIANI, M. ANDREASSI, L. A new model for studying differentiation and growth of epidermal cultures on hyaluronan-based carrier. En: *Biomaterials.* 1999, 20:1689-94.
- VASUDEV, S.C.; CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Development of chitosan-polyethylene vinyl acetate co-matrix: controlled release of aspirin-heparin for preventing cardiovascular thrombosis. En: *Biomaterials.* 1997, 18:375-381.
- YANG, Y.; ZHOU, Y.; TAN, W.S. Effect of additives on collagen sponges for bioactive artificial skin. En: *J Funct Polym.* 2004, 17:396-400.
- YAYLAOGLU, M.B.; KORKUSUZ, P.; ORS, U.; KORKUSUZ, F.; HASIRCI, V. Development of calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. En: *Biomaterials.* 1999, 20:711-719.
- YOU, Y.; PARK, W.H.; KO, B.M.; MIN, B.M. Effects of PVA sponge containing chitoooligosaccharide in the early stage of wound healing. En: *J Mater Sci Mater Med.* 2004, 15:297-301.
- ZAMORA, V. Elaboración de apósitos biológicos a partir de colágeno extraído de pieles de tilapia. Heredia: Universidad Nacional de Costa Rica, 2008. (Tesis de grado).

# Aplicación de la técnica de PCR en la detección de *Ralstonia solanacearum* en campos paperos

## PCR applied to the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato fields

Sanabria, Analía <sup>(1)</sup>, Siri, María Inés <sup>(1)</sup>, Cecchetto, Gianna <sup>(2)</sup>, Pianzola, María Julia <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

<sup>(2)</sup> Microbiología, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: mpianzzo@fq.edu.uy

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 1/10/2012

### Resumen

La marchera de la papa causada por *Ralstonia solanacearum* es una amenaza permanente para el cultivo con consecuencias devastadoras en condiciones predisponentes. La incidencia de esta enfermedad en Uruguay es variable; desde la década de 1970 se registran brotes agudos periódicos difíciles de prevenir y controlar. Se ha detectado a *R. solanacearum* en todas las regiones de producción, lo que dificulta el mantenimiento de áreas libres de patógeno y la continuidad del cultivo. Dado que no existen agentes químicos efectivos, las estrategias de control apuntan a la prevención, recomendando la rotación de cultivos, la desinfección de herramientas y el uso de semilla certificada libre del patógeno. En este trabajo se optimizó la detección molecular de *R. solanacearum* en suelo mediante PCR con el objetivo de conocer la persistencia del patógeno en el campo. El método se aplicó al análisis de cuatro campos con diferentes antecedentes de marchera, y se demostró que el patógeno es capaz de permanecer viable por más de 10 años. También se determinaron las ventajas y limitaciones de esta metodología en su aplicación a muestras complejas. Estos resultados constituyen un importante aporte que genera conocimiento que permitirá a los productores delinear mejores estrategias para el manejo de la enfermedad al momento de planificar los cultivos.

Palabras clave: Marchera, *Solanum tuberosum*, persistencia.

### Abstract

Bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*, is a permanent threat for crops and under favorable conditions its consequences are devastating. The incidence of the disease is variable in Uruguay; since the seventies there have been several hard to prevent and control episodes. *R. solanacearum* has been detected in all the productive areas. It is a challenge to maintain continuous production and fields free from the pathogen. Since no effective chemistry agents against *R. solanacearum* exist, the available pest control strategies are crop rotation, disinfection of tools and use of certificated pathogen-free seed potato. In this work the detection of *R. solanacearum* in soil was optimized using PCR to identify how long the pathogen persists. The strategy was applied to four potato fields with different backgrounds, showing that the pathogen is able to stay viable for more than 10 years. The advantages and limitations of this method on complex samples were determined. These results help potato producers improve pest control management of the crop.

Keywords: Bacterial wilt, *Solanum tuberosum*, persistence.

## Introducción

En 1896, Erwin Frink Smith estableció a *Ralstonia solanacearum* como el agente causal del marchitamiento bacteriano de la papa, el tomate y la berenjena. Este microorganismo está presente en todos los continentes y tiene la capacidad de enfermar a una gran cantidad de cultivos de importancia económica y nutricional, por lo que se considera que es una de las bacterias fitopatógenas de mayor impacto económico en el mundo (Schell, 2000).

En Uruguay afecta particularmente a la papa, uno de nuestros principales cultivos hortofrutícolas. La enfermedad, también conocida como pudrición parda o marchera, produce daños sobre el follaje y los tubérculos y es la segunda enfermedad de importancia mundial en el cultivo de papa. Desde el punto de vista taxonómico, *R. solanacearum* es un bacilo Gram negativo aerobio, perteneciente a la subdivisión  $\beta$  de

la clase Proteobacteria. Se considera que las cepas de *R. solanacearum* constituyen un complejo de especies altamente heterogéneo que agrupa cepas que varían en virulencia, rango de hospedero, modos de transmisión y propiedades metabólicas. Las cepas presentes en nuestro país pertenecen a la raza 3 biovar 2, según el esquema clásico de clasificación, lo que se corresponde con el filotipo IIB1, según la clasificación más reciente (Fegan y Prior, 2005).

El primer brote de marchera en Uruguay fue registrado en 1974 y su impacto fue devastador. Un segundo episodio de importancia ocurrió en la zafra 2001-2002, cuando el 39 % de los predios sembrados en las tres zonas de producción principales (Sur, Este y Norte) fueron afectados, con mayor severidad en las zonas Este y Norte (MGAP-DIEA, 2003). Actualmente, la incidencia de la enfermedad es variable y muy dependiente de las condiciones ambientales y prácticas de cultivo.

Las vías de diseminación más frecuentes de *R. solanacearum*

son el tubérculo-semilla infectado, el agua de lluvia y riego, así como también la maquinaria, herramientas y fuentes de agua superficiales contaminadas. El hecho de que esta bacteria tenga un gran rango de hospederos y una amplia distribución geográfica limita la implementación de estrategias efectivas de control. Estas apuntan más que nada a la prevención y recomiendan la rotación de cultivos en campos infectados, el uso de material vegetal libre del patógeno y la limpieza de las herramientas utilizadas, en tanto se busca generar cultivares resistentes (Saddler, 2005). Hasta el momento y pese a los esfuerzos que se han realizado desde hace muchos años, no se han logrado medidas de control completamente efectivas. Esto se ve agravado por el hecho de que una vez introducido en el suelo el patógeno puede sobrevivir por varios años, constituyendo un reservorio de la enfermedad difícil de detectar y erradicar (Hayward, 1991).

Varios estudios se han enfocado a determinar la persistencia de *R. solanacearum* en el suelo. Sin embargo, los resultados obtenidos son variables y las evidencias apuntan a que la capacidad de sobrevivencia del patógeno depende de múltiples factores tanto bióticos como abióticos, entre los que se destacan la humedad del suelo, la temperatura, la competencia con la microflora acompañante y la presencia de malezas que actúan como hospederos asintomáticos, manteniendo el inóculo en el suelo a nivel de la rizósfera (Granada y Sequeira, 1983; Elphinstone, 1996; van Elsas et al., 2000; Moffett et al., 2002; Denny, 2006).

Dadas las pérdidas severas que produce, la marchera de la papa se maneja hasta el presente como una enfermedad de exclusión, de modo que la presencia del patógeno inhabilita el uso de una chacra por un período de años. Si bien la rotación de cultivos es efectiva, se desconoce el tiempo de supervivencia del patógeno en suelo en las condiciones particulares de Uruguay. Nuestra reglamentación fitosanitaria establece la tolerancia cero para *R. solanacearum* en tubérculo-semilla de papa. No obstante, esto no es suficiente para asegurar el éxito en la producción, ya que el cultivo debe acompañarse de suelos libres del patógeno (MGAP, 2010). Esto es aún más importante para quienes además desean producir papa-semilla, debido al riesgo de diseminación de la enfermedad en cultivos posteriores.

Una de las principales dificultades para el estudio de la sobrevivencia de *R. solanacearum* en el suelo es la detección del patógeno en una matriz tan compleja y en la cual generalmente se encuentra en un muy bajo número. El surgimiento de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido desarrollar métodos de detección sensibles, rápidos y específicos que han sido aplicados a la detección de este patógeno en diferentes tipos de muestras complejas, como tubérculos, plantas, suelo, agua, y que contribuyen a su diseminación.

Buscando responder a las necesidades de los productores de conocer la persistencia de este fitopatógeno en suelos paperos, nuestro grupo trabaja desde hace algunos años en la detección del patógeno en muestras de suelos de chacras de Uruguay. En trabajos previos hemos optimizado un método molecular de detección basado en la incorporación de una etapa de enriquecimiento selectivo de las muestras de tierra previo a la amplificación por PCR. El patógeno fue detectado en campos de las distintas zonas paperas, con diferentes antecedentes de marchera y bajo distintas condiciones (Siri et al., 2005; Sanabria et al., 2007). En este trabajo hemos continuado el estudio de persistencia de *R. solanacearum* sobre campos con diferentes antecedentes de marchera, incorporando un nuevo diseño de recolección de muestras. Se presentan los resultados de persistencia del patógeno en campos con antecedentes de infección de 1, 3, 12, 15 y 33 años.

## Materiales y Métodos

### Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

Se empleó la cepa de *R. solanacearum* UY041 (raza 3, biovar 2) como control positivo. Esta cepa fue aislada en Uruguay en 2004 a partir de un tubérculo con síntomas de marchera y pertenece a la colección de cepas de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química de la Universidad de la República (Siri et al., 2011). La propagación de esta cepa se realizó por cultivo en medio sólido TZC (Kelman, 1954) durante 48 h a 28 °C.

### Muestreo de los campos

Se evaluaron cuatro campos con diferentes antecedentes de marchera ubicados en las zonas Norte y Este de producción papera (Tabla 1). Los campos I, II y IV tuvieron un foco de infección 1, 3 y 33 años antes de la fecha de muestreo. El campo III fue evaluado en dos oportunidades, a los 12 y 15 años después del foco.

Ninguno de los campos estudiados fueron utilizados para cultivos susceptibles después de la infección con *R. solanacearum* y, en cambio, fueron destinados para pasturas o para producción de trigo, girasol y maíz. En cada campo se tomaron muestras de tierra en 25 puntos distribuidos al azar en todo el terreno, y se registró mediante GPS la ubicación exacta del mismo. En cada punto de muestreo se extrajeron dos muestras de tierra de aproximadamente 500 g que se mezclaron y homogeneizaron antes del análisis. También se tomaron muestras de tierra fuera del área de cultivo, a los efectos de considerarlas como controles negativos. Las muestras se mantuvieron en bolsas cerradas a temperatura ambiente y se analizaron antes de las 24 h de extraídas.

### Enriquecimiento de las muestras de suelo

Se inoculó 1 g de cada muestra de tierra homogeneizada en 30 mL de caldo selectivo SMSA modificado (Englebretch, 1994). Para cada campo analizado se incluyó un control positivo que consistió en la muestra de tierra tomada fuera del área de cultivo inoculada con *R. solanacearum* a partir de una colonia crecida en medio TZC. Los enriquecimientos se incubaron por 48 h a 28 °C con agitación (150 rpm).

### Detección molecular a partir de las muestras de suelo enriquecidas

Se realizó la detección mediante PCR a partir de las muestras de suelo enriquecidas en caldo selectivo SMSA modificado. Se tomó una alícuota de cada enriquecimiento y se incubó a 99 °C durante 30 minutos para provocar la lisis celular y la liberación del ADN. Para la amplificación se utilizaron los *primers* PS1-PS2 específicos para la especie *R. solanacearum* dirigidos a una porción del gen del ARNr 16S (Patrik y Maiss, 2000), siguiendo el procedimiento descrito por Seal et al. (1999). La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL, con 2,5 µL de tampón de PCR 10X (suministrado con la *Taq*), 0,5 U de *Taq* polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 12,5 pmoles de cada *primer* y 5 µL de cultivo lisado. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas: desnaturalización inicial a 96 °C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos repetidos de desnaturalización (94 °C, 20 segundos), hibridación de los *primers* (67 °C, 25 segundos), extensión (72 °C, 30 segundos) y un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 minutos. Cada muestra se analizó por duplicado. El tamaño del fragmento esperado es de 550 pb.

Como control positivo de la amplificación se utilizó ADN extraído a partir de una cepa de *R. Solanacearum*, siguiendo los procedimientos descritos en Sambrook y Rusell (2001). Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 % con tinción con bromuro de etidio y se determinaron los tamaños de los fragmentos por comparación con un marcador de peso molecular 1 kb Smart Ladder (Eurogentec, California, Estados Unidos).

### Detección directa a partir de muestras de suelo

Se realizó la detección directa sobre el ADN total extraído de las muestras de suelo con el kit comercial Power Soil DNA, MoBio Laboratories (California, Estados Unidos). Posteriormente se realizó la amplificación por PCR del ADN extraído, empleando los *primers* específicos PS1-PS2, en las condiciones descritas anteriormente. De igual forma, los productos de amplificación obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8 % con tinción con bromuro de etidio y se determinaron los tamaños de los fragmentos por comparación con un marcador de peso molecular comercial.

### Secuenciación de los productos de amplificación

Los productos de amplificación seleccionados se enviaron a purificar y secuenciar a Macrogen (Korea) y las secuencias fueron comparadas con la base de datos Genbank con el software nBLAST (Dumontier y Hogue, 2002).

## Resultados

Se estudiaron cuatro campos con distintos antecedentes de murchera en los que se recolectaron 25 muestras por campo y al menos una muestra tomada fuera del área de cultivo. No se detectó la presencia de *R. solanacearum* en ninguno de los controles negativos analizados.

En la Tabla 1 se muestran los campos analizados y el número de muestras que resultaron positivas en la reacción de PCR luego de 48 h de enriquecimiento selectivo. En la Figura 1 se representan a modo de ejemplo dos de los campos (II y IIIa), de forma de visualizar la distribución de los puntos de muestreo. También se señala la ubicación de las muestras que resultaron positivas. Se detectó la presencia de *R. solanacearum* en tres de los campos analizados. Para el campo IV, con un antecedente de murchera en 1974, ninguno de los enriquecimientos dio positivo. El mayor número de muestras positivas se detectó en el campo con antecedentes más recientes de infección por murchera (campo I). En este caso se constató la presencia de *R. solanacearum* en 18 de las 25 muestras analizadas. Por otra parte, para el campo II que presentó un foco de murchera tres años antes del muestreo, se obtuvo una menor proporción de muestras positivas (6/25). El campo III fue muestreado en dos ocasiones con diferencia de tres años. El segundo muestreo mostró una disminución del número de muestras positivas.

Como otra forma de demostrar estos resultados, se realizó la detección directa de *R. solanacearum* sobre el ADN extraído a partir de las muestras de suelo. Este análisis se llevó a cabo sobre un número representativo de muestras. Para aquellos campos que tuvieron varios enriquecimientos positivos (I, II y III) se escogieron algunos puntos al azar (4 o 5 muestras) y se extrajo ADN total de tierra. Sobre este ADN se realizó la PCR con los *primers* PS1-PS2. Excepto para dos de los puntos analizados (campo II, punto 7 y campo IIIa, punto 14) todos los resultados de la PCR sobre el ADN total de tierra fueron coincidentes con los resultados de la PCR sobre el enriquecimiento (Figura 1). Para el campo IV, en el que ninguna muestra enriquecida fue positiva, se realizó la detección directa sobre 10 de las muestras del suelo y se obtuvieron resultados positivos de la PCR para tres de los puntos.

Por último, se analizaron las secuencias de 10 productos de amplificación tomados al azar correspondiendo al género *Ralstonia*. Debido a que los porcentajes de identidad respecto a otras secuencias depositadas están por debajo del 98,5 %, no se pudo asignar la especie a ninguna de las muestras analizadas (CLSI, 2008).

Campo	Departamento (*)	Antecedente de murchera	Muestreo	Área muestreada (**)	Muestras positivas (**)
I	Rocha (Este)	2008	2009	Nd (***)	18
II	Rocha (Este)	2003	2006	33	6
III <sub>a</sub>	Rocha (Este)	1994	2006	20	14
III <sub>b</sub>	Rocha (Este)	1994	2009	20	8
IV	Tacuarembó (Norte)	1974	2007	20	0

Tabla 1. Detección de *R. solanacearum* en campos con distintos antecedentes de murchera.

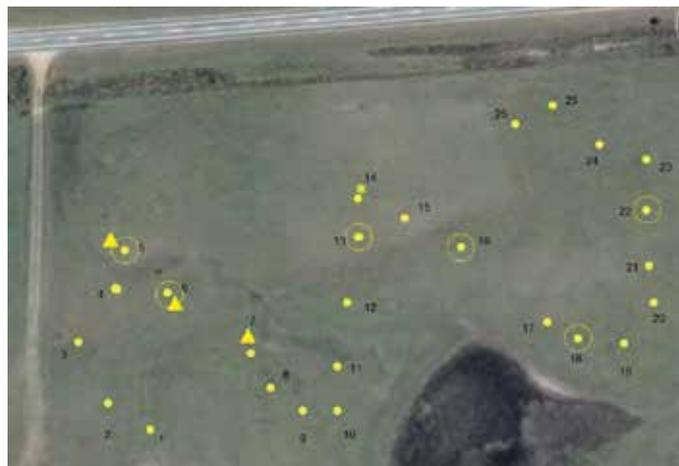
(\*) entre paréntesis se indica la zona de producción papera

(\*\*) en hectáreas

(\*\*\*) nd, no determinado

(\*\*\*) resultado de la amplificación por PCR a partir de los enriquecimientos a las 48 h, sobre 25 muestras totales

A.



B.



Figura 1. Esquema del área muestreada en el campo II (A) y III<sub>a</sub> (B). Se tomaron muestras en 25 puntos distribuidos al azar y cubriendo toda la superficie del campo (\*). Aquellos puntos en los que se detectó la presencia de *R. solanacearum* mediante amplificación a partir del enriquecimiento de las muestras de suelo se destacan con un círculo (⊙). Los puntos de muestreo que resultaron positivos mediante amplificación directa sobre el ADN extraído a partir de la muestra de suelo se señalan con un triángulo (▲) y los que resultaron negativos se indican con un asterisco (\*).

## Discusión

En este trabajo se realizó un estudio sobre la capacidad de sobrevivencia de la bacteria fitopatógena *R. solanacearum* en el campo. Para ello se relevaron cuatro campos que fueron utilizados para el cultivo de papa y que presentan diferentes antecedentes de infección por este patógeno. En cada muestreo se tomaron 25 muestras de suelo distribuidas al azar y cubriendo toda la superficie del campo. Dada la gran extensión de los campos evaluados, esta estrategia de muestreo resultó más efectiva que la utilizada en un estudio previo, en el que se realizó un muestreo por cuadrículas en un área de 25 m<sup>2</sup> o 100 m<sup>2</sup> correspondiente a la zona donde se inició el foco (Siri et al., 2005).

La detección del patógeno en las muestras de suelo se realizó mediante enriquecimiento en medio selectivo y la posterior detección por PCR con *primers* específicos para *R. solanacearum*. El paso de enriquecimiento previo a la amplificación por PCR permite recuperar y multiplicar al patógeno, el cual seguramente se encuentre en bajo número de acuerdo a las condiciones oligotróficas de escasez de nutrientes. Se utilizó un medio selectivo diseñado para *R. solanacearum* suplementado con más de cinco agentes antimicrobianos, que permite seleccionar a *R. solanacearum* frente a la flora acompañante (Englebretch, 1994). La inclusión de una etapa

de enriquecimiento previo a la detección por PCR también disminuye el efecto de sustancias frecuentemente presentes en el suelo, que afectan la actividad de la ADN polimerasa inhibiendo la amplificación (Picard et al., 1992; Pradhanang et al., 2000; Lin et al., 2009).

La aplicación de este método para la detección de *R. solanacearum* en muestras de suelo permitió detectar la presencia del patógeno en todos los campos analizados con antecedentes de 1, 3, 12 y 15 años de infección por marchera. Como era de esperar, el mayor número de muestras positivas se detectó en el campo con antecedentes más recientes de infección. Sin embargo, no se observó una correlación clara entre la presencia de *R. solanacearum* en el campo y el tiempo transcurrido a partir del foco. Este hecho puede atribuirse a diferencias en severidad de los brotes ocurridos en los distintos campos, así como a múltiples factores bióticos y abióticos que pueden afectar la sobrevivencia de *R. solanacearum* en el campo (Álvarez, 2010).

En el caso del campo muestreado en dos oportunidades (campo III), fue posible correlacionar las muestras positivas con la severidad del foco en esos lugares gracias a datos aportados por los productores. No se contaba con esta información para el resto de los campos. Un factor que puede contribuir en forma importante a mantener la bacteria en los campos es la presencia de malezas capaces de albergar a la bacteria a nivel de la rizósfera, potenciando la sobrevivencia del patógeno en el campo (Janse et al., 2004).

Asimismo, se efectuó la detección directa de *R. solanacearum* mediante amplificación por PCR sobre el ADN extraído a partir de las muestras de suelo sin enriquecer. Esta alternativa se ensayó para algunas de las muestras con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por amplificación sobre los enriquecimientos. La mayoría de las muestras analizadas mostraron una concordancia en los resultados obtenidos por ambas metodologías. Las principales variaciones se encontraron para las muestras correspondientes al campo con un antecedente de marchera de 33 años (campo IV). En este caso no se detectó la presencia de *R. solanacearum* en ninguna de las 25 muestras evaluadas mediante enriquecimiento y posterior amplificación por PCR. No obstante, tres de las 10 muestras evaluadas mediante amplificación a partir del ADN extraído de suelo para este campo resultaron positivas. A partir de la extracción de ADN total de suelo, también amplificaron dos muestras correspondientes a los campos II y III<sub>a</sub> (muestra 7 del campo II y muestra 14 del campo III<sub>a</sub>, Figura 1), las cuales habían resultado negativas por amplificación a partir del enriquecimiento. Estos resultados indicarían la posible presencia del patógeno en un estado latente conocido como “viable pero no cultivable”. Se ha comprobado que muchos microorganismos que habitan en el suelo son capaces de adoptar este estado fisiológico en el que la bacteria se mantiene viable pero no es capaz de multiplicarse activamente en un medio de cultivo (McDougald et al., 1998; Alexander et al., 1999). Además se ha comprobado que *R. solanacearum* es capaz de adoptar este estado de latencia que le permite sobrevivir a condiciones de estrés frecuentes en el suelo, como la deshidratación, limitación de nutrientes y exposición a metales pesados (Grey y Steck, 2001; Álvarez et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que *R. solanacearum* es capaz de persistir viable en el suelo por más de 10 años después de la infección. Según bibliografía, la persistencia de la bacteria en el suelo es variable y va desde varios meses hasta más de cuatro años (van Elsas et al., 2000). Su sobrevivencia depende de muchos factores, dentro de ellos los climáticos, pero también el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Al tratarse de una enfermedad de exclusión, para el productor se hace imprescindible conocer la capacidad de sobrevivencia del patógeno en sus campos para la programación de las siembras. De acuerdo a nuestros resultados, el

tiempo de persistencia de *R. solanacearum* en los suelos analizados superaría el tiempo aconsejado para la interrupción del cultivo de papa luego de una infección (de seis años; F. Vilaró, comunicación personal). Este hallazgo es de suma importancia, ya que repercute directamente en las prácticas de cultivo a adoptar para evitar la reincidencia de esta enfermedad.

## Conclusiones

Mediante la aplicación de métodos moleculares de detección se estableció que *R. solanacearum* es capaz de persistir hasta 15 años luego de la aparición de la enfermedad en el cultivo para los campos y condiciones estudiadas.

El enriquecimiento en medio selectivo con incubación de 48 h y posterior amplificación por PCR resultó un método apropiado para la detección de *R. solanacearum* en muestras de suelo. El método de recolección de las muestras al azar en toda el área del campo se ajusta mejor a campos paperos de varias hectáreas, como lo son frecuentemente en Uruguay. Dado que la bacteria puede estar presente en hospederos asintomáticos, se hace también necesario el estudio de las malezas que conviven con los cultivos en los campos paperos, de forma de determinar si actúan como reservorios para este fitopatógeno.

## Reconocimientos

Agradecemos a los Ingenieros Agrónomos Alfonso Grela y Guillermo Galván por acompañarnos y colaborar en el muestreo, así como por su asesoramiento técnico junto al Ing. Agr. Enrique Verdier. Parte de este trabajo se realizó gracias al financiamiento del proyecto CSIC 273 sector productivo modalidad 2 (Universidad de la República).

## Referencias

- ALEXANDER, E.; PHAM, D.; STECK, T. R. The viable-but-nonculturable condition is induced by copper in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(8):3754-3756.
- ÁLVAREZ, B.; BIOSCA, E. G.; LÓPEZ M. M. On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. En: MÉNDEZ-VILAS, A. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Vol. 1. Badajoz: Formatex, 2010. pp. 267-279
- CLSI. *Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline*. Wayne: CLSI, 2008. (CLSI document MM18-A)
- DENNY, T.P. Plant pathogenic *Ralstonia* species. En: GNANAMANICKAM, S.S. *Plant associated bacteria*. Dordrecht: Springer, 2006. pp. 573-644.
- DUMONTIER, Michel; HOGUE, Christopher W.V. NBLAST: a cluster variant of BLAST for NxN comparisons. En: *BMC Bioinformatics*. 2002, 3:13
- ELPHINSTONE, J. G. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. En: *Potato Research*. 1996, 39:403-410.
- ENGLEBRETCH, M.C. Modifications of a semi-selective medium for the isolation of *Pseudomonas solanacearum*. En: *Bacterial Wilt Newsletter*. 1994, 10:3-5.
- FEGAN, Mark; PRIOR, Philippe. How complex is the *Ralstonia solanacearum* specie complex? En: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. A. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum specie complex*. St. Paul: Amer Phytopathological Society, 2005. pp.437-445.
- GRANADA, G.A.; SEQUEIRA, L. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. En: *Canadian Journal of Microbiology*. 1983, 29:433-440.
- GREY, B. E.; STECK, T. R. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67:3866-3872.
- HAYWARD, A.C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. En: *Annual Review of Phytopathology*. 1991, 29:65-87.
- LIN, Chih-Hung; HSU, Shih-Tien; TZENG, Kuo-Ching; WANG, Jaw-Fen. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. En: *European Journal of Plant Pathology*. 2009, 124(1):75-85.
- JANSE, J.D.; VAN DEN BELD, H.E.; ELPHINSTONE, J.; SIMPKINS, S.; TJOU-TAM-SIN, N.N.A.; VAN VAERENBERGH, J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. En: *Journal of Plant Pathology*. 2004, 86(2):147-155.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. En: *Phytopathology*. 1954, 44:693-695.
- MCDUGALD, D.; RICE, S. A.; WEICHART, D.; KJELLEBERG, S. Nonculturability: adaptation or debilitation? En: *FEMS Microbiology Ecology*. 1998, 25:1-9.
- MGAP. DIEA. *Caracterización de la producción de papa. Encuesta 2003* [En línea]. Montevideo: MGAP, 2003, [Consulta: Junio 2012]. (Serie Encuestas; 214). Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/agxppdwn.aspx?7,1,89,O,S,0,1498%3bS%3b1%3b120>,
- MGAP. *Resolución ministerial 864/10, aprobación en las modificaciones al estándar específico para producción de materiales de propagación de papa (Solanum tuberosum) de clase certificada*, de 01 de noviembre de 2010. Montevideo: MGAP, 2010.
- MOFFETT, M.L.; GILES, J. E.; WOOD B. A. Survival of *Pseudomonas solanacearum* biovars 2 and 3 in soil: effect of moisture and soil type. En: *Soil Biology and Biochemistry*. 2002, 15(5):587-591.
- PASTRIK, K.H.; MAISS, E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. En: *Journal of Phytopathology*. 2000, 148:619-626.
- PICARD, C.; PONSONNET, C.; PAGET, E.; NESME, X., SIMONET, P. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58:2717-2722.
- PRADHANANG, P.M.; ELPHINSTONE, J.G.; FOX R.T.V. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. En: *Plant Pathology*. 2000, 49:414-422.
- SADDLER, G.S. Management of bacterial wilt disease. En: ALLEN, C.; PRIOR, P.; HAYWARD, A. A. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum specie complex*. St. Paul: Amer Phytopathological Society, 2005. pp.121-132.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ra ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001.
- SANABRIA, A.; SIRI, M. I.; GRELA, A.; PIANZZOLA, M. J. Study of the persistence of *Ralstonia solanacearum* in soils

- focused to obtain a better advantage of the potato fields. En: *6th Latin American Biodeterioration and Biodegradation Symposium* (Bogotá, mayo de 2007). Bogotá: [s.n.], 2007.
- SCHELL, Marc A. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. En: *Annual Review of Phytopathology*. 2000, 38:263-292.
  - SEAL, S.E.; TAGHAVI, M.; FEGAN, N.; HAYWARD, A.C.; FEGAN, M. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. En: *Plant Pathology*. 1999, 48:115-120.
  - SIRI, M. I.; CECCHETTO, G.; ALDABE, L.; SANTOS, C.; SILVERA, E.; QUIRICI, L.; GALVÁN, G.; VILARÓ, F.; PIANZZOLA, M. J. Persistencia de *Ralstonia solanacearum* en chacras de Uruguay: diagnóstico molecular de muestras de suelo y susceptibilidad de Solanáceas nativas. En: SOCIEDAD URUGUAYA DE HORTIFRUTICULTURA. *X Congreso Nacional de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura*, (Montevideo, 23-25 de mayo de 2005). Montevideo: Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura, 2005.
  - SIRI, M. I.; SANABRIA, A.; PIANZZOLA, M. J. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. En: *Plant Disease*. 2011, 95(10):1292-1301.
  - VAN ELSAS, J. D.; KASTELEIN, P.; VAN BEKKUM, P.; VAN DER WOLF, J. M., DE VRIES, P. M.; VAN OVERBEEK, L. S. Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. En: *Phytopathology*. 2000, 90:1358-1366.
-

# Biosíntesis de dextranos de alto peso molecular mediante la inoculación con *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) de jugos residuales de la agroindustria de la piña: síntesis y caracterización de hierro-dextranos

Biosynthesis of high molecular weight dextrans by inoculation with *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830) residual juice from pineapple agroindustry: synthesis and characterization of iron-dextrans

Vega Baudrit, José Roberto <sup>(1,2)</sup>, Sibaja Ballester, María del Rosario <sup>(1)</sup>, Lopretti, Mary <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica - <sup>(2)</sup>Laboratorio Nacional de Nanotecnología LANO-TEC-CeNAT, Costa Rica - <sup>(3)</sup>Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias, UdelaR, Uruguay

Contacto: jvegab@hotmail.com, maria.sibaja@gmail.com

Recibido: 13/6/2012 - Aprobado: 20/11/2012

## Resumen

En este trabajo se muestran los estudios realizados para obtener dextranos a partir de desechos de la agroindustria de piña. La fermentación se llevó a cabo en un biorreactor (10 L), se inoculó con un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830). Se centrifugó y se precipitó y purificó con etanol. Fue caracterizado por medio de viscosidad, peso molecular y grupos funcionales por espectroscopía infrarroja. Este dextrano fue tratado con el fin de obtener hierro-dextranos.

Palabras clave: Polímeros, dextrana, hierro-dextrana.

## Abstract

In this work we report studies for dextrans from pineapple agroindustrial-wastes. Fermentation was carried out in a bioreactor (10 L) where the juice was inoculated with a culture of *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* (ATCC 10830). It was centrifuged, and precipitated and purified with ethanol. It was characterized by viscosity, molecular weight and functional groups by infrared spectroscopy. This dextran was treated to obtain iron-dextran.

Keywords: Polymer, dextran, iron-dextran.

## Introducción

*Dextrano* es el nombre que colectivamente se le da a un gran grupo de exopolisacáridos bacterianos. Químicamente son  $\alpha$ -D-glucanos con predominio de enlaces glucosídicos 1-6 (Figura 1). La estructura, el peso molecular y otras propiedades de los dextranos son muy específicas de acuerdo al microorganismo utilizado para su obtención (Monsan, 1981).

Los dextranos son producidos por acción de la enzima dextranasa, que actúa sobre la sacarosa generando glucosa, y que se enlaza mediante radicales libres con la consiguiente liberación de la fructosa. Microbiológicamente son producidos por bacterias de los géneros *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Lactobacillus* y por algunos hongos del género *Penicillium* (Barker y Ajongwen, 1990).

Este tipo de material es ampliamente usado en el tratamiento clínico-terapéutico de animales y humanos y en la industria alimenticia y farmacéutica. Los altos precios en los mercados internacionales convierten a estos productos en una línea importante de desarrollo,

sobre todo si la materia prima a utilizar es un desecho (Lía et al., 1996).

En los últimos años la industrialización de la biomasa genera gran cantidad de desechos (Tabla 1), los cuales son dispuestos en rellenos sanitarios, zanjas o en las riveras de los ríos, convirtiéndose de esta manera en una fuente de contaminación ambiental. Sin embargo, estos desechos muestran un alto potencial para ser utilizados como materia prima en otros procesos industriales (Vega, 1998).

Dentro de los desechos agroindustriales se encuentran los originados por el procesamiento de la piña, cuyo cultivo y exportación como producto no tradicional ha venido en aumento en los últimos años (Figura 2). Para 2010 y 2011, el crecimiento ha sido exponencial. Las exportaciones de piña aumentaron un 4.9 % para abril de 2011 en comparación con el mismo período de 2010.

En Costa Rica la industrialización de la piña genera un 50 % de desechos; el corazón y la cáscara representan el 30 %, equivalente a una cantidad cercana a las 3.000 toneladas anuales (Vega, 1997, 1998; Bell, 1995). En la Tabla 2 se presentan algunas estadísticas relacionadas con la producción de desechos.

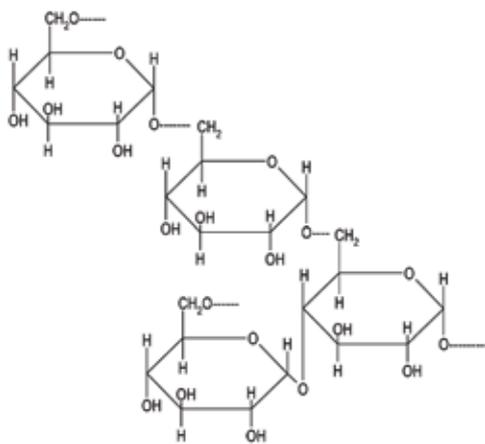


Figura 1. Molécula de dextrano.

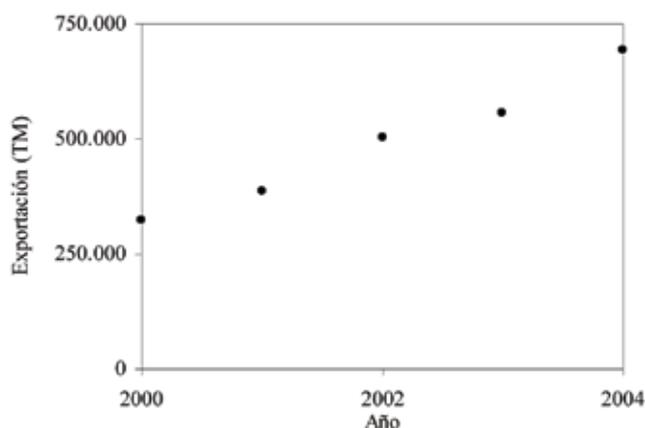


Figura 2. Volúmenes de exportación de piña entre 2000 y 2004. Fuente: CENPRO.

Tipo de desecho	Porcentaje ( $\pm 0.5$ )
Ordinario	13,6
Peligroso	0,4
Agroindustriales	86,0

Tabla 1. Producción de desechos en Costa Rica (Vega, 1998).

Tipo de desecho	Porcentaje
Área sembrada	7.000 Ha
Producción anual	240.000 T.M.
Exportación	90%
Aprovechamiento del fruto	35-50%
Corona	12%
Corazón	9%
Cáscaras	32%

Tabla 2. Estadísticas relacionadas con la industrialización de la piña (1994). Fuente: CENPRO.

En el caso de las cáscaras de piña, se ha aprovechado su parte fibrosa en la obtención de derivados lignocelulósicos (Bell, 1995; Lopretti, 2002) y el líquido resultante queda como un desecho que ha sido poco evaluado. Dicho jugo presenta un contenido de sacarosa de aproximadamente 5 %, lo que lo convierte en un sustrato adecuado para la obtención de dextranos utilizando una cepa del género *Leuconostoc*.

El objetivo de este trabajo es la producción biotecnológica de dextranos de alto peso molecular, utilizando como sustrato la sacarosa presente en el jugo de las cáscaras de piña y como inóculo la cepa *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* ATCC 10830 (NRRL B-512F).

## Materiales y Métodos

### Sustrato

El jugo se obtuvo del prensado de los desechos del procesamiento de la piña (*Ananas comusus*), en una de las plantas procesadoras de la fruta. El jugo fue pretratado con hidróxido de sodio 1N, hasta un pH de 5,5 y se pasteurizó calentándolo a 61,5 °C por 3 minutos con enfriamiento hasta la temperatura inicial. Este proceso se realizó tres veces consecutivas.

### Análisis químicos del sustrato

El porcentaje de sacarosa y otros azúcares fue determinado mediante HPLC (Shimadzu 10A, columna y precolumna de aminos, fase móvil acetonitrilo/agua en una relación 80/20, a 30 °C, flujo 2 mL/min, detector de índice de refracción). La determinación de ácidos totales se realizó por titulación con hidróxido de sodio 0.100 N, los metales traza por absorción atómica, proteínas por el método de Biuret,

cenizas por ASTM D1102- 84 y pH por medio de un peachímetro calibrado.

### Análisis microbiológicos

La caracterización microbiológica del jugo de las cáscaras de piña fresco y sin recibir tratamiento previo incluyó la determinación del índice de coliformes fecales y totales, con la técnica de tubos múltiples (Bell y Carrera, 1992), conteo total de aerobios y mesófilos, utilizando las técnicas por vaciado y rayado, y conteo de hongos y levaduras (Bell, 1970).

### Microorganismo empleado

Se utilizó la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, var. *mesenteroides* ATCC 10830.

### Inóculo

El jugo de piña fue inoculado con un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* incubado durante 18 horas a 29 °C en un medio de cultivo artificial, el cual contiene para 1 L de agua: 20 g de triptona, 4 g de cloruro de sodio, 1,5 g de acetato de sodio, 0,5 g de ácido ascórbico, elementos traza (Ca, Mn, Fe, Mg), 15 g de sacarosa y 8,76 g de extracto de levadura y 20 g de agar. El pH del medio se ajustó a 5,5 con ácido clorhídrico (Vega, 1998) antes de autoclavarse (121 °C, 20 minutos).

### Obtención y purificación de dextranos

El jugo del desecho de piña inoculado se incubó por 18 horas a 29 °C, sin agitación. Al finalizar el período de incubación se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm, para eliminar las células. Al sobrenadante se

le adicionó etanol al 95 % hasta una proporción 1 a 1 en volumen. Se centrifugó a 5000 rpm por 30 minutos (Vega, 1998).

El sobrenadante se descartó y al precipitado blanco se le agregó agua hasta disolverlo, para iniciar el proceso de purificación. Se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones y al sobrenadante se le agrega etanol (1/1 volumen). Se realizó la curva de precipitación para comprobar esta relación 1:1. El proceso se repite dos veces más.

El dextrano obtenido se secó, se determinó el rendimiento de producción, su viscosidad, el peso molecular por viscosidad y grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo.

## Caracterización de dextranos

### Viscosidad y peso molecular viscosimétrico

Los análisis se realizaron según el ASTM D445 y D2515 (5) con viscosímetros Cannon-Fenske, en un baño de agua a una temperatura de 40 °C.

### Grupos funcionales

Se utilizó un equipo de Espectroscopía de infrarrojo (FTIR) PARAGON 1000 PERKIN ELMER.

### Hidrólisis del Dextrano

Lopretti (2002). Se preparó una disolución del dextrano al 6 % P/V en agua destilada. Se le añadió HCl concentrado hasta alcanzar una concentración de 0.1 N. Se calentó entre 80-90 °C con agitación.

Al inicio de la hidrólisis se tomó una alícuota de la disolución. El proceso se repite cada cierto tiempo, se coloca en un balón aforado y se lleva a un pH de 7 con NaOH. Se le determina la viscosidad.

### Síntesis y caracterización de Hierro-dextrano

(Bell, 1995). La metodología abarca tres etapas. En la primera ocurre la hidrólisis del dextrano técnico en solución al 10 % de ácido clorhídrico (32-37 %). La hidrólisis se regula por medio de análisis de viscosidad intrínseca hasta valor 0,05-0,1 y se detiene neutralizando y enfriando la mezcla de reacción. Finalmente se filtra utilizando ayuda filtrante. Este proceso de hidrólisis permite obtener una solución de dextrano de bajo peso molecular, homogéneo y adecuado para ser acompañado sin dar lugar a dextranos libres de alto peso molecular.

En la segunda etapa se realiza la síntesis del hierro-dextrano, partiendo de la reacción lenta entre el  $\text{FeCl}_3$  0,5-2 M y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10-20 %. Se ajusta pH en 8-12 con hidróxido sódico al 20 %. La solución se estabiliza con calor. Se enfría y se ajusta el pH con HCl 1:1 hasta valores entre 4-7. La ejecución de esta etapa, según se señala, reduce el contenido de hierro libre que afecta la estabilidad del complejo.

En la tercera etapa se filtra el producto empleando ayuda filtrante y se añade propil y metil parabenos en relación 1:4 como preservantes. Se caracteriza su contenido de hierro y su pH.

## Resultados y Discusión

Con respecto a la caracterización del jugo de piña, se procedió a hacer el análisis por separado del jugo extraído de las cáscaras de la piña y del corazón del fruto. Como los resultados obtenidos no indican diferencias apreciables en cuanto al pH y al contenido de sacarosa, en posteriores usos se utilizan indistintamente, sin separar los residuos (Tabla 3).

La selección del sustrato se realizó con base en los requerimientos de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*, la cual necesita para su reproducción un pH de 5,5, 20-30 °C y 2 % de sacarosa. El contenido de sacarosa del jugo de piña posterior a la esterilización queda en 1,4 %. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos con respecto a algunos elementos traza.

El análisis de sacarosa al final de la obtención de dextrano fue de 0,13 %, lo que demuestra que durante el proceso de fermentación la mayoría de la sacarosa presente fue consumida por el microorganismo y parte de ella transformada en dextranos y fructuosa.

El rendimiento de dextranos obtenido fue de 6,3 g/l de jugo de las cáscaras de piña. Este rendimiento es superior si se compara con el obtenido utilizando otros sustratos (Lopretti, 2002).

En la Figura 3 se observan los resultados obtenidos en la determinación de la curva de precipitación para la purificación del dextrano. Se comprobó que la cantidad necesaria para precipitar la máxima cantidad de un dextrano en medio acuoso utilizando alcohol 95 % corresponde a una relación de 1:1 agua-etanol.

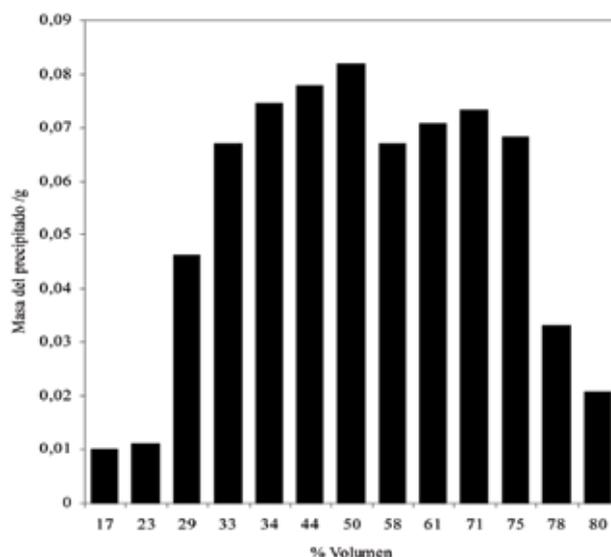


Figura 3. Resultados obtenidos en la determinación de la curva de precipitación para la purificación del dextrano.

Desecho	pH ( $\pm 0,05$ )	Acidez* ( $\pm 0,05$ )	Sacarosa ( $\pm 0,05\%$ )	Cenizas ( $\pm 0,05\%$ )	Proteína ( $\pm 0,1$ mg/mL)
Cáscara de piña	3,70	70,56	4,16	0,43	10,4
Corazón de piña	3,90	47,62	5,89	0,26	4,4

Tabla 3. Caracterización de los desechos de piña sin tratar. \*mL de NaOH 0.1 N/100 g de jugo

Elemento	Ca	Mg	Fe	Mn
%	0,015 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,0004 $\pm$ 0,0001	0,0011 $\pm$ 0,0001

Tabla 4. Determinación de elementos traza de los desechos de piña.

Con respecto a los resultados de la viscosidad relativa (Tabla 5), la diferencia observada entre el resultado teórico del peso molecular y el obtenido experimentalmente corresponde al ancho de la curva de peso molecular, es decir, parte de la viscosidad depende de las fracciones de menor peso molecular, de un material monodisperso. El resultado corresponde, por lo tanto, al máximo pico observado. Se calculó que el peso molecular del dextranos de piña es cercano a 1 millón de Daltons.

Muestra	Viscosidad relativa	Resultado MW (Daltons)
Dextrano de piña	6,4	960 000.00
Patrón de 40000	1,6	35 000
Patrón de 70000	1,7	60 000

Tabla 5. Resultados obtenidos en la determinación de la viscosidad y de los pesos moleculares viscosimétricos de los dextranos.

El espectro de infrarrojo mostró los picos característicos de un material celulósico a 3300 y 2900  $\text{cm}^{-1}$ , correspondientes a los grupos OH. Con los resultados observados en los espectros de infrarrojo, se concluye que el material producido corresponde al dextrano.

Finalmente, el hierro dextrano sintetizado presentó un color rojo oscuro, con un pH cercano a 5, un contenido de 10 % p/v de hierro, muy similar al descrito en la literatura (Bell, 1995; Bell, 1992).

## Conclusiones

Se concluye que la metodología usada para la obtención de dextranos y de hierro dextranos a partir de la sacarosa presente en los desechos de cáscara de piña da buenos resultados, incluso superiores con respecto a los mencionados en la literatura.

Además, eventualmente se aprovecharían materiales considerados como subproductos de procesos industriales, económicamente subutilizados, y que producen alta contaminación ambiental para la obtención de materiales de mayor valor agregado.

De esta manera se pretende que con el aporte de los centros de investigación, las compañías industrializadoras de esta fruta disminuyan el porcentaje de sus desechos y, por ende, su impacto negativo en el medio ambiente, y que a la vez se beneficien con una entrada extra con la obtención de productos de un mayor valor agregado que el de los desechos. Se combina de esta manera un mejoramiento en la calidad de vida del costarricense y un incremento en las ganancias de los productores de la fruta.

## Referencias

- ASTM INTERNATIONAL (United States). D1102: *Standard test method for ash in wood*. Conshohocken: ASTM, 2007.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D445: *Standard test method for kinematic viscosity of transparent and opaque liquids (and calculation of dynamic viscosity)*. Conshohocken: ASTM, 2012.
- ASTM INTERNATIONAL (United States). D2515: *Standard specification for kinematic glass viscosity*. Conshohocken: ASTM, 1996.
- BARKER, P.E.; AJONGWEN, N.J. The productions of the enzyme

dextranucrase using nonaerated fermentation techniques. En: *Biotechnol. Bioeng.* 1990, 37:703-707

- BELL GARCÍA, Antonio. *Producción del complejo de dextrana de hierro de uso antianémico*. Cuba. 22490. A61K. 1998-12-30.
- BELL, A.; CARRERA, E. Optimización de la hidrólisis química de la Dextrana técnica cubana para la obtención de dextrana con bajo peso molecular. En: *Revista ICIDCA*. 1992, XXVI( 2):[s.p.]
- BELL, A.; MALEK, J. *Boletín sobre los derivados de la caña de azúcar*. 1970, 7(2):[s.p.]
- CENPRO. Información consultada en el “Centro para la Promoción de las Exportaciones y de las Inversiones”, San José, Costa Rica.
- GONZÁLEZ, E.; MONCTEZUMA, A. Biotechnology for the processing of pineapple waste. En: *Industry and Environment*. 1985, 8(4):20.
- LÍA TORRES, L.; SIBAJA, M.; MOYA, M.; LUQUE, J.; LOPRETTI, M. *Conversión del jugo de cáscaras de piña a biopolímeros*. [s.l.]: [s.n.], 1996.
- LOPRETTI, M. *Producción simultánea de dextrano y fructosa a partir de desechos agroindustriales en Iberoamérica, aspectos científicos, técnicos y económicos*. [s.l.]: CYTED, 2002.
- MONSAN, P. On the production of dextran by free and immobilized sucrosa. En: *Biotechnol. Bioeng.* 1981, 23:2027-2037.
- VEGA, J. *Informe anual producción de dextranos de desechos agroindustriales*. Heredia: POLIUNA, 1997.
- VEGA, J. *Informe del Curso Internacional Obtención de Dextranos a partir de agua de Coco*. [s.l.]: [s.n.], 1998.

# Nuevos materiales poliméricos derivados de fuentes renovables

## New Polymeric Materials derived from renewable sources

Lopretti, Mary <sup>(1)(2)</sup>, Gandini, Alessandro <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(2)</sup> Departamento de Proyectos de Bioprocesos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - <sup>(3)</sup> Chemistry Department, University of Aveiro, Portugal (2007-2011).

Contacto: mlopre@latu.org.uy

Recibido: 14/6/2012 - Aprobado: 30/9/2012

### Resumen

En las últimas décadas se ha trabajado sobre el concepto de la Biomásica como alternativa de la Petroquímica. Existe un creciente interés en el uso de materiales renovables para energía y nuevos materiales. En este trabajo se estudió la síntesis de nuevos materiales poliméricos derivados de materiales renovables, especialmente lignina, por acción de sistemas enzimáticos oxidativos derivados de *G. trabeum* y *P. ostreatus*. El propósito fue la optimización y modelización de la producción de enzimas por fermentación semisólida. Se estudió la actividad en ligninas kraft y organosolv y se observó disminución del peso molecular e incremento de los grupos carboxilo. Se concluye que para los dos hongos el origen de la lignina es irrelevante. Sin embargo, aparecen diferencias cuando se utilizan compuestos modelo de lignina. Se ha observado diferente crecimiento y aparición de sistemas enzimáticos, responsables del peso molecular y el grado de oxidación de los grupos funcionales. Se considera que la producción estandarizada de enzimas favorecerá en el futuro su uso industrial de “unidades definidas” o “bloques”. En trabajos futuros se estudiará la cinética de producción.

Palabras clave: Lignina, conversión biológica, enzimas, polímeros.

### Abstract

In the last years it has been worked on the concept of Biomasic as an alternative to Petroquimic. An increasing interest of renewable resources in the area of energy and materials exists. In this work the synthesis of new polymeric materials derived from several renewable sources with emphasis in the valuation of lignins, with an oxidative systems enzymatic presents in two stocks of fungi *G. trabeum* and *P. ostreatus* in different combinations starters, were studied. The purpose was the optimization and modeling of the enzymatic production by semi solid fermentation process. The activity on Kraft and Organosolv lignins was analized and it was observed diminution of the molecular weight and an increase of the carbonyl groups in the tests with models and with lignins. We conclude that for both fungus the origin of the lignin as a carbon source is irrelevant. We consider that the production of standardized enzymatic extracts can be an interesting contribution at the time of making modifications in industrial lignins to obtain “well-known functional units”. In future works the kinetic of modification will be studied with the objective to make possible a future industrial application.

Keywords: Lignin, biological conversion, enzymes, polymers.

## Introducción

### Importancia del estudio de modificaciones bioquímicas de la lignina

En las últimas décadas se ha trabajado sobre el concepto de la “Biomásica” como alternativa de la “Petroquímica”.

Este concepto de desarrollar a partir de Biomasa (biopolímeros) productos energéticos como biocombustibles, productos químicos como ácidos orgánicos, alcoholes, aromas, entre otros, productos farmacéuticos, materiales poliméricos híbridos, etcétera, permite pensar en una nueva área de biorefinería que valoriza diferentes partes de las moléculas que constituyen la biomasa, ya sea por extracción y/o por transformación en productos de mayor valor agregado. En el estudio de modificaciones se halla un gran desafío: la separación y modificación de los biopolímeros en forma selectiva. Esto permitiría

definir un prototipo de proceso para obtener productos monoméricos u oligoméricos estandarizados que tengan un valor comercial en sí mismos o sean “bloques” o “unidades” que se transforman en materia prima para nuevas copolimerizaciones en materiales híbridos.

Dentro de los materiales lignocelulósicos se encuentran tres compuestos fundamentales, celulosa, hemicelulosas y lignina, y uno de los desafíos más grandes es modificar y valorizar la molécula de lignina.

Con un tratamiento adecuado estos materiales pueden transformarse en productos de mayor valor agregado, con la etapa de fraccionamiento como la de mayor importancia. Para que el fraccionamiento sea viable es necesario que la etapa tenga lugar sin destrucción o pérdida de los componentes involucrados. Un ejemplo de esto es la separación de la lignina, que puede hacerse en forma química, Kraft, organosolv, por ejemplo, o en forma selectiva, utilizando sistemas microbianos o enzimáticos.

Una vez producida la etapa de fraccionamiento vía delignificación, los procesos de hidrólisis y fermentación permiten obtener los

distintos productos del árbol llamado "árbol de los lignocelulósicos".

De los materiales lignocelulósicos es posible obtener, a partir de los carbohidratos, furfural, xilosas, glucosa, derivados de celulosa, pulpa y combustibles, entre otros, y a partir de las ligninas, vainillina, dimetilsulfuro, fenoles, resinas termorrígidas, antioxidantes, matrices para geles y fertilizantes, etcétera.

De estas aplicaciones vemos en general que la celulosa se usa como pulpa para papel, o se convierte en derivados como rayón, celofán, acetato de celulosa, CMC (carboximetilcelulosa) o butirato de celulosa (Gandini, 2002).

La hemicelulosa acompaña a la celulosa en la pulpa de papel o se transforma a furfural. Los productos con fines energéticos se hidrolizan a glucosa para luego ser fermentados.

A su vez, la lignina presenta algunos usos actuales: moléculas de bajo peso molecular, como vainillina, fenoles y derivados; uso en solución como dispersante, estabilizante de emulsiones, agente complejante, precipitante o coagulante; uso para la producción de diversos polímeros, tales como resinas termorrígidas; uso como matriz para absorción o intercambio iónico; conversión mediante carbonización y pirólisis en carbón activado (Gandini, 2002).

En un trabajo previo, Agosin et al. (1989, 1990) describen que el 5 % de la lignina disponible se utiliza con estos fines, por lo que resta gran cantidad por utilizar.

Se hace necesario el estudio de nuevos sistemas de transformación biológica, tanto por hongos como por bacterias, ya que utilizando materiales naturales y procesos biológicos (microorganismos o enzimas) resulta posible desarrollar una línea de productos naturales y con tecnologías limpias.

El estudio de estos procesos requiere el conocimiento de la estructura de la lignina, su localización y los procesos naturales conocidos hasta el momento.

En cuanto a la molécula de lignina, es preciso conocer su localización en la estructura de los tejidos lignocelulósicos (Higuchi, 1980), y también su compleja estructura en cuanto a los tipos de enlaces y los grupos funcionales que la caracterizan. Se debe hacer referencia necesariamente a la técnica de extracción y recuperación de la lignina, dado que se obtienen ligninas de características diferentes (Gandini, 2002). Se muestra en la Figura 1 la representación del polímero lignina.

Los procesos degradativos que modifican la estructura de lignina, tanto fisiológicos como bioquímicos, son de fundamental importancia para el estudio de su transformación.

## Aspectos biológicos y bioquímicos de la degradación de lignina

Estos procesos bioquímicos de degradación y transformación están relacionados con la fisiología y bioquímica de los microorganismos que colonizan estos materiales.

Entre los microorganismos más estudiados, se encuentran los llamados hongos de pudrición blanca, que incluyen varios cientos de especies de *Basidiomycetes* y unas pocas especies de *Ascomycetes*.

Estos hongos son los más estudiados y se ha demostrado que degradan rápidamente la mayor parte de los componentes de la madera a CO<sub>2</sub> y agua.

Los carbohidratos y ligninas son degradados simultáneamente durante la degradación de la madera, y existen algunos hongos que parecen tener preferencia en degradar los componentes de la lignina, como *P. chrysosporium*, *C. versicolor* y *P. ostreatus*.

Otro grupo de hongos, llamados hongos de pudrición parda, representados por numerosas especies de *Basidiomycetes*, degradan la celulosa y hemicelulosa y presentan solamente una pequeña modificación de la lignina. Sin embargo, se han descrito especies con una intensa actividad oxidativa, que producen una demetoxilación y una amplia hidroxilación en la posición 2 del anillo fenólico, y son las modificaciones más importantes producidas por estos hongos (Agosin et al., 1989, 1990; Hojas, 1999; Venica, 1997).

Los procesos anteriores conducen a la formación de O-difenoles

(moieties), que por autooxidación producen cromóforos del tipo quinina. La ruptura de los anillos es mínima, pero genera cambios en el contenido de carbonilos y carboxilos, por ejemplo con *L. trabea*.

El equipo de Kirk & Connors (1976), en sus varios trabajos en el tema, ha demostrado que la demetoxilación es el mayor cambio producido sobre la lignina, y los microorganismos que más se han estudiado son *Poria cocos* y *Gloeophyllum trabeum*. En resumen, la principal diferencia entre hongos blancos y hongos de pudrición parda es que los últimos tienen muy poca habilidad de metabolizar los anillos aromáticos.

Finalmente, otro grupo corresponde al de los llamados hongos "soft-rot", que incluye varios *Ascomycetes* y hongos imperfectos. Para estos organismos se ha demostrado que degradan la mayoría de los compuestos, incluida la lignina.

Entre los géneros estudiados se hallan: *Graphium*, *Monodictys*, *Allescheria*, *Paecilomyces*, *Populospora* y *Thielevia*, los cuales degradan lignina.

Estas especies degradan lignina más efectivamente en maderas duras que en maderas blandas. En los estudios se emplean <sup>14</sup>C de cadenas laterales a los anillos y DHPs con metoxilos marcados, y 14 ligninas que permiten ver el mecanismo de acción.

Han sido estudiados otros hongos, como *Fusarium solari* y *Aspergillus fumigatus*, que degradan ligninas y modelos de ligninas.

La degradación por acción de bacterias se comenzó a estudiar más recientemente; algunos cultivos de *Nocardia* muestran capacidad de degradar compuestos modelo sintéticos, o <sup>14</sup>C-DHP o <sup>14</sup>C ligninas de lignocelulosa.

La conversión del anillo, cadena lateral y grupos metoxilos de DHP a <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> encontrada por algunos autores fue 5.15 y 13 %, respectivamente (Vicuña, 1988).

Se han descrito cultivos de *Bacillus sp.* y algunos cultivos de *Streptomyces* que aparecen degradando <sup>14</sup>C lignina de lignocelulósicos. *Streptomyces flavovirens* degrada totalmente la molécula y ha sido estudiado por pérdida de peso y microscopía electrónica.

*Arthrobacter sp.* degrada material lignificado de maní, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* y *Acromonas spp* degradan ligninas ácidas, mientras que las *Xanthomonas sp* degradan el 77 % de ligninas dioxano a C y energía en 15 días (Lopretti, 1999).

Se ha demostrado que las ligninas Kraft de peso molecular mayor que 1500, son degradadas por *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Lopretti, 1999).

## Aspectos bioquímicos de la degradación

La forma de degradación por hidrólisis de distintos enlaces y cambios en los grupos funcionales, o diferencias en los pesos moleculares, no es conocida con exactitud para todos los microorganismos que actúan.

En los procesos degradativos se pueden reconocer algunos compuestos que están siempre presentes, como los ácidos ferúlico, vanílico, siringico, p-hidroxibenzoico, p-hidroxicinámico y otros compuestos como vainillina, coniferaldehído, guaiacilglicerol, etcétera.

Todos estos son sustrato para microorganismos que colonizan el suelo y, además, bacterias, levaduras y hongos. También son unidades que pueden ser utilizadas en nuevas copolimerizaciones.

Para el caso de compuestos metoxilados se ha visto que en cultivos estacionarios con algunas especies de *Pseudomonas* después de 60 días aparece una disminución de los grupos metoxilo.

Varias enzimas se han reportado como responsables de estas modificaciones. La O-demetilasa cataliza la demetilación de compuestos aromáticos metilados, liberando formaldehído, mientras que las lacasas liberan metanol. Las unidades metilo de ligninas son degradadas preferentemente por microorganismos que metabolizan compuestos de C1.

El metanol es oxidado a formaldehído seguido de oxidaciones a ácido fórmico y dióxido de carbono.

Mediante estos procesos se obtiene energía que es almacenada en forma de ATP. Alternativamente, los compuestos C1 son incorporados

en el material celular por la vía de la ruta de asimilación de C1.

En este trabajo se busca estudiar consorcios de microorganismos con diferentes capacidades de síntesis de enzimas, complementarias entre sí, para la degradación específica de lignina, y obtener las denominadas “unidades fenólicas para copolimerización” en un sistema repetible y escalable que permita su uso comercial. El estudio se desarrolla en un sistema de fermentación semisólida, que resulta más afín para los hongos, similar al medio natural, en lugar de utilizar una producción en sistema sumergido.

## Materiales y Métodos

### Producción de “unidades fenólicas” de lignina por fermentación semisólida

Se cultivaron conjuntamente *G trabeum* y *Pleurotus ostreatus* en un medio para hongos PDB donde se adicionó 0,5 % w/v de Lignina Kraft en un caso (a) y Lignina organosol en otro (b), en presencia de 0,1 ml de sales de Kirk y 3 % de extracto de levadura. El medio así preparado se inoculó con los hongos propagados por separado anteriormente en medio PDB durante 7 días en una proporción de 5 % w/v.

En estas condiciones, después de 7 días de crecimiento conjunto, el cultivo fue introducido en un sistema de fermentación semisólida, utilizando 500 g de material lignocelulósico proveniente de *Eucalyptus grandis* (los dos materiales fueron suministrados por la Ecole Française de Papeterie et des Industries graphiques, de Grenoble).

Durante el proceso la humedad fue de 70 % y fue necesario remover el material cada 5 días para incorporar oxígeno.

Cada cultivo permaneció a temperatura ambiente por 30 días, para luego obtener por lixiviación con solución de Na Cl 0,09 % y posterior prensado un extracto que correspondió a 100 ml. El material sólido también fue recuperado y se secó a temperatura ambiente.

En el extracto se evaluó la producción de enzimas sintetizadas en el proceso y los derivados fenólicos obtenidos por la acción de estas enzimas sobre la lignina presente en el sustrato sólido.

### Evaluación de la producción de fenoles

Se realizaron barridos espectrofotométricos UV-Visible entre 230 a 600 nm, estableciendo los cambios en las lecturas por las oxidaciones producidas, y una determinación de fenoles, utilizando una curva estándar de fenol.

### Distribución de PM de los fenoles obtenidos por cromatografía de gel permeación (GPC)

La cromatografía de gel permeación se realizó montando una columna de Sephadex LH-20 (Pharmacia). El gel fue preparado con alcohol isopropílico: agua destilada en relación 1:1 como solvente, y la columna tenía una geometría de 20 cm x 2 cm.

El punto de exclusión fue determinado con azul dextrano (PM 2000000 g/mol), medido a 525 nm.

El punto de inclusión se midió con fenol (PM=94.11g/mol), medido a 275 nm. Las muestras fueron preparadas solubilizando 0,2 ml de lignina en 0,2 ml de solvente. Se colocaron 0,2 ml de esta muestra en la columna.

Las fracciones recolectadas fueron de 2 ml, con un flujo de 0,06 ml/min, las cuales fueron medidas a 280 nm y se obtuvo el perfil de elución. Las fracciones obtenidas responden a oligómeros de lignina (fenoles modificados).

## Determinación de la actividad enzimática

El extracto obtenido en la fermentación semisólida fue filtrado y se realizaron diferentes determinaciones de actividades enzimáticas propias de los microorganismos crecidos en este sistema. Las actividades estudiadas fueron las que se detallan a continuación.

### Actividad Lignina Peroxidase

Esta actividad fue determinada por el Método de Tien & Kirk (1984). Se utilizó alcohol veratrílico 0,01 M como sustrato en buffer tartrato de sodio (0,1M, pH3.0) El ensayo se realizó utilizando 1 ml de esta solución y 0,1 ml del extracto enzimático obtenido de la fermentación. La reacción se inició agregando 4mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y continuó durante 1 h a 37 °C. Fue monitorizada midiendo el incremento de absorbancia a 310 nm (ε<sub>max</sub>=9300/M.cm).

### Actividad Laccasa

Esta actividad se determinó midiendo la oxidación de ABTS en buffer glicina- HCl (pH 3,0) a 420 nm (ε<sub>max</sub>=36000/M.cm). Para el ensayo se utilizó 2 ml de solución de ABTS 0.1 M a pH 3, a la cual se le adicionó 0,1 ml del extracto enzimático obtenido de la fermentación y se incubó durante 1 h a 35 °C.

### Actividad Demetilasa

Se aplicó el método de medida utilizando un compuesto modelo metoxilado. La reacción se siguió por medidas espectrofotométricas y por determinación del cambio en el espectro.

Para el ensayo se utilizó 2 ml de 0,1M de 3,4,5-trimetoxy benzaldehyde (Aldrich), pH 4, al cual se le agregó 0,1 ml del extracto enzimático obtenido de la fermentación. Se incubó a 30 °C y se monitorizó midiendo la disminución del sustrato por espectrofotometría UV -Visible a 354 nm.

## Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de la Reacción de Folin, muy utilizado para la determinación de proteínas en muestras biológicas (Lowry et al., 1951). Primero, las proteínas son pretratadas con ión cobre en solución alcalina, y luego los aminoácidos aromáticos presentes en la muestra reducen el ácido fosfomolibdato fosfotúngstico presente en el reactivo de Folin. Se desarrolla un color azul que es cuantificado por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 750 nm.

## Resultados

### Actividad enzimática obtenida

Del análisis de actividad en los extractos filtrados de la producción de fenoles modificados se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Actividad enzimática con Lig Kraft	5 días de cultivo	15 días de cultivo	30 días de cultivo
Lig peroxidasa	10	18	22
Laccasa	5	15	20
Demetilasa	0	4	15
A			

Actividad enzimática con Lig Organosolv	5 días de cultivo	15 días de cultivo	30 días de cultivo
Lig peroxidasa	8	18	20
Laccasa	8	15	18
Demetilasa	0	6	15
B			

Tabla 1. Actividad enzimática (UE/ml) obtenida en Sistema semisólido de *G. trabeum* y *P. ostreatus* en cultivo con Lignina Kraft (a); Sistema semisólido de *G. trabeum* y *P. ostreatus* en cultivo con Lignina organosolv (b).

## Estudio Espectrofotométrico de los fenoles modificados obtenidos

Se muestra una extensa oxidación en la lignina tratada y se obtienen productos de la depolimerización y oxidación. Estos resultados se incluyen en la Tabla 2.

Muestra	280 nm	310 nm	354 nm	375 nm
Lignina (a) sin tratamiento	0,84	0,01	0,12	0,08
Ligninas (a) solubilizadas	0,42	0,32	0,21	0,09

Muestra	280 nm	310 nm	354 nm	375 nm
Lignina (b) sin tratamiento	0,64	0,08	0,1	0
Ligninas (b) solubilizadas	0,38	0,42	0,21	0,1

Tabla 2. Se muestran las absorbancias obtenidas de las soluciones utilizadas de ligninas Kraft (a), Organosolv (b), sin tratamiento y ligninas a y b solubilizadas por tratamiento enzimático con 100 UE de Lig-peroxidasa, 100 UE de Laccasa y 50 UE de Demetilasa. Esta actividad de enzima fue promedio de las actividades enzimáticas que se obtuvieron en el total del lixiviado para cada sustrato (Kraft y Organosolv).

## Distribución de PM en Gel permeación (GPC)

La distribución de fracciones de diferente PM cambia cuando se trabaja en un sistema de fermentación semisólida. Se muestran en la Tabla 3 las absorbancias obtenidas en la distribución de los oligómeros presentes en ligninas sin tratamiento y en ligninas con tratamiento fúngico.

Volumen de elución (ml)	L-Kraft sin tratar	L-Kraft tratada	L-organosolv sin tratar	L-organosolv tratada
4			0,45	
6	0,89	0,49	0,24	0,54
8				0,5
10	0,21	0,29	0,18	0,32
12	0,13	0,32		
14				
16		0,11		0,10
18				0,07
20				

Tabla 3. Distribución de fracciones oligoméricas de lignina por Gel filtración con gel de Sephadex LH-20 (Pharmacia), alcohol isopropílico: agua destilada en relación 1:1. Las medidas fueron hechas a 280 nm. Las muestras fueron obtenidas sin tratamiento y con tratamiento fúngico durante 30 días. Se determinó para ligninas Kraft y ligninas organosolv.

Tanto para las ligninas Kraft como organosolv los perfiles espectrofotométricos indican que aparecen fracciones con el mismo perfil de elución, en las ligninas sin tratamiento y las tratadas en FSS, pero la concentración es menor en las fracciones que tienen una velocidad de aparición temprana, las fracciones de mayor peso molecular.

En ambos casos aparecen también fracciones de menor peso molecular que no se hallaban en las ligninas sin tratamiento, causadas por las enzimas presentes.

## Conclusiones

Estos estudios demuestran que es factible preparar consorcios enzimáticos capaces de modificar por depolimerización oxidativa un polifenol como la lignina, dando siempre oligómeros fenólicos estables denominados "unidades definidas" o "bloques". Estas unidades que tienen absorbancia a 280, 310, 354 y 375 nm se repiten y cuentan con la capacidad de ser utilizadas para copolimerizar y obtener materiales poliméricos combinados o híbridos, como poliuretanos reforzados, poliésteres y adhesivos, por ejemplo.

Esto genera la posibilidad de sintetizar diferentes tipos de edificaciones en bloques para la preparación de nuevos materiales poliméricos basados en recursos renovables.

Es viable la obtención de monómeros como aldehído veratrílico, fenol, ácido vanílico y vainillina, como "unidades definidas" que tienen su valor comercial en sí mismas o se pueden utilizar en materiales compuestos nuevamente sintetizados. Finalmente, resulta posible definir que nos encontramos ante un consorcio de hongos formado por *G. trabeum* y *P. ostreatus* que es efectivo para este proceso de obtención de unidades fenólicas, como también lo es el diseño de producción desarrollado por (FSS), fermentación semisólida.

En futuros trabajos se realizarán identificaciones precisas de las unidades y se trabajará en algunos ejemplos de aplicación.

## Referencias

- AGOSIN, E.; BLANCHETE, R. Characterization of palo podrido, a natural process of delignification in wood. En: *Appl. Environ. Microbiol.* 1990, 11:511-517.
- AGOSIN, E.; JARPA, S.; ROJAS, E.; ESPEJO, E. Solid state fermentation of pine sawdust by selected brown-rot fungi. En: *Enzyme Microb. Technol.* 1989, 11:511-517.
- GANDINI, A. Les lignines et leur utilisation dans les matériaux macromoléculaires. En: *Initiation à la chimie et à la physicochimie macromoléculaires.* 2002, 13:57-62.
- HOJAS, M. S. *Bioconversión de eucaliptus explotado. Uso en resinas fenólicas modificadas.* Santiago: Pontificia Universidad Católica de Chile, 1999. (Tesis de Doctorado).
- HIGUCHI, T. Lignin structure and morphological distribution in plant cell walls. En: KIRK, T.K.; HIGUCHI, T.; CHANG, H.M. *Lignin biodegradation; microbiology, chemistry, and potential applications.* Vol.1. Boca Raton: CRC Press, 1980. pp1-19.
- KIRK, T.K.; CONNORS, W.J.; ZEIKUS, J. Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood rothing fungi. En: *Appl. Envir. Microbiol.* 1976, 32:192-194.
- LOPRETTI, M. *Sistemas enzimáticos de hongos y bacterias modificadores de lignina.* Montevideo: Facultad de Ciencias Universidad de la República, 1999. (Tesis de Doctorado).
- LOPRETTI, M.; CARLOMAGNO, M.; GERVACIO, S.; GANDOMENICO, A. Enzymatic production of phenols from wastes of the paper Industry. En: *Biomass of Energ and Ind.* 2004:1951-1954.
- LOWRY, O.II.; ROSEHROUGH, N.J.; FARR, A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. En: *Biol. Chem.* 1951, 193:265-275.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degradating enzyme from Phanerochaete Chrysosporium: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. En: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1984, 81:2280-2284.
- VENICA, A. *Transformación de lignina en productos de alto valor agregado.* [s.l.]: CYTED,1997.
- VICUÑA, R. Bacterial degradation of lignin. En: *Enzyme Microbiol. Technol.*,1988. 10:646-655.

# Obtención por $\gamma$ -irradiación de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a condiciones de cultivo rigurosas, para la producción de bioetanol

## Obtention by $\gamma$ -radiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains tolerant to stringent growing conditions, for bioethanol production

Vázquez Zeballos, Sylvia Enid <sup>(1)</sup>, Buxedas, Luciana <sup>(1)</sup>, Lopretti, Mary <sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Uruguay

<sup>(2)</sup>Departamento de Biotecnología y Bioprocesos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, Uruguay

Contacto: sylvia.vazquez.zeballos@gmail.com

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 16/11/2012

### Resumen

Con el objetivo de obtener nuevas cepas de levadura capaces de resistir condiciones rigurosas de cultivo se sometió un cultivo fresco de *Saccharomyces cerevisiae* M522 a  $\gamma$ -irradiación. Se generó una colección de cepas y se evaluó su capacidad de crecimiento a elevadas concentraciones de azúcar y etanol. Se seleccionó una de las cepas y se estudió en ella el efecto de los productos de degradación de la lignina, oligómeros fenólicos metoxilados obtenidos de su despolimerización oxidativa por tratamiento biológico. Se estudiaron también las enzimas involucradas. Todos los cultivos fueron evaluados por absorbancia a 660 nm tras 24 horas de incubación a 37 °C. En cuanto a las fracciones fenólicas, se obtuvo el perfil por espectrofotometría UV y se identificaron enzimas laccasa, desmetilasa y lig-peroxidasa. Se obtuvo una cepa (SacSV-10) con las mismas características de cultivo que la M522 en YPD. Se logró cultivar la cepa en un caldo con 10 % de etanol, cepa que toleró el efecto de los productos de degradación de la lignina, así como una concentración de glucosa de 40 g/L, y en condiciones anaerobias se obtuvo una biomasa mayor que para la M522. En conclusión, SacSV-10 es un prometedor candidato para usar en producciones de alcohol a partir de residuos lignocelulósicos.

Palabras clave: Levaduras, extremófilos, biocombustibles, lignina.

### Abstract

In order to obtain new strains of yeast capable to resist rigorous culture conditions, a fresh culture of *Saccharomyces cerevisiae* M522 was submitted to  $\gamma$ -radiation. The result was a collection of strains whose capacity to tolerate elevated sugar and ethanol concentrations were tested. One of those strains was selected to analyze the effect on the culture of products of lignin degradation, the methoxylated phenolic oligomers obtained from its oxidative depolymerization by biological treatment. The enzymes involved were also studied. Spectrophotometer determinations were done at 660 nm to assess all cultures after 24 hours of incubation at 37 °C. It was possible to obtain the profile of the phenolic fraction by UV spectrophotometry and Laccase, Demetilase and Lig-peroxidase enzymes were identified. A strain which was called SacSV-10 was obtained with the same characteristics of the M522 in YPD. The strain was cultivated in a broth with 10 % ethanol concentration and it tolerated the effect of products of lignin degradation as well as a glucose concentration of 40 g/L, and a biomass in anaerobic conditions greater than the M522 was obtained. In conclusion, SacSV-10 is a promising candidate to be used in alcohol production from sources as lignocellulose residues.

Keywords: Yeast, extremophiles, biofuels, lignin.

## Introducción

La industria forestal produce toneladas de desechos anuales de residuos lignocelulósicos que constituyen un importante problema de contaminación. La capacidad de producir bioetanol a partir de ellos en procesos rentables con aceptables tasas de producción sigue siendo un desafío para la comunidad científica (Fernández et al., 2011; Cuervo et al., 2009; Carreón et al., 2009; Sánchez et al., 2005).

Existen muchos puntos críticos en este bioproceso, uno de ellos es el tratamiento que se debe realizar a la lignina previo a la fermentación, debido a que la lignina constituye una barrera para acceder a la celulosa. Esto se puede lograr por tratamientos físicos, químicos o biológicos. Los pretratamientos dejan en el medio trazas de lignina y productos de su despolimerización, oligómeros fenólicos metoxilados que pueden afectar de manera significativa la viabilidad y el comportamiento de

los microorganismos responsables de la fermentación (Cuervo et al., 2009; Mariscal, 2011; Pérez et al., 2002).

Luego del pretratamiento es preciso instrumentar un proceso de sacarificación en el cual enzimas celulasas y laccasas, entre otras, producidas por hongos con temperaturas óptimas de acción que rondan los 50 °C, despolimerizan la celulosa proporcionando altas concentraciones de glucosa libre en el medio, que puede ser metabolizada por microorganismos en procesos anaerobios con producción de etanol (Fernández et al., 2011; Yu et al., 2003; Pérez et al., 2002).

El punto de enfoque más importante podría ser encontrar cepas capaces de resistir condiciones extremas de cultivo (Mariscal, 2011). Si las cepas pueden ser cultivadas a temperaturas entre 37 °C y 45 °C, se denominan termotolerantes, y termófilas a temperaturas superiores, lo cual posibilita considerar procesos de sacarificación y fermentación

simultáneos. Estos modos de operación presentan dos ventajas: menos tiempo de uso del reactor y menor exposición de los microorganismos que se utilizan para la fermentación a tan altas concentraciones de azúcar, ya que ellos mismos la van consumiendo (Mejía et al., 2009). Otro factor a tener en cuenta es la concentración de alcohol remanente en el fermentador, que puede afectar la viabilidad de los microorganismos (Mariscal, 2011).

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura corrientemente utilizada en procesos de producción de bioetanol en la industria (Valdivieso, 2006). Las cepas se pueden modificar por medio de técnicas de biología molecular introduciendo mutaciones específicas o por inducción con agentes como la  $\gamma$ -irradiación, que provoca mutaciones al azar en el genoma de la levadura (Vinci et al., 1999; Valdivieso, 2006).

El objetivo de este trabajo es obtener nuevas cepas de levadura, capaces de resistir condiciones rigurosas de cultivo, con fines a la producción de bioetanol.

## Materiales y Métodos

### Generación de mutantes

Se irradiaron durante diferentes tiempos cultivos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* M522 (ATCC) en un Gammacell (Gamma Chamber 4000 a Isotope group, Bhabha Atomic Research Center, Trombay, Bombay, India), y se determinó la dosis letal 50. Luego se irradió durante ese tiempo un cultivo fresco de la levadura en caldo YPD (20 g/L de glucosa BENZO, 10 g/L de extracto de levadura BACTO, 10 g/L de peptona bacteriológica OXOID, solución buffer Mc. Laine pH 4.5) (Suresh et al., 1999). A partir del tubo irradiado se realizaron diluciones seriadas que se sembraron por triplicado en placas de YPD agar a los efectos de obtener colonias aisladas. Se sembró en paralelo la cepa M522 como control. De las placas que contenían colonias aisladas se seleccionaron por morfología y aspecto (color, textura, etcétera) 10 colonias que se transfirieron a tubos con 2 ml de YPD para generar cultivos puros de las nuevas cepas de *Saccharomyces spp.*, que se denominaron SacSV-n (n=número correspondiente a su aislamiento). Las cepas fueron mantenidas en placa de YPD en heladera y se congelaron a -20 °C en leche.

### Estudio de condiciones metabólicas de los mutantes

A partir de una placa de mantenimiento en YPD de cada cepa y de la levadura M522 mantenidas en heladera, se llevaron tubos con 3 ml de suero fisiológico (NaCl 0,9 %) a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  utilizando la escala de Mac Farland. Se transfirieron 150  $\mu$ L a tubos con 9 ml de YPD, YPD 40 g/L de glucosa e YPD complementado con 10 % de alcohol.

Los tubos se incubaron durante 24 horas en condiciones aerobias, sin agitación, a 37 °C y a 50 °C (los que correspondían al ensayo de temperatura extrema). Los cultivos se evaluaron por medidas de absorbancia a 660 nm (Thermo scientific. Mod. Evolution 160 UV\_Vis), utilizando como blanco en cada caso el medio sin inocular.

### Tolerancia de la cepa SacSV-10 a los productos de degradación de la lignina

Se seleccionó una de las cepas SacSV-10 y se estudió el efecto sobre el cultivo de los productos de degradación de la lignina, los oligómeros fenólicos metoxilados que se obtuvieron mediante su despolimerización oxidativa por tratamiento biológico a una concentración de fenoles de 0,80 g/l. Se realizaron cultivos de la cepa seleccionada en medio YPD previamente inoculado con el extracto de lignina tratado enzimáticamente a una concentración del 0,5 %, tanto para el lixiviado superficial como para el lixiviado decantado, con el

objetivo de estudiar los efectos de los residuos de lignina de diferentes pesos moleculares. Se utilizó como control un cultivo realizado en medio YPD sin lignina. Todos los cultivos se incubaron a 35 °C y se evaluaron determinando la absorbancia a 660 nm durante 8 horas. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

### Tratamiento de modificación de lignina

Con el fin de obtener monómeros y oligómeros de lignina solubilizados por despolimerización, se trataron 100 ml de medio de cultivo que contenía 10 g/l de glucosa, 0,2 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de tartrato de amonio, 1 ml de solución de sales de Kirk (Kirk et al., 1978) y 10 ml de lignina Kraft a pH 5. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y se inoculó con 5 ml de cultivos previos de los hongos *Gloeophyllum trabeum* y *Phanerochaete chrysosporium*.

Cada cultivo se mantuvo a 37 °C durante 6 días y se analizaron las actividades enzimáticas presentes en el sobrenadante según la metodología utilizada por Lopretti et al. (2010).

Posteriormente, se realizó una despolimerización oxidativa de la lignina (200 ml de solución que contenía 50 g de madera de *Eucalyptus grandis* con 25 % de lignina) con los extractos enzimáticos obtenidos (50 ml de extracto enzimático). La reacción se llevó a cabo en un sistema agitado a 37 °C durante 15 días. Luego se bajó el pH de la solución a 4.00 con HCl 0.1 M para precipitar el polímero, y se analizó el sobrenadante.

### Análisis de las fracciones fenólicas

Se determinó el perfil de las fracciones fenólicas por espectrofotometría UV (Thermo scientific. Mod. Evolution 160 UV\_Vis) realizando un barrido de longitudes de onda entre 200 nm y 700 nm. (Tien Ming, 1988; Lopretti et al., 1998).

## Resultados y Discusión

### Estudio de condiciones metabólicas de los mutantes

En la Figura 1 se presentan los resultados del estudio metabólico de las cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* M522 y de la cepa original. Las cepas 4 y 9 no presentaron crecimiento adecuado en ninguna de las condiciones ensayadas, lo que hace suponer que las mutaciones introducidas en su genoma provocaron cambios que afectaron su viabilidad. Con respecto a la capacidad de crecimiento en un medio como el YPD, medio óptimo para las levaduras, los demás mutantes presentaron un crecimiento adecuado; las cepas SacSV-8 y SacSV-10 (Figura 2) mostraron un comportamiento más parecido al de M522. Cuando el medio YPD fue complementado con glucosa a una concentración de 40 g/L, las cepas SacSV-5, 6, 7, 8 y 10 se comportaron mejor que la M522, con una mayor proliferación en el medio YPD. Con respecto a los ensayos de temperatura extrema todas las cepas evidenciaron muy poco crecimiento. Al complementar el medio con 10 % de alcohol la cepa M522 mostró la mejor respuesta, y fue similar, aunque menor, la observada para las cepas SacSV-10 y 3.

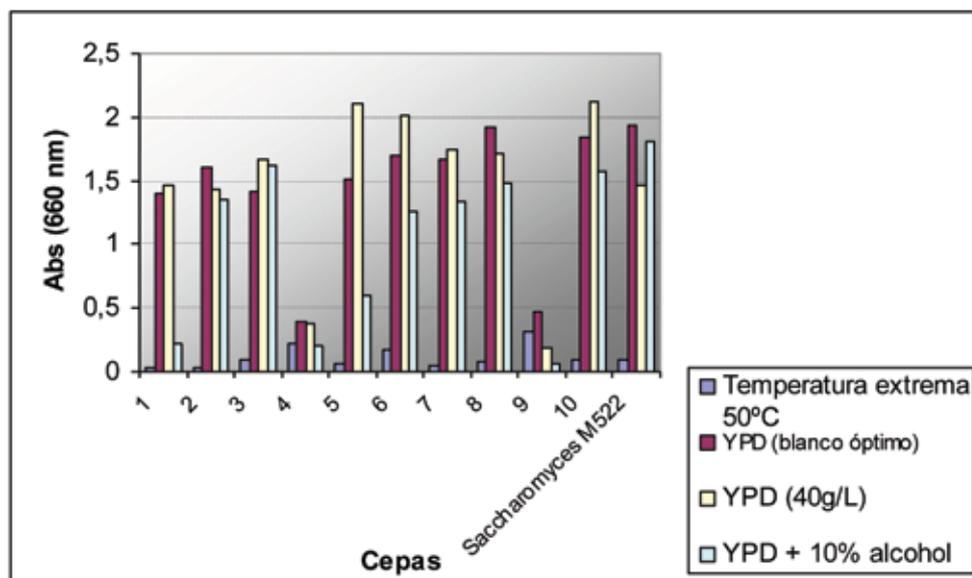


Figura 1. Comportamientos de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* M522 y de la colección de mutantes en las diferentes condiciones metabólicas ensayadas.

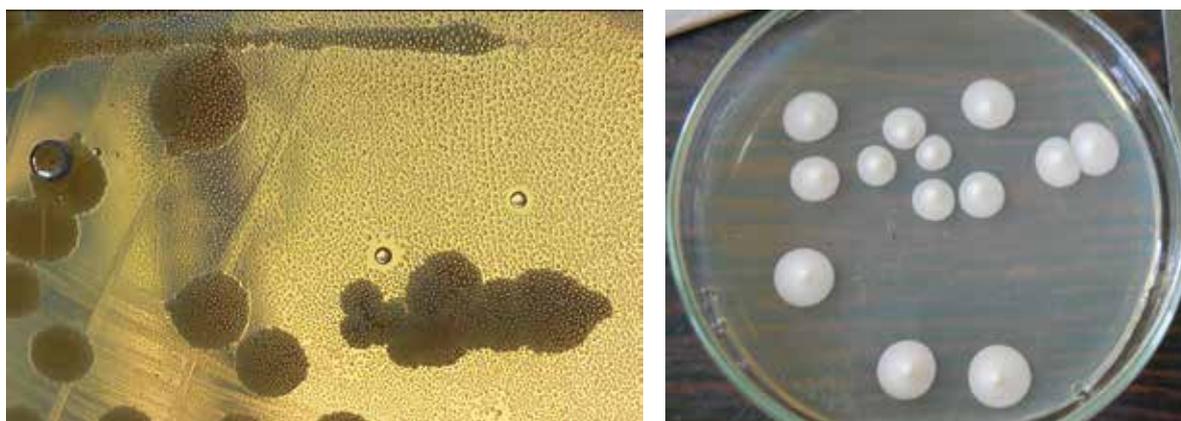


Figura 2. *Saccharomyces cerevisiae* spp. SacSV-10 obtenida por  $\gamma$ -irradiación.

### Tolerancia de la cepa SacSV-10 a los productos de degradación de la lignina

La cepa SacSV-10 se comportó de manera similar en los medios complementados con los productos de degradación de la lignina de diferentes pesos moleculares (lixiviado decantado y lixiviado superficial) y en el medio sin lignina (Figura 3). En todos los casos el cultivo alcanzó la fase de mantenimiento a las cuatro horas de tratamiento con una concentración de  $10 \times 10^7$ . Según estos resultados, no se observa un efecto significativo de los productos de degradación de la lignina sobre la levadura en las condiciones ensayadas.

### Tratamiento de modificación de la lignina

Los resultados de los ensayos de actividad evidencian la presencia de tres enzimas lignina peroxidasa, laccasa y desmetilasa. Con respecto a las actividades, la lignina peroxidasa presentó mayor actividad 108 UE/ml, seguida de laccasa con 85 UE/ml y la desmetilasa con 64 UE/ml.

### Análisis de las fracciones fenólicas

El tratamiento con *G. trabeum* y *P. chrysosporium* oxidó y despolimerizó la lignina, y se obtuvieron productos con absorbancias que se muestran en la Tabla 1. Pueden observarse los picos a 310 nm y 354 nm que aparecen luego del tratamiento biológico: estos corresponden al aldehído veratrílico (310 nm) y al ácido veratrílico (354 nm), los cuales son monómeros de la degradación de lignina (Tien Ming, 1988; Lopretti et al., 1998).

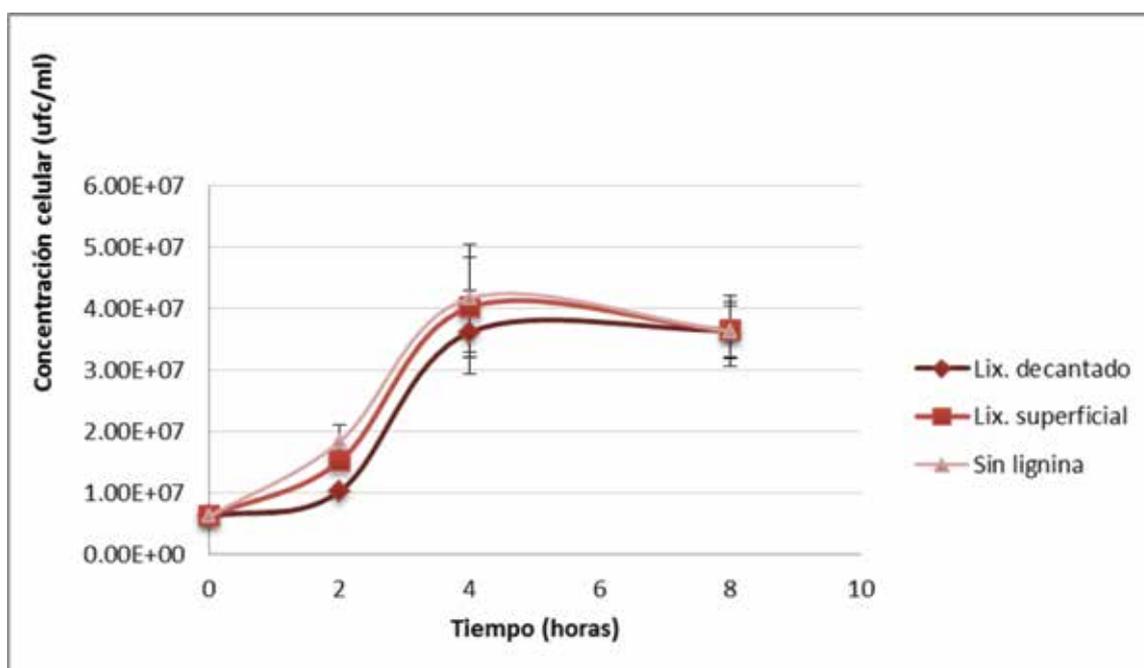


Figura 3. Curvas de crecimiento en los diferentes medios complementados con los productos de degradación de la lignina de diferentes pesos moleculares.

Tratamiento	Longitudes de onda (nm)	Intensidad del pico
Lignina sin tratamiento	280	0.670
	310	0.008
	354	---
Ligninas con tratamiento	280	0.235
	310	0.210
	354	0.125

Tabla 1. Análisis por espectrofotometría de la lignina pre y post tratamiento.

## Conclusiones

Los resultados de los ensayos en el medio complementado con glucosa 40 g/L sugieren que las levaduras mutantes y la M522 no sufren saturación por sustrato a estas concentraciones. En ensayos futuros se deberán evaluar concentraciones de glucosa superiores y la capacidad de crecimiento con otros azúcares como fuente de carbono, por ejemplo, xilosa.

La temperatura ensayada de 50 °C afectó de manera significativa el desarrollo de todas las cepas estudiadas. En ensayos futuros se deberán evaluar temperaturas intermedias entre la óptima y la seleccionada a efectos de determinar la máxima temperatura a la cual se podría realizar el cultivo para los ensayos de sacarificación y fermentación en simultáneo, con el objetivo de trabajar a una temperatura próxima a la óptima de actividad de las enzimas celulasas.

En las fracciones fenólicas se identificaron enzimas laccasa, desmetilasa y lig-peroxidasa que fueron las responsables de la producción de monómeros fenólicos de lignina que aparecen en procesos de hidrólisis para obtención de azúcares fermentables y que actúan generalmente como inhibidores del crecimiento de las levaduras tradicionales.

Se obtuvo una cepa (SacSV-10) con las mismas características de cultivo que la M522 en YPD. Se logró cultivar la cepa en un caldo con 10 % de etanol, que toleró el efecto de los productos de degradación de la lignina, así como una concentración de glucosa de 40 g/L, y se obtuvo en condiciones anaerobias una biomasa mayor que para la M522.

En conclusión, SacSV-10 es un prometedor candidato para usar en producciones de alcohol a partir de residuos lignocelulósicos.

## Referencias

- CARREÓN, O.; RAMOS, A.; CENTENO, S.; LEAL, L.; MARTÍNEZ, A.; FERNÁNDEZ, M. Etanol Carburante. En: *BioTecnología*. 2009, 13(3):79-102.
- CUERVO, C.; FOLCK, J.; QUIROZ, R. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. En: *BioTecnología*. 2009, 13(3):11-25.
- FERNÁNDEZ, J.; LUCAS, H.; BALLESTEROS, M. *Energías renovables para todos: biocarburantes*. Madrid: Haya Comunicación, 2011.
- KIRK, T.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.; LORENZ, L.; ZEIKUS, J. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Archives of Microbiology*. 1978, 117:227-235.
- LOPRETTI, M. Technical feasibility to produce modified phenols from lignocellulosic materials. En: *EUBC&E*. 2010, 1519-1521.
- LOPRETTI, M.; CABELLA, D.; MORAIS, J.; RODRIGUES, A. Demethoxylation of lignin-model compounds with enzyme extracts from *Gloeophyllum trabeum*. En: *Process Biochemistry*. 1998, 33:657-66.
- MARISCAL, J. *Evaluación y selección de microorganismos para la producción de etanol a nivel industrial*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Colombia, 2011.
- MEJÍA, L.; ALBÁN, D.; MURCIA, N.; CUERVO, R.; DURÁN, J. Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica L*) utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* spp y cepa recombinante RH 218. En: *Revista Científica Guillermo de Ockham*. 2009, 7(2):51-64.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, A.; DE LA RUBIA, T.; MARTINEZ, E. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. En: *Int. Microbiol.* 2002, 5:53-62.
- SÁNCHEZ, O.; CARDONA, C. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. En: *INCI*. 2005, 30(11):671-678.
- SURESH, K.; KIRAN, N.; VENKATESWER, L. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. En: *Bioresource Technology*. 1999, 68:301-304.
- TIEN MING, K. Lignin peroxidase of *phanerochaete chrysosporium*. En: *Methods in Enzymology*. 1988, 238-249.
- VALDIVIESO, M. *Obtención y caracterización de cepas de Saccharomyces cerevisiae productoras de glutatión*. Granada: Universidad de Granada, España, 2006.
- VINCI, V.A.; BANG, G. *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. ASM: Washington, 1999. pp.103-113.
- YU, Z.; ZHANG, H. Pretreatment of cellulose pyrolysate for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp.* YZ1 and *Zymomonas mobile*. En: *Biomass Bioenerg.* 2003, 24:257-263.

# Ensamblado de ficocianina sobre TiO<sub>2</sub> nanoestructurado para celdas fotovoltaicas

## Phycocyanin assemblies onto nanostructured TiO<sub>2</sub> for photovoltaic cells

Enciso, Paula <sup>(1)</sup>, Minini, Lucía <sup>(1,2)</sup>, Álvarez, Beatriz <sup>(3)</sup>, Cerdá Bresciano, María Fernanda <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(2)</sup>Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(3)</sup>Laboratorio de Enzimología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

Contacto: fcerda@fcien.edu.uy

Recibido: 14/6/2012 - Aprobado: 28/9/2012

### Resumen

El empleo de fuentes renovables de energía resulta de creciente importancia en la actualidad debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles y a los daños medioambientales que estos causan. La posibilidad de utilizar la energía solar es de gran interés, dado que se trata de la fuente más ampliamente distribuida en el planeta. Las celdas solares son dispositivos con capacidad de convertir la energía proveniente de la radiación solar en energía eléctrica. Entre ellas, las celdas solares sensibilizadas con pigmentos representan una alternativa a las convencionales de silicio por su menor costo y su simple proceso de fabricación. Contienen una película de material semiconductor cubierta con pigmentos coloreados adsorbidos a su superficie que funcionan como antenas capaces de captar energía en el rango visible del espectro. En este trabajo se sintetizó TiO<sub>2</sub> nanoestructurado y se utilizó la proteína ficocianina como sensibilizador de la celda. Se caracterizó el TiO<sub>2</sub> por microscopía electrónica, difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja (FTIR). La ficocianina fue extraída a partir de cápsulas comerciales de *Spirulina* spp. El proceso de ensamblado del electrodo que contiene TiO<sub>2</sub> y ficocianina fue seguido por voltamperometría cíclica y por FTIR. Los resultados fueron consistentes con un correcto armado del electrodo fotosensibilizado con ficocianina.

Palabras clave: Energía solar, nanoestructuras, pigmentos.

### Abstract

The use of renewable energies is of increasing importance due to depletion of fossil fuel sources and environmental damages caused by their utilization. The energy available from the sun is clean and widely distributed. Solar cells are devices used to convert solar energy into electricity. Among them, dye sensitized solar cells are an interesting alternative to conventional silicon ones, because of their low cost and simple assembly process. They are made of a semiconductor with colored dyes adsorbed onto the surface that work as antennas to catch energy in the visible range of the spectra. In this work, nanostructured TiO<sub>2</sub> was synthesized and the protein phycocyanin was used as dye. TiO<sub>2</sub> was characterized by electron microscopy, X ray diffraction and infrared spectroscopy (FTIR). Phycocyanin was extracted from commercial *Spirulina* spp. capsules. The assembly process of the electrode covered with TiO<sub>2</sub> and phycocyanin was controlled by cyclic voltammetry and FTIR.

Results were in accordance with the assembling of an electrode sensitized with phycocyanin.

Keywords: Solar energy, Nanostructures, Dyes.

## Introducción

La utilización de combustibles fósiles se ha incrementado notoriamente desde la Revolución Industrial, lo que ocasiona un grave problema debido a su limitada disponibilidad. Al ritmo actual de consumo las reservas de petróleo, gas natural y carbón se agotarían en unos 100 años, fecha que será más cercana si el consumo aumenta, tal como se prevé para países en vías de desarrollo (Bard, 2004). Por otra parte, los daños ambientales que produce el uso masivo de estas fuentes de energía, conjuntamente con el desarrollo de la industrialización global, la utilización de nuevas tecnologías y el crecimiento de la población mundial, cobran cada vez mayor importancia dadas sus desastrosas consecuencias. La lluvia ácida, la contaminación del aire y del agua, la disminución del ozono troposférico y la acumulación de gases invernaderos son algunos de

los resultados de la quema de combustibles fósiles. La acumulación de gases como dióxido de carbono, metano y óxido nitroso provoca un aumento de la temperatura conocido como calentamiento global. Este hecho desata fenómenos climáticos que provocarán cambios en la diversidad biológica en el sector agrícola, que agudizarán la escasez de alimentos, la disminución del agua dulce disponible y tendrán, asimismo, efectos en la salud humana (Bahadori y Vuthaluru, 2010; Poortinga et al., 2011).

Estas razones han generado un creciente interés por el desarrollo de fuentes alternativas de energía renovables que sean capaces de satisfacer la demanda global energética que sigue en aumento y que eviten, al mismo tiempo, riesgos ambientales. Entre las posibles, la energía solar es la fuente de energía más promisoría del futuro, ya que además de ser un recurso renovable, se encuentra distribuida espacial y temporalmente (Bisquert et al., 2004; Kelly y Gibson, 2011).

El uso de celdas solares posee muchas ventajas sobre los métodos usados en la actualidad para generar electricidad: no produce contaminantes, no precisa de ningún suministro exterior de combustible y promueve la investigación mediante la búsqueda de mejoras en los sistemas actuales (Dincer, 2000).

Uruguay presenta niveles de irradiación solar considerables, lo que favorece la utilización de este tipo de energía (Abal et al., 2010). Tradicionalmente se han utilizado celdas solares que emplean materiales semiconductores como el silicio, las cuales alcanzan una eficiencia de conversión energética del 25 % en el laboratorio y del 15 % en paneles comerciales (para monocristales de silicio). Sin embargo, sus costos de manufactura y administración son altos (entre 110 y 300 US\$/m<sup>2</sup> para una eficiencia del 12 %). En este contexto surgen como una alternativa de interés las celdas solares sensibilizadas con pigmentos, DSSC (por su sigla en inglés). Existen estudios que estiman que el costo para celdas orgánicas se encuentra entre US\$ 50 y US\$ 140/m<sup>2</sup> –incluye materiales, procesos, mantenimiento y gastos generales–, y se asume una eficiencia del 5 %, lo que conduce a un valor de entre US\$ 1,00 y US\$ 2,83/Wh (Kalowekamo y Baker, 2009).

Una celda DSSC típica contiene una película de material semiconductor mesoporoso y nanoestructurado con una amplia brecha energética (en general TiO<sub>2</sub>) cubierta con una monocapa de moléculas de pigmentos adsorbidos a la superficie del semiconductor. Por su parte, el semiconductor se deposita sobre un óxido transparente conductor como el de estaño e indio (ITO, proveniente del inglés Indium Tin Oxide), a través del cual se ilumina la celda. Los pigmentos coloreados tienen la capacidad de absorber energía de la luz solar en el rango visible del espectro, excitando sus electrones y transfiriéndolos posteriormente al semiconductor, que a su vez los transfiere al ITO. De esta manera, el pigmento se oxida y el ITO se comporta como ánodo. Todo el ensamblado se pone en contacto con una solución de electrolito redox, usualmente I<sub>2</sub>/I<sub>3</sub><sup>-</sup>, que actúa como conductor y el circuito se cierra con un electrodo de platino (Naazeruddin et al., 2011; Grätzel, 2005). Sobre el platino ocurre la reducción del yodo a yoduro, el cual posteriormente actúa sobre el pigmento oxidado regenerándolo a su forma reducida. El pigmento está pronto para comenzar nuevamente el ciclo, y lo mismo sucede con el yodo.

En este trabajo se preparó un ensamblado de ITO/TiO<sub>2</sub> mesoporoso nanoestructurado sensibilizado con un pigmento natural. Con este objetivo se usó como antena para captar la luz solar a la ficocianina, una proteína verde-azulada que se puede encontrar en algas y cianobacterias. Esta proteína fue elegida por su alto coeficiente de absorptividad ( $\epsilon = 2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 621 nm) y su bajo costo comparado con el de los pigmentos que se sintetizan con tal finalidad, hechos que la hacen atractiva para ser usada en celdas DSSC. La utilización de ficocianina posibilita la unión con la superficie del semiconductor TiO<sub>2</sub> a través del grupo carboxílico (-COOH) de los cromóforos. La ficocianina pertenece al grupo de pigmentos antena conocidos como ficobiliproteínas, que participan de la fotosíntesis. Se encuentran organizadas en complejos supramoleculares llamados ficobilisomas, que forman arreglos regulares en la superficie externa de la membrana tilacoidal. Los cultivos de algas y cianobacterias que presentan ficobiliproteínas no son contaminantes y son renovables, por lo que se ha incrementado su uso como fuente de pigmentos naturales (Thoren y Connell, 2006; Yan y Zhu, 2011).

Esta propuesta involucra la extracción de ficocianina a partir de cápsulas comerciales de *Spirulina spp.*, la síntesis y caracterización del material mesoporoso de dióxido de titanio y el estudio del ensamblado ITO/TiO<sub>2</sub> así como ITO/TiO<sub>2</sub>/ficocianina.

## Materiales y Métodos

### Extracción de la ficocianina a partir de cápsulas de *Spirulina spp*

Para obtener el extracto crudo se mezcló el contenido de tres cápsulas (aproximadamente 1 g) con 20 ml de agua destilada, centrifugando a 8000 g por 20 min a temperatura ambiente.

### Purificación de la ficocianina a partir del extracto crudo y evaluación de su estabilidad térmica

La purificación se realizó usando (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como reactivo de precipitación. Para esto se agregó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 10 ml de extracto crudo hasta alcanzar un 20 % de saturación. Se dejó precipitar por 30 min a 0 °C, y se centrifugó a 8000 g por 20 min a temperatura ambiente. El precipitado obtenido se redisolvió en amortiguador fosfato, pH = 7,5, y se almacenó. Al sobrenadante se le adicionó (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta llegar a un 50 % de saturación, luego se precipitó y centrifugó nuevamente.

El proceso fue seguido por medidas de absorbancia UV-visible, seleccionándose la fracción con mayor cociente Abs<sub>621</sub>/Abs<sub>280</sub>. La muestra elegida presentó una concentración salina alta, por lo cual fue necesario aplicar un proceso de diálisis posterior.

La estabilidad térmica de la ficocianina se evaluó en un intervalo de temperaturas de 20 °C a 80 °C, monitoreándose la disminución de absorbancia a 621 nm. Esta disminución se debe a que la ficocianina desnaturalizada pierde la capacidad de absorber a este valor de longitud de onda. Las soluciones de la proteína se colocaron en baño termostático durante 15 minutos, luego de lo cual fueron medidas.

### Síntesis y caracterización del electrodo de TiO<sub>2</sub> mesoporoso y nanoestructurado

La síntesis del electrodo fue realizada a partir de una solución de 24,0 g de butóxido de titanio (97 %) en etanol con un porcentaje en masa 1:7 (Chen y Mao, 2007). Esta solución fue prehidrolizada por 3 h a temperatura ambiente en presencia de 0,32 ml de solución acuosa de ácido nítrico 0,28 M. Posteriormente, se agregó 0,32 ml de agua destilada a la solución prehidrolizada, sometiéndola a agitación vigorosa por 2 h adicionales. Este compuesto se mantuvo en un recipiente cerrado a temperatura ambiente sin agitación para lograr su gelificación y envejecimiento. Luego de 14 días, el gel húmedo fue removido del recipiente y se dejó secar durante unos días más para remover los solventes. El TiO<sub>2</sub> ya seco fue lavado tres veces en centrifuga con agua y etanol y se dejó reposar a temperatura ambiente. Por último, se calcinó el material por 4 h a 450 °C en mufla y se obtuvo el material a utilizar (Liu et al., 2004).

La caracterización de este material se realizó por microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB), difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía infrarroja (FTIR).

### Obtención y estudio del ensamblado ITO/TiO<sub>2</sub>

El material calcinado fue adsorbido sobre un electrodo transparente cubierto con un óxido conductor, ITO, mediante la formación de una pasta con ácido acético 0,05 M que se depositó sobre el ITO. Se dejó secar a temperatura ambiente durante unos minutos y se colocó 25 minutos a 350 °C en la mufla. Dicha adsorción se controló por medidas de voltamperometría cíclica, tanto en solución de KI 0,1 M como en solución 1 mM de hexacianoferrato(II)/(III) de potasio en NaClO<sub>4</sub> 0,1 M. También se estudió la estabilidad del ensamblado al someterlo a ultrasonido.

## Adsorción de la ficocianina sobre la superficie del ensamblado ITO/TiO<sub>2</sub>

Se procedió a adsorber la ficocianina sobre el ensamblado TiO<sub>2</sub>-ITO por simple deposición de la proteína durante 24 h a 4 °C. Esta adsorción se evaluó mediante FTIR.

## Resultados y Discusión

### Extracción y purificación de la ficocianina

Tal como se explicitó anteriormente, el proceso fue seguido por medidas de absorbancia. De acuerdo a estas medidas se optó por almacenar la solución del precipitado obtenido con solución al 50 % de sulfato de amonio. Esta decisión se basó en el hecho de que en este precipitado la relación de absorbancias 621 nm a 280 nm fue máxima, indicando la presencia de una cantidad de contaminante mínima. Además, y como se expresa en la Tabla 1, los procesos de extracción y purificación fueron satisfactorios, ya que se pudo observar un aumento en el índice de pureza.

El índice de pureza se calculó como  $A_{620}/A_{280}$ , donde la  $A_{620}$  representa la absorbancia de la ficocianina y la  $A_{280}$  representa la absorbancia correspondiente a todas las proteínas en solución. El factor de purificación se calculó como el índice de pureza de la etapa en estudio respecto al de la etapa inicial.

Etapa	Índice de pureza	Factor de purificación
Extracción	0,19	1
Precipitación	0,69	3,6

Tabla 1. Seguimiento de la purificación según la variación del factor de purificación calculado a través de la relación de absorbancias 621 a 280 nm.

### Estabilidad térmica de la proteína

Con respecto a las medidas de evaluación de la estabilidad térmica de la ficocianina, se obtuvo una temperatura de transición de 50 °C (Figura 1). Este hecho podría generar inconvenientes para su posible uso en celdas solares DSSC, dado que las temperaturas a las que son expuestas pueden alcanzar, en algunos casos, valores superiores.

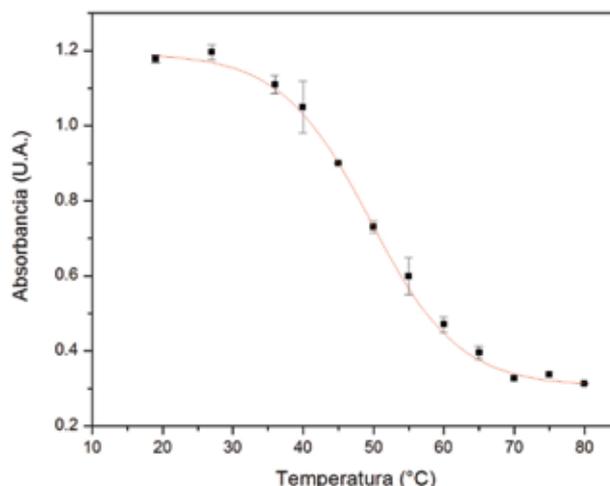


Figura 1. Evaluación de la desnaturalización térmica de la ficocianina, seguida por medidas de absorbancia a 621 nm. Los valores en el eje Y se muestran normalizados por el máximo valor de la absorbancia medida.

### Caracterización del TiO<sub>2</sub> mesoporoso y nanoestructurado

Para realizar la caracterización del semiconductor TiO<sub>2</sub> preparado de acuerdo a la síntesis consignada, se prepararon dos muestras: una antes de calcinar y otra después de calcinar a 450 °C. En el estudio por MET se distinguen, en ambas fotos (Figura 2), partículas esféricas

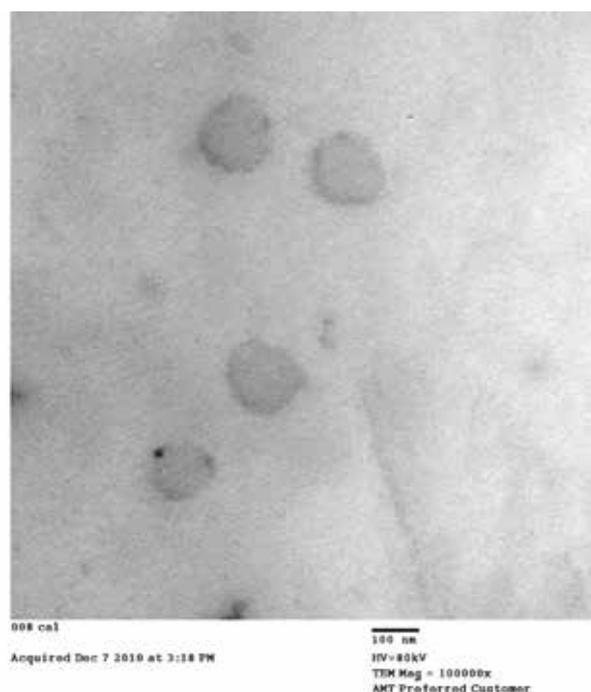
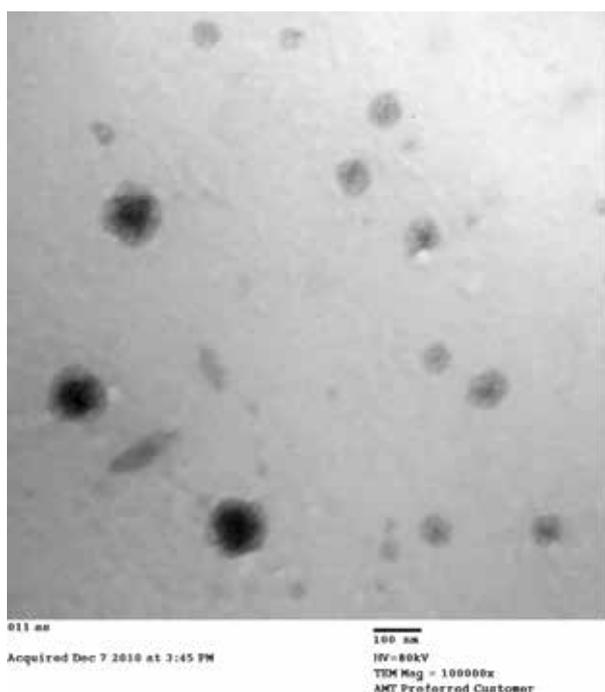


Figura 2. Imágenes obtenidas por MET de la muestra proveniente del TiO<sub>2</sub> sin calcinar (izquierda) y del TiO<sub>2</sub> calcinado (derecha).

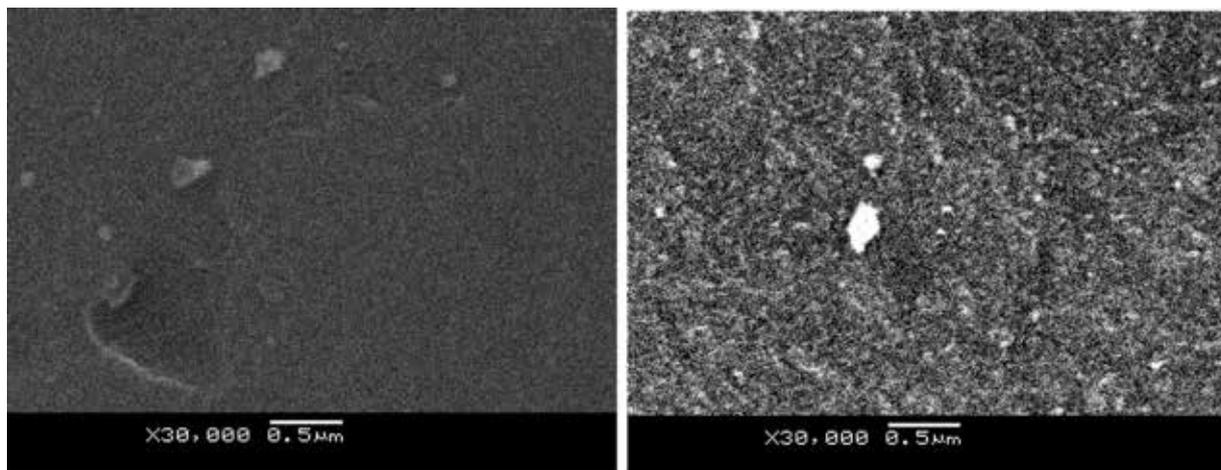


Figura 3. Imágenes de MEB de la muestra proveniente del  $\text{TiO}_2$  sin calcinar (izquierda) y de la muestra tomada de  $\text{TiO}_2$  calcinado (derecha).

o globulares con tamaños de entre 80-200 nm. Dichas partículas son aglomerados de otras más pequeñas, de 10 nm aproximadamente, que no presentan un orden definido. Estos aglomerados, al permanecer prácticamente intactos después de su exposición a 450 °C, permiten confirmar la estabilidad térmica del electrodo  $\text{TiO}_2$ , propiedad característica de los materiales mesoporosos.

Por su parte, al estudiar el material por microscopía MEB (Figura 3), la diferencia más notoria entre ambas muestras fue la obtención de una superficie homogénea y lisa para el material conseguido antes de calcinar, mientras que para el material calcinado se observa una muestra muy rugosa. Algunos autores definen esta estructura rugosa como “agujeros de gusano” donde los canales se forman al azar por las partículas esféricas o globulares para formar la estructura mesoporosa tridimensional (Hagfeldt y Graetzel, 2000; Chen y Mao, 2007).

Las muestras también fueron evaluadas por difracción de rayos X. En el perfil de difracción de la muestra sin calcinar no se observan picos, lo que permite establecer que no existe una estructura química del  $\text{TiO}_2$  predominante, es decir, la muestra puede considerarse amorfa (Figura 4). Sin embargo, en el perfil de difracción de la muestra calcinada se observan cuatro picos bien definidos a 25°, 38°, 48° y 54°, lo que concuerda con el patrón de la estructura anatasa del  $\text{TiO}_2$ . Las altas intensidades de los picos, sobre todo del pico a 25°, señalan que la forma anatasa es el componente principal detectable por la técnica empleada en el análisis en la muestra. Por medio del difractograma

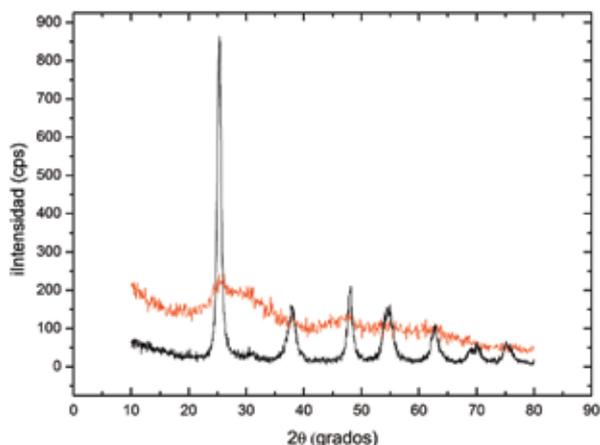


Figura 4. Patrón de difracción de rayos X de la muestra de  $\text{TiO}_2$  antes de calcinar (en rojo) y después de ser calcinada (en negro).

puede determinarse el tamaño de las partículas de  $\text{TiO}_2$  más pequeñas, según la ecuación de Scherrer,  $d = 0,9 \lambda / \beta \cos \theta$  donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación de rayos X,  $\beta$  es el ancho en la mitad del valor máximo del pico más intenso (en radianes) y  $\theta$  es el ángulo de difracción. En este caso  $\lambda$  presenta un valor de 1,5418 Å,  $\beta$  es 0,0145 y el ángulo  $2\theta$  es igual a 25°, lo que conduce a un tamaño de partícula de 9,8 nm que concuerda con lo esperado (Thompson et al., 2006).

La calcinación arrojó entonces resultados favorables para continuar con los análisis de ensamblado ITO/ $\text{TiO}_2$ , dado que era necesario estar en presencia de anatasa por su mayor actividad fotocatalítica.

Por FTIR también se evaluaron las muestras de  $\text{TiO}_2$ . Analizando los espectros y según la bibliografía, las dos estructuras químicas de  $\text{TiO}_2$  (rutilo y anatasa) presentan picos de absorción característicos alrededor de 800  $\text{cm}^{-1}$ . No obstante, difieren en su absorción cercana a 400  $\text{cm}^{-1}$ , número de onda al cual absorbe la anatasa pero no el rutilo, confirmando por FTIR lo observado por las otras técnicas de caracterización.

### Caracterización del ensamblado ITO/ $\text{TiO}_2$ /ficocianina

Mediante FTIR también se estudió la interacción entre  $\text{TiO}_2$  y la ficocianina. En este caso el espectro obtenido (Figura 5) presenta varias diferencias con respecto a los espectros anteriores de  $\text{TiO}_2$ . Se observan varios picos correspondientes a enlaces presentes en la ficocianina, como los del enlace C-O (920 y 940  $\text{cm}^{-1}$ ), el enlace H-C-H (1300  $\text{cm}^{-1}$ ), el enlace C=C (1630 y 1680  $\text{cm}^{-1}$ ), el enlace C=O (1720  $\text{cm}^{-1}$ ), el enlace C-H (2800 y 3000  $\text{cm}^{-1}$ ), el enlace amina (3320 y 3480  $\text{cm}^{-1}$ ) y el enlace O=C-OH (3550  $\text{cm}^{-1}$ ) (Mayo et al., 2003). Este resultado indica que efectivamente la ficocianina está presente en la muestra sobre la película nanoestructurada de  $\text{TiO}_2$ .

Con respecto a los datos obtenidos por voltamperometría cíclica, para el electrodo de ITO en medio KI 0,1 M se observó un perfil resultante de la superposición de dos procesos: el relacionado con la cupla  $\text{I}^-/\text{I}_2$  y el relacionado con la óxido-reducción del agua. En cambio, al usar el ensamblado de ITO/ $\text{TiO}_2$  el perfil cambió notoriamente y desaparecieron en su totalidad las contribuciones de los procesos catódicos. Este resultado es compatible con la existencia de una especie adsorbida sobre el electrodo, el dióxido de titanio, que impide que ocurran reacciones electroquímicas en la superficie del electrodo.

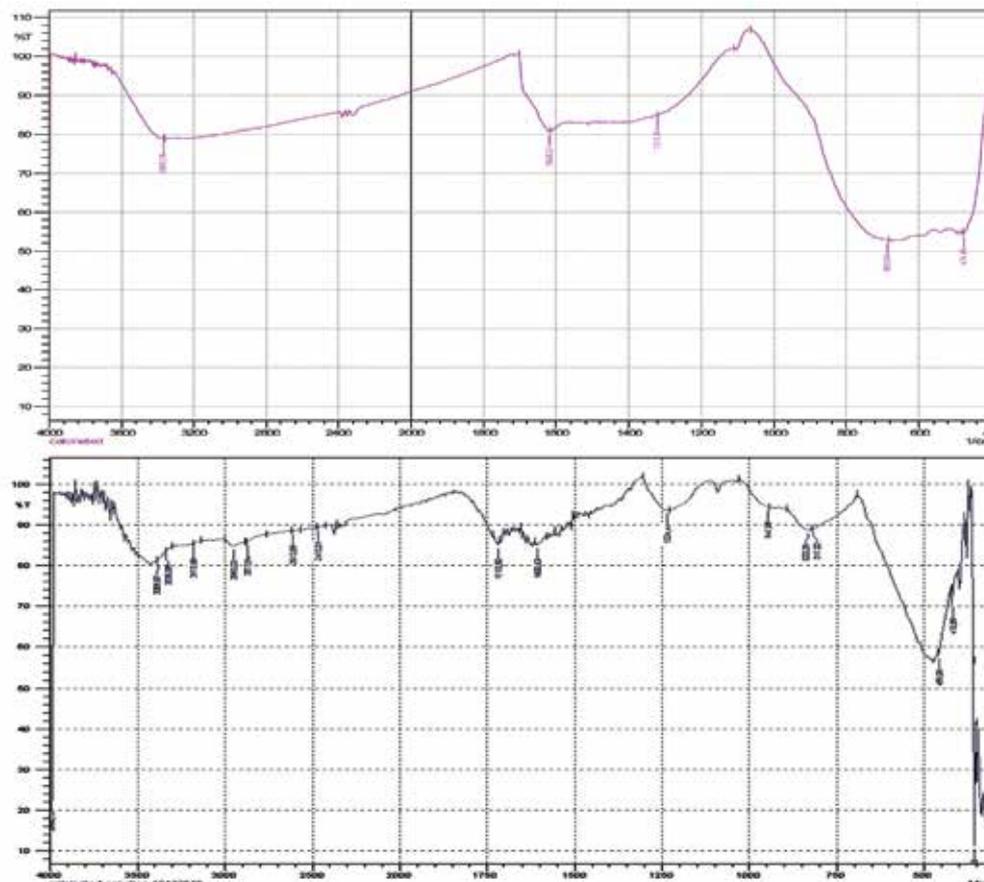


Figura 5. Espectro infrarrojo del:  $\text{TiO}_2$  luego de calcinar (arriba) y del ensamblado ITO/ $\text{TiO}_2$  con ficocianina depositada sobre su superficie (abajo).

Al utilizar la solución 1 mM en hexacianoferrato(II)/III) de potasio en soporte, algunos cambios en el perfil voltamperométrico son observados respecto a los obtenidos en presencia de yoduro (Figura 6). Sobre ITO desnudo se observa claramente la cupla involucrada, con intensidades de pico acordes a una reacción electroquímica que ocurre en régimen de capa fina, donde el electrodo tiene una estructura irregular que solo permite que la especie pueda acceder a determinados espacios de la superficie en los cuales existen poros o zonas desnudas. En este caso, el ITO está compuesto por un vidrio conductor, óxidos de estaño e indio que son quienes forman la estructura irregular sobre el vidrio.

La principal diferencia entre el ensamblado que tiene dióxido de titanio adsorbido con respecto al ITO desnudo es que el primero presenta mayores intensidades de pico en su perfil voltamperométrico, lo cual podría explicarse por un aumento del área en contacto con el electrolito. Este resultado muestra que la especie electroactiva puede llegar sin dificultades a la superficie del electrodo para reaccionar, lo que concuerda con que solamente pueden acceder especies aniónicas a esta superficie.

Cabe destacar que en algunos estudios se observó la presencia de un pico anódico doble, proveniente de la superposición del proceso de difusión con el de adsorción de las especies involucradas, dado que la cupla utilizada puede formar enlaces con el  $\text{TiO}_2$  (Bard y Faulkner, 2001).

La estabilidad del ensamblado ITO/ $\text{TiO}_2$  se estudió por medio de su exposición a sesiones de ultrasonido durante periodos de 15 minutos. La ausencia de cambios en el perfil voltamperométrico antes

y después de este proceso fue tomada como indicativo de la estabilidad de la adsorción. Luego de 30 minutos de exposición a ultrasonido, se observó el desprendimiento del  $\text{TiO}_2$  desde la superficie del ITO.

Con respecto a la adsorción de ficocianina, no pudo comprobarse por medidas electroquímicas debido probablemente a la poca cantidad de proteína adsorbida sobre el ensamblado.

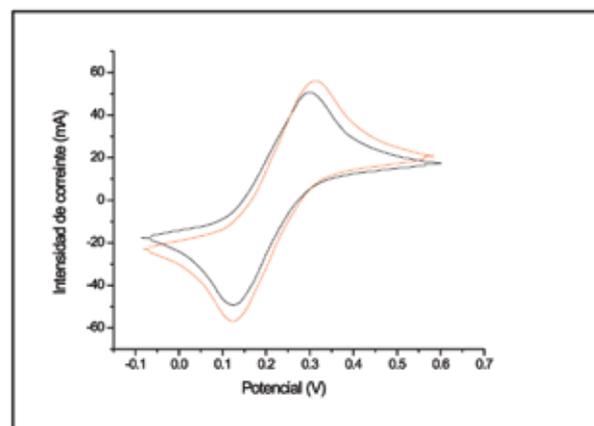


Figura 6. Perfil voltamperométrico en 1 mM de hexacianoferrato (II)/ (III) de potasio en  $\text{NaClO}_4$  0.1 M para electrodo de ITO desnudo (línea negra) y ensamblado ITO/ $\text{TiO}_2$  (línea roja).

## Conclusiones

El proceso de extracción seguido fue eficiente y sencillo, y permitió obtener fracciones ricas en ficocianina. Esto haría posible la posterior utilización de estas fracciones para su ensamblado en el electrodo que forma parte de la celda DSSC. Pero los estudios de estabilidad mostraron como problema una relativamente baja temperatura de transición de 50 °C para la ficocianina, lo que podría afectar la eficiencia de conversión energética de la celda en funcionamiento.

Por otra parte, el material mesoporoso nanoestructurado de TiO<sub>2</sub> sintetizado presentó una estructura química de anatasa. A su vez, el tamaño de las partículas, entre 80 nm y 200 nm, y su disposición en forma de “canales de agujeros de gusano” le confieren al material una gran actividad fotocatalítica acorde a lo necesario para componer una celda DSSC.

El ensamblado ITO/TiO<sub>2</sub> fue obtenido por deposición del TiO<sub>2</sub> sobre la superficie del ITO calcinando a 350 °C, comprobándose su adherencia y estabilidad por voltamperometría cíclica.

Sin embargo, no se pudo lograr una buena adsorción entre la ficocianina y el ensamblado. Los estudios por FTIR establecieron que la proteína se encontraba presente en bajas cantidades sobre la superficie del electrodo modificado de ITO/TiO<sub>2</sub>, dada la detección de los picos de absorción a números de onda característicos de enlaces presentes en la proteína. Además, y si bien los espectros mostraron la presencia de ficocianina sobre el ensamblado, la absorción de la proteína sobre este fue muy débil, ya que las intensidades de las señales correspondientes al enlace Ti-OH fueron muy bajas. No obstante, como la celda se compone de dos láminas delgadas muy próximas que contienen entre ambas la solución de I/I<sub>2</sub>, el posible despegado de la ficocianina desde el TiO<sub>2</sub> no afectaría su funcionamiento, porque por difusión la proteína continuaría cerca de la superficie del electrodo, manteniendo la capacidad de transferir electrones hacia el material nanoestructurado con buena eficiencia.

## Reconocimientos

Al Dr. Leopoldo Suescun (Facultad de Química) por la realización de las medidas de DRX. Al Dr. Eduardo Méndez (Facultad de Ciencias). A la ANII, CSIC y PEDECIBA Química por su financiación.

## Referencias

- ABAL, Gonzalo; CATALDO, José; D'ANGELO Martín; GUTIERREZ Angel. *Mapa solar del Uruguay* [En línea]. [Consulta: 15 de agosto de 2012]. Disponible en <http://www.fing.edu.uy/if/solar/>.
- BAHADORI, Alireza; VUTHALURU, Hari B. Estimation of potential savings from reducing unburned combustible losses in coal-fired systems. En: *Applied Energy*. 2010, 87(12):3792-3799.
- BARD Allen; FAULKNER, Larry. *Electrochemical Methods: Fundamentals and applications*. 2a ed. Estados Unidos: John Wiley and Sons, 2001.
- BARD, Edouard. Greenhouse effect and ice ages: historical perspective. En: *C. R. Geoscience*. 2004, 336:603-638.
- BISQUERT, Juan; CAHEN, David; HODES, Gary; RÜHLE, Sven; ZABAN, Arie. Physical chemical principles of photovoltaic conversion with nanoparticulate, mesoporous dye-sensitized solar cells. En: *Journal Physics Chemistry. B*. 2004, 108(24):8106-8118.
- CHEN, Xiaobo; MAO, Samuel. Titanium dioxide nanomaterials:

synthesis, properties, modifications, and applications. En: *Chemical reviews*. 2007, 107(7):2891-959.

- DINCER, Ibrahim. Renewable energy and sustainable development: a crucial review. En: *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2000, 4(2):157-175.
- GRÄTZEL, Michael. Solar energy conversion by dye-sensitized photovoltaic cells. En: *Inorganic chemistry*. 2005, 44(20):6841-51.
- HAGFELDT, Anders; GRÄTZEL, Michael. Molecular photovoltaics. En: *Accounts on Chemical Research*. 2000, 33:269-277.
- KALOWEKAMO, Joseph; BAKER, Erin. Estimating the manufacturing cost of purely organic solar cells. En: *Solar Energy*. 2009, 83(8):1224-1231.
- KELLY, Nelson; GIBSON, Thomas. Increasing the solar photovoltaic energy capture on sunny and cloudy days. En: *Solar Energy*. 2011, 85(1):111-125.
- LIU, Chunqing; FU, Lei; ECONOMY, James. A simple, template-free route for the synthesis of mesoporous titanium dioxide materials. En: *Journal of Materials Chemistry*. 2004, 14(7):1187-1189.
- MAYO, Dana; MILLER, Foil; HANNAH, Robert. *Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2003.
- NAZEERUDDIN, Mohammad; BARANOFF, Etienne; GRÄTZEL, Michael. Dye-sensitized solar cells: A brief overview. En: *Solar Energy*. 2011, 85(6):1172-1178.
- PIELKE, Roger. Misdefining “climate change”: consequences for science and action. En: *Environmental Science & Policy*. 2005, 8:548-561.
- POORTINGA, Wouter; SPENCE, Alexa; WHITMARSH, Lorraine; CAPSTICK, Stuart; PIDGEON, Nick F. Uncertain climate: An investigation into public scepticism about anthropogenic climate change. En: *Global Environmental Change*. 2011, 21(3):1015-1024.
- THOMPSON Tracy L; YATES John T. Surface science studies of the photoactivation of TiO<sub>2</sub>. New photochemical processes. En: *Chemical Reviews*. 2006, 106:4428-4453.
- THOREN, Katie; CONNELL, Katelyn. The free energy dissociation of oligomeric structure phycocyanin is not linear with denaturant. En: *Biochemistry*. 2006, 45:12050-12059.
- YAN, Shi-Gan; ZHU, Li-Ping. Single step chromatography for simultaneous purification of c-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from Spirulina (Arthrospira) platensis. En: *Journal of Applied Phycology*. 2011, 23(1), 1-6.

# Aprovechamiento de subproductos de la faena de aves. Curtido de pieles de pata de gallina

## A profitable use of by-products of the poultry slaughter. The tanning of hen's feet skins

Iade, Juan <sup>(1)</sup>, Casanova, Susana <sup>(2)</sup>, Losada, Leticia <sup>(3)</sup>, Larrosa, Andrés <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Textiles, Lana Bruta, Tops y Cueros, LATU, Uruguay - <sup>(2)</sup> Área de Patología y Producción Avícola, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay - <sup>(3)</sup> Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay.

Contacto: [jiade@latu.org.uy](mailto:jiade@latu.org.uy)

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 27/9/2012

### Resumen

El objetivo de este trabajo es lograr generar valor agregado a uno de los subproductos de la faena de aves, las patas de gallina. Se partió de pieles extraídas de patas de gallina a las que se les realizó un proceso de curtido para obtener un cuero caracterizado por su aspecto similar al de cueros exóticos, como los de reptil. Para facilitar su posible producción por medios artesanales, se diseñó un proceso más amigable con el medio ambiente, eliminando el uso de sulfuro de sodio en la etapa correspondiente al pelambre y enalado, seguido de un curtido libre de cromo basado en una combinación de taninos vegetales y reagentes sintéticos. La confirmación del curtido de las pieles se realizó midiendo la temperatura de contracción de los cueros, cuyo valor fue de 80 °C, superior al de las pieles crudas. Se evaluaron algunas propiedades físicas para caracterizar el producto y se obtuvieron valores de resistencia a la tracción de 0,65 kg/mm<sup>2</sup> y de resistencia al desgarro de 2,10 kg/mm.

Palabras clave: Cuero, pollo, curtido.

### Abstract

The aim of this development is to add value to one of the by-products of the poultry slaughter, the chicken's feet. The process began with the skinning of the chicken's feet, which underwent a tanning process to obtain a leather characterised for its similarity with exotic leathers such as the reptile ones. To facilitate its possible production by artisanal means we designed a more environmental-friendly process, eliminating the use of sodium sulfide in the stages corresponding to dehairing and liming, followed by a chromium-free tanning based on a combination of vegetable tannins and synthetic retanning agents. Confirmation of the tanning of the skins was performed by measuring the shrinkage temperature of leathers, obtaining a value of 80 °C, higher than those of the raw hides. Physical properties were evaluated to characterize the product, obtaining tensile strength values of 0,65 kg/mm<sup>2</sup> and a tear resistance of 2,10 kg/mm.

Keywords: Leather, chicken, tanned.

## Introducción

La faena de aves para su consumo genera una variedad de subproductos con poco o ningún valor agregado, entre ellos, las patas de gallinas. En Uruguay estas son utilizadas para la fabricación de harinas de carne con destino a la alimentación animal, o en pequeña escala para su exportación como alimento a países del sudeste asiático. Para ser exportadas como alimento son lavadas, escaldadas, peladas y clasificadas para su posterior congelamiento. Durante la faena de las aves las patas son separadas de la canal y utilizadas en la fabricación de harina de reciclado, junto con plumas, vísceras no comestibles y otras proteínas, como restos de carne. Estas harinas se utilizan principalmente para alimentación de animales de compañía. Las patas están exentas de plumas y se encuentran cubiertas por escamas reptilianas que no se superponen entre sí y están compuestas de queratina. Estas escamas se clasifican en cuatro tipos: unas muy

pequeñas, llamadas Cancela, que son un engrosamiento de la piel, las Reticulas, que aparecen en los laterales del metatarso, formadas por alfa queratina, las Escutas, que son las más grandes, aparecen en la parte anterior del metatarso y están formadas por beta queratina, y las Escutelos, no tan grandes como las Escutas, ubicadas en la parte posterior del metatarso.

Como toda piel de vertebrados, la piel de las patas de gallina tiene colágeno en su constitución. Posee epidermis, dermis e hipodermis y no presenta glándulas epiteliales.

Por su contenido de colágeno esta piel es factible de ser sometida a un proceso de curtido para obtener cuero, un producto con mayor valor agregado que las harinas.

Pese a su pequeño tamaño, su valor radica en el hecho de permitir la confección de productos de cuero que presentan el aspecto característico de las pieles de reptil, determinado por el diseño de las escamas.

Para el curtido de una piel en general, son muchas las opciones de procesamiento por las que se puede optar en cada una de las etapas.

Una visión esquemática del proceso de un cuero abarca las siguientes fases: remojo, lavado, pelambre, encalado, desencalado, purga, piquelado, curtido, recurtido, engrase, teñido y terminación. Los procesos de recurtido, engrase y teñido se pueden realizar de uno a la vez, o combinándolos entre sí, hasta en un solo tratamiento.

De estas etapas, la de pelambre y la de curtido son las que presentan más dificultades ambientales, debido a que los efluentes que se generan requieren su procesamiento para no producir contaminación.

En el caso de las pieles de pata de gallina, una de las etapas que se puede eliminar es la del pelambre por la ausencia de pelo, evitando el uso del sulfuro de sodio, uno de los productos más contaminantes en el proceso de curtido.

Otro paso en el que se puede lograr un proceso más amigable con el medio ambiente es la etapa de curtido, prescindiendo del uso de sales de cromo y sustituyéndolo por taninos vegetales. La mayoría de los cueros que se producen en el mundo, 80 % a 85 %, se curten con cromo, debido a que los otros curtidos no pueden competir en cuanto a las propiedades que le otorgan a los cueros y a los costos de producción. Sin embargo, hay un mayor interés en el mundo por desarrollar curtidos libres de cromo, dado por las presiones a favor de mejores resultados ambientales.

Para este proceso de las pieles de pata de gallina se optó por un curtido realizado con curtientes vegetales, libre de metales.

## Materiales y Métodos

### Procesamiento de cuero de pata de pollo

Las patas de gallina utilizadas son de reproductoras pesadas, de la línea Cobb, que se envían a faena al final de su vida reproductiva. Las patas se obtuvieron en una planta de faena y se conservaron congeladas hasta el momento en que se comenzaron a procesar. Para empezar el proceso se descongelaron a temperatura ambiente y luego se desollaron para obtener la piel. Para hacerlo se utilizó un bisturí y esta fue la etapa más engorrosa y lenta del proceso.

El procesamiento de las pieles se realizó en un fulón de laboratorio, de acero inoxidable, marca Otto Spech, con controles de velocidad de giro, tiempo de marcha y parada del tambor, así como control de temperatura del baño. Los productos químicos utilizados son los habituales en una curtiembre de calidad comercial, y se toman como composición y propiedades las que declara el fabricante.

El proceso de curtido de las pieles se presenta esquemáticamente en la Tabla 1, que indica los tiempos de marcha y detención del tambor del fulón, las cantidades de productos agregados, en qué momento adicionarlos, pH y temperatura del baño, así como distintas acciones mecánicas realizadas a lo largo del proceso.

Se comenzó con un lavado de las pieles con agua y tensoactivo no iónico, para empezar a eliminar resto de carne, grasa, sangre y suciedad de la piel.

Dado que se descartó la etapa de pelambre, se pasó directamente al proceso de encalado, donde en un nuevo baño de agua se agregó cal para lograr la apertura de las fibras del colágeno de la piel, eliminar proteínas globulares, grasa y fundamentalmente las escamas reptilianas de queratina, que le dan rigidez a la piel de la pata de pollo.

Tras un baño de encalado por 48 horas, las pieles se retiraron y se procedió a un tratamiento mecánico, raspando el lado carne de las pieles y las escamas con el lomo de una cuchilla, para poder eliminar tanto restos de grasa y carne como las escamas.

Con lavados con agua y tensoactivo no iónico se eliminó la cal no combinada con la piel y restos de carne, grasa y escamas.

Para eliminar la cal unida químicamente a la piel se lavaron las pieles en un baño de agua, con el agregado de sulfato de amonio y cloruro de amonio.

Luego se pasó a la etapa de rendido, donde en un baño de agua, a una temperatura de 37 °C y un pH aproximado a 8, se agregó una

purga enzimática, de actividad aproximada a 3000 LEV/g. Las purgas cumplen la función de abrir las fibras del colágeno por medio de una peptización controlada, a la vez que contribuyen a la limpieza de la piel y a revertir el hinchamiento alcalino de la etapa de encalado. Fue necesario repetir la purga en algún batch de esta etapa del proceso, en que las pieles no estaban lo suficientemente rendidas. El control de la efectividad del rendido o purga se realizó presionando el lado flor con el dedo; cuando la impresión digital quedó marcada en la piel, se consideró que la purga fue satisfactoria, en caso contrario, se repitió esta etapa.

En estas condiciones las pieles estuvieron prontas para entrar a las etapas de piquel y curtido.

Se preparó entonces el baño de piquelado. Para realizar un curtido vegetal, el pH del baño de piquel debe ser de aproximadamente 5, de manera de permitir el ingreso de los taninos a la piel. Con el fin de evitar el hinchamiento ácido de las pieles, lo que dificultaría el ingreso de los productos a la piel, se le agregó cloruro de sodio al baño de agua, previo al agregado de ácido fórmico.

Una vez que el baño de piquel alcanzó el pH 5, se verificó que en el interior las pieles estuviesen al mismo pH, aproximadamente. Para esto, en un corte de la piel se agregó una gota de verde de bromocresol, que cambió a un color verde azulado, el cual indica que el pH era adecuado.

Se adicionó al baño de piquelado un auxiliar de curtidión para facilitar el ingreso a la piel de los agregados de taninos vegetales. Los taninos utilizados fueron extracto de mimosa y extracto de quebracho; primero se incorporó la mimosa, en cantidades crecientes y en intervalos de tiempo de acuerdo a la Tabla 1. Por último, se agregó el quebracho.

Para fijar los taninos al colágeno se bajó el pH con ácido fórmico hasta un valor aproximado a 3,8. Una vez alcanzado este pH, se descartó el baño y se dejaron descansar los cueros en un caballete toda la noche.

Terminada la etapa de curtido y transformadas las pieles en cuero, se pasó a la etapa de recurtido, en la que se le otorgan al cuero las propiedades de blandura, suavidad, elasticidad y resistencia al desgarro y tracción.

En un nuevo baño de agua, con el agregado de un auxiliar de curtidión, se realizó el recurtido con extracto de quebracho más el agregado de un recurtiente sintético de sustitución, buscando con este último dar un efecto de relleno del cuero y suavidad al tacto. En el mismo proceso se procedió al engrase, para lo que se utilizaron tres tipos de aceites para otorgarle la blandura necesaria al cuero y mejorar otras propiedades, como la tracción o el desgarro: un aceite sintético, un aceite de pata de vaca y un aceite en base a aceite de pescado sulfitado y aceite sintético. El engrase le da a los cueros las propiedades de blandura, buena elasticidad y una mayor resistencia al desgarro.

Para fijar estos productos del recurtido al cuero se agregó ácido fórmico, y se llegó a un pH 3,5 – 3,8.

Una vez terminado el recurtido y engrase se pasó a la etapa de teñido, en la que se tiñeron los cueros de dos colores distintos, por lo que se dispuso un nuevo baño de agua para cada color. Se realizó un agregado de formiato de sodio para que los baños alcanzaran un valor de pH 4,8, de manera que los cueros estuvieran en condiciones de permitir la penetración de los colorantes. Se agregaron los colorantes y verificada su penetración en los cueros se procedió a su fijación, para lo que se agregó ácido fórmico hasta un pH 3,8 y se elevó la temperatura del baño a 40 °C. Finalmente, se adicionó un engrase catiónico a base de aceites naturales y un agregado de ácido fórmico.

Una vez culminado el teñido se dejaron secar los cueros al aire, se ablandaron manualmente y se les dio una terminación en base a la aplicación de una cera natural.

En la Figura 1 se muestran los cueros obtenidos.



Figura 1. Cueros de pata de gallina.

Proceso	Producto	Porcentaje de producto referido a peso de la piel entrar al proceso	Temperatura del baño	Movimiento del fulón /Observaciones	
LAVADO	Agua	150,00 %			
	Tensoactivo no iónico	0,50 %			
	Bactericida	0,20 %		Mueve 1 hora	Tirar baño
ENCALADO	Agua	200,00 %			
	Cal	1,00 %		Mueve 1 hora	
	Cal	1,00 %		Mueve 1 hora	
				Mueve 5' / hora durante 48 horas	
				Tirar baño	
			Descarnar y eliminar escamas		
LAVADO	Agua	100,00 %		10'	Tirar baño
	Agua	100,00 %		20'	Tirar baño
DESENCALADO	Agua	150,00 %			
	NH <sub>4</sub> Cl	0,50 %		Mueve 1 hora	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,50 %		Mueve 1 hora	
				Tirar baño	
PURGA	Agua	100,00 %	37 °C	pH=8	
	Tensoactivo	0,50 %		Mueve 5'	
	Purga Enzimática	0,25 %		Mueve 1 hora	
				Verificar buen purgado (se debió repetir la purga en algunas pieles)	

Proceso	Producto	Porcentaje de producto referido a peso de la piel entrar al proceso	Temperatura del baño	Movimiento del fulón /Observaciones
PIQUELADO	Agua	100,00 %		
	Sal	8,0 %		Mueve 10'
	Ac. Fórmico	0,50 %		Mueve 20'
	Ac. Fórmico	0,50 %		Mueve 30' pH=5
CURTIDO	Agregar al baño de piquelado			
	Auxiliar de curtido	2,00 %		Mueve 15'
	Extracto de mimosa	2,00 %		Mueve 1 hora
	Extracto de mimosa	5,00 %		Mueve 1 hora
	Extracto de mimosa	10,00 %		Mueve 2 horas
	Extracto Quebracho	5,00 %		Mueve 2 horas
				Mueve 5' / hora toda la noche
	Ac. Fórmico	1,00 %		Mueve 1 hora pH=3,8
				Descargar
				Descansan cueros toda la noche
RECURTIDO	Agua	200,00 %		
	Auxiliar de curtido	1,00 %		Mueve 15'
	Extracto Quebracho	5,00 %		
	Aceite sintético	2,00 %		Mueve 1 hora
	Recurtiente sintético de sustitución	2,00 %		Mueve 1 hora
	Aceite de patas crudo	4,00 %		Mueve 10'
	Aceite de pescado sulfitado y aceites sintéticos	6,00 %		Mueve 1 hora
	Ac. Fórmico	1,00 %		Mueve 1 hora pH=3,5 - 3,8
			Descargar	
TEÑIDO	Agua	80,00 %		
	Formiato de sodio	0,25 %		Mueve 15' pH=4,8
	Colorante	3,00 %		Mueve 20'
	Ac. Fórmico	1,00 %		Mueve 15' pH=3,8
			30 °C	Mueve 20'
			40 °C	Mueve 20'
	Aceite catiónico	1,00 %		Mueve 20'
	Ac. Fórmico	1,00 %		Mueve 20'
				Tirar baño
	ENJUAGAR	Agua	100,00 %	
				Tirar baño
Secar al aire, en superficie plana				
Ablandar a mano				

Tabla 1. Planilla de proceso de curtido.

## Determinación de propiedades físicas

Para caracterizar los cueros obtenidos se realizaron ensayos de resistencia a la tracción, resistencia al desgarro y temperatura de contracción, para lo cual fueron cortadas, con troqueles adecuados, 10 probetas para cada tipo de análisis. En la Figura 2 se observan las probetas de cada tipo de ensayo.



Figura 2. Probetas de ensayo.

La temperatura de contracción se midió en un equipo SATRA modelo STD 114, que consiste en un baño de agua cerrado, con un termómetro, en el que se coloca una muestra de cuero, de 100 mm de largo y 10 mm de ancho. Se calentó el baño con un mechero en forma progresiva y se tomó como temperatura de contracción la correspondiente al momento en que comenzó a contraerse el cuero.

Para la determinación de la resistencia al desgarro y la resistencia a la tracción se utilizó un dinamómetro Instron 1130 equipado con una celda de 50 kg. Para medir el espesor de las probetas de ensayo se usó un medidor de espesor de cuero MAQTEST. Estos equipos cumplen los requisitos de las normas utilizadas para realizar los ensayos.

La resistencia al desgarro se determinó de acuerdo a la norma ISO 3377-2:2002. Las probetas fueron cortadas y medido a cada una su espesor, según la norma. Fueron sometidas a un esfuerzo de desgarro en el dinamómetro, a una velocidad de separación de mordazas constante, de 100 mm/s. Se registró el valor máximo de carga y con el espesor medido se calculó el valor de resistencia al desgarro.

Para la determinación de la resistencia a la tracción se utilizó la norma ISO 3376:2002. Se cortaron las probetas y se midió su espesor. En el dinamómetro se determinó para cada probeta la carga de ruptura, a una velocidad de separación de mordazas de 100 mm/s. Con el valor de la carga de ruptura, el espesor medido de cada probeta y el ancho de probeta se calculó su resistencia a la tracción.

Los resultados de resistencia a la tracción y al desgarro se compararon con valores requeridos habitualmente para distintos usos.

## Productos

Con los cueros obtenidos se confeccionaron artículos de marroquinería, como cinturones, billeteras y porta celulares (Figura 3). No se presentaron dificultades para la manipulación ni para la confección de los productos.



Figura 3. Artículos en cuero de pata de gallina.

## Resultados

En las Tablas 2 a 4 se presentan los datos obtenidos de tracción a la ruptura, resistencia al desgarro y temperatura de contracción de los cueros obtenidos en el proceso de curtido.

En la Tabla 5 se comparan los valores de tracción y desgarro de los cueros de pata de gallina con valores habituales para distintos tipos de uso de los cueros.

RESISTENCIA A LA TRACCIÓN A LA RUPTURA				
Probeta	Espesor Probeta (mm)	Ancho Probeta (mm)	Carga (kg)	Tracción (kg/mm <sup>2</sup> )
1	1,12	10	5,02	0,45
2	1,07	10	5,47	0,51
3	1,39	10	7,03	0,51
4	0,65	10	10,63	1,64
5	1,30	10	8,77	0,67
6	1,08	10	7,10	0,66
7	0,89	10	4,90	0,55
8	0,91	10	4,94	0,54
9	0,72	10	4,50	0,63
10	1,01	10	3,80	0,38
PROMEDIO				0,65

Tabla 2. Valores de tracción.

## Discusión

Los valores de temperatura de contracción obtenidos con este proceso de curtido vegetal de pieles de patas de gallina, de 80 °C según la Tabla 4, muestran que el colágeno fue estabilizado por el proceso de curtido, ya que es mayor a la temperatura de contracción de las pieles crudas. Este valor de 80 °C es inferior a los que se obtienen en un cuero curtido al cromo, en el que pueden alcanzar valores de 100 °C a 115 °C, pero es comparable con los valores de temperatura de contracción de cueros curtidos con taninos vegetales, glutaraldehído, aluminio o zirconio, que se encuentran entre los 70 °C y 80 °C.

La resistencia a la tracción dio resultados inferiores a los requeridos habitualmente para los tipos de artículos que se indican en la Tabla 5. Los valores de resistencia al desgarro de los cueros de pata de gallina son menores al valor requerido para la confección de capellada de calzado, pero son superiores a los necesarios para la confección de otros productos, como forro de calzado o artículos de marroquinería. Estos valores bajos pueden deberse a que los agentes de engrase utilizados en el recurtido no penetraron o fueron insuficientes, dado que su función es lubricar las fibras del colágeno en el cuero para lograr las propiedades de tracción y desgarro adecuadas. También puede deberse a que los taninos vegetales utilizados en la etapa de curtido o la combinación utilizada no fueron los apropiados para lograr mejores resultados en esas propiedades.

Pese a estos resultados bajos de resistencia a la tracción y al desgarro, no se presentaron dificultades durante la confección de los artículos que fueron fabricados con estos cueros (Figura 2). Estos también podrían ser utilizados en otros productos, como calzado o vestimenta, que aunque resulten más exigentes en cuanto a esos requerimientos, admiten su incorporación como apliques.

## Conclusiones

Este proceso de curtido vegetal para pieles de pata de gallina fue efectivo para su transformación en cuero, según lo marcan los valores de temperatura de contracción alcanzados.

Los resultados bajos de resistencia a la tracción y al desgarro son factibles de ser mejorados haciendo modificaciones en la etapa de curtido, ya sea en los tipos como en las cantidades de taninos utilizados. Pero es en la etapa del recurtido en la que las variaciones en cantidades y tipos de taninos, engrases, más el agregado de recurtientes sintéticos pueden tener mayores efectos en la mejora de esas propiedades.

Los cueros obtenidos con la piel de las patas de gallina suponen un agregado de valor a un subproducto de la faena de aves. Este agregado está dado por los productos que se pueden fabricar con ellos, que por su apariencia similar a los cueros de reptil pueden ser considerados exóticos y de alto precio en el mercado.

El proceso que se utilizó para hacer este curtido, sin sulfuro de sodio y sin sales de cromo, permite que pueda replicarse por medios artesanales y en pequeñas cantidades, ya que se eliminaron los productos que pueden ocasionar mayores dificultades para un correcto manejo medioambiental.

## Reconocimientos

Agradecemos a la Dra. Karina Llorente y a la firma Avícola Tenent por el suministro de las patas de gallina.

Al Sr. Marcelo De Simone, quien confeccionó los productos en cuero.

A la estudiante Cecilia Pereira, quien tuvo a su cargo la engorrosa tarea de pelar las patas de gallina.

RESISTENCIA AL DESGARRO			
Probeta	Espesor Probeta (mm)	Carga (kg)	Desgarro (kg/mm)
1	1,32	2,51	1,90
2	1,09	2,18	2,00
3	1,08	2,00	1,85
4	1,27	2,84	2,24
5	1,20	2,00	1,67
6	1,06	1,35	1,27
7	0,95	3,71	3,90
8	0,86	1,64	1,91
9	0,77	1,71	2,22
10	0,98	1,96	2,00
PROMEDIO			2,10

Tabla 3. Resistencia al desgarro.

Probeta	Temperatura de contracción (°C)
1	80
2	80
3	79
4	80
5	80
6	80
7	79
8	80
9	79
10	80
PROMEDIO	80

Tabla 4. Temperatura de contracción.

RESISTENCIA AL DESGARRO				
Ensayo	Cuero pata de gallina	Cuero para capellada	Cuero para forro de calzado	Cuero marroquinería curtido vegetal
Resistencia a la tracción (kg/mm <sup>2</sup> )	0,7	2,0	1,5	1,0
Resistencia al desgarro (kg/mm)	2,1	4,0	1,5	1,0

Tabla 5. Comparación con especificaciones para distintos tipos de cueros.

## Referencias

- ADZET ADZET, J. M. *Química-técnica de tenería*. Barcelona: Romanyá/Valls, 1985. ISBN: 84-398-3375-x
  - BASF. *Vademécum para el técnico en curtición*. 3ªed. [s.l.]: BASF, 1995.
  - CLARA, M. *Aves* [En línea]. Montevideo: Facultad de Ciencias, 2000. [Consulta: 12 de junio de 2012]. Disponible en: <http://zvert.fcien.edu.uy/avesrep.doc>
  - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 3376 (IULTCS/IUP 6): *Leather. Physical and mechanical tests. Determination of tensile strength and percentage extension*. Geneva: ISO, 2002.
  - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 3377-2 (IULTCS/IUP 8): *Leather. Physical and mechanical tests. Determination of tear load Part 2: Double edge tear*. Geneva: ISO, 2002.
  - MOREIRA, M. V.; TEIXEIRA, R.C. *Estado da arte tecnológico em processamento do couro: revisão bibliográfica no âmbito internacional*. Porto Alegre: Centro Nacional de Tecnologias Limpas, 2003
  - SATRA TECHNOLOGY CENTRE. *Satra TM17 shrinkage temperature of leather*: Kettering: SATRA, 2012.
  - Páginas web:  
Cueronet - <http://www.cueronet.com/>
-

# Clave para la identificación de las especies de escorpiones de Uruguay

## Key to the identification of scorpion species from Uruguay

Toscano-Gadea, Carlos Antonio <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

Contacto: ctoscanogadea@gmail.com

Recibido: 17/3/2012 - Aprobado: 16/10/2012

### Resumen

Este artículo presenta una clave para el reconocimiento de las especies de escorpiones halladas en Uruguay. Asimismo, se brinda información sobre su comportamiento, biología, distribución e importancia médica.

Palabras clave: Taxonomía, escorpiones, Uruguay.

### Abstract

This paper provides a key for the recognition of species of scorpions found in Uruguay. It also provides information on its behavior, biology, distribution and medical importance.

Keywords: Taxonomy, scorpions, Uruguay.

## Introducción

A nivel mundial el Orden Scorpiones está compuesto por 16 familias y aproximadamente 1.600 especies (Fet et al., 2000). Los escorpiones son un grupo de antiguo linaje (existen registros de las primeras formas terrestres de hace aproximadamente 350 millones de años) y se encuentran distribuidos en todos los continentes excepto la Antártida (Mattoni, 2003).

A la fecha, en Uruguay se conocen tres familias, cuatro géneros y siete especies de escorpiones. De estas especies dos son endémicas de nuestro país, dos fueron introducidas por el ser humano, dos se reproducen de forma partenogenética y una posee importancia médica.

Si bien en Uruguay existen claves que permiten identificar a otros órdenes de arácnidos (Benamú, 2007; Montes de Oca y Pérez-Miles, 2009; Giuliani et al., 2011), no hay disponible hasta el momento una clave que permita identificar a las especies de escorpiones del país.

El objetivo de este trabajo es ofrecer las herramientas necesarias para la identificación de las especies de escorpiones presentes en

Uruguay. Para este fin se brinda una clave a nivel de especies y una breve descripción de las principales características de cada una, acompañada de fotos para su reconocimiento.

## Materiales y Métodos

Para la confección de la clave se revisó el material depositado en la Colección Entomológica de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, y el material disponible en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo.

Los tamaños a los cuales se hace referencia consideran siempre valores promedio de ejemplares adultos, medidos desde el borde anterior del prosoma hasta el extremo del telson. Se excluyen en estas medidas los apéndices. La coloración está indicada para animales adultos y vivos, ya que pueden existir diferencias en ejemplares juveniles o con aquellos que se encuentran mantenidos en líquidos conservantes. Finalmente, se incorpora un glosario con los principales términos utilizados.

## Resultados

### Clave de especies

1.- Color general del cuerpo oscuro (castaño oscuro o negro) .....	2
Color general del cuerpo claro (castaño claro) .....	3
2.- Vesícula de color castaño oscuro o negro .....	4

- Vesícula de color amarillo .....5
- 3.- Vesícula con apófisis subaculear, cuerpo y pedipalpos de aspecto delicados .....6
- Vesícula sin apófisis subaculear, cuerpo y pedipalpos de aspecto robusto .....7
- 4.- Aspecto del cuerpo robusto, con variación en la coloración del negro al castaño. Pueden llegar a medir 50 o 70 mm. Cara dorsal de la vesícula de los machos con una zona media glandular ubicada en una oquedad profunda, de color blanco intenso, menos visible en las hembras. Con 16 a 23 dientes pectíneos en cada peine. Cara ventral del segmento caudal V con carenas ventrales lateral (VL) y ventrales submedianas (VSM) formando un semicírculo, abierto en su parte posterior. Tarsos de las patas III y IV con tres pares de espinas. Quelíceros con un diente sub distal generalmente bien desarrollado ..... *Bothriurus bonariensis* (C. L. Koch 1842)
- Coloración del cuerpo castaño oscura, con patas rojizas. Tamaño entre 40 y 50 mm. La glándula del telson en los machos es una leve depresión de color más claro, en las hembras solo se aprecia la coloración más clara. La vesícula algo más alargada que en la especie anterior. El telson es de color castaño oscuro. Con 13 a 17 dientes pectíneos en cada peine. Cara ventral del segmento caudal V con un semicírculo abierto en su extremo posterior, formado por las carenas VL y VSM que no llega a cerrarse, con una carena Ventral Mediana en forma de Y de aproximadamente 14 gránulos en el macho y 11 en la hembra. Hacia los costados de esta Y hay dos gránulos. Quelíceros con 2 dientes sub distales en el dedo móvil ..... *Bothriurus rochensis* San Martín 1964.
- 5.- Cuerpo de aspecto robusto, achatado, pinzas de los pedipalpos grandes y fuertes, con carenas, y con una lobulación en la cara dentada interna de los dedos. Metasoma de aspecto delicado, con segmentos muy delgados y cortos, terminado en una vesícula con coloración amarillo intensa. Posee entre 6 y 12 dientes pectíneos en cada peine. Tamaño entre 40 y 60 mm ..... *Euscorpium flavicaudis* (De Geer 1778).
- 6.- Tamaño entre 40 y 50 mm. Color del cuerpo castaño claro uniforme, con tres líneas algo más oscuras. Tubérculo ocular de color más oscuro. Cuerpo achatado, de aspecto grácil. Pinza de los pedipalpos con tibia y tarso delgados y largos. Presentan 12 a 17 dientes pectíneos en cada peine. Vesícula con apófisis sub aculear en su cara dorsal ..... *Tityus uruguayensis* Borelli 1901.
- Tamaño entre 40 y 70 mm. El color del cuerpo varía entre el castaño claro y el castaño oscuro. Presenta tres bandas longitudinales de color castaño oscuro, fácilmente visibles. Tubérculo ocular muy oscuro. Presentan de 18 a 22 dientes pectíneos en cada peine. Vesícula con apófisis sub aculear en su cara dorsal. A diferencia de lo observado en *T. uruguayensis*, el extremo de la tibia y tarso de los pedipalpos y del telson poseen color negro ..... *Tityus trivitattus* Kraepelin, 1898.
- 7.- Tamaño entre los 30 y 50 mm. Cuerpo robusto, coloración amarillo clara con manchas oscuras. Metasoma con líneas ventrales submedianas. Tarso de las patas III con 5 a 7 pares de espinas, tarso IV con 6 a 7 pares. Presentan entre 13 y 16 dientes pectíneos en cada peine. Quelíceros con 2 dientes subdistales en el dedo móvil, el anterior más pequeño que el posterior. Pinzas de los pedipalpos de aspecto fuerte, sin carenas ..... *Urophonius iheringii* Pocock 1893.
- Coloración del cuerpo castaño clara con manchas algo más oscuras. Cara ventral de coloración castaño oscura, con dos líneas claras que la atraviesan de forma longitudinal. Metasoma con una sola línea oscura ventral media. Tamaño entre 30 y 50 mm. Vesícula de forma alargada y fina, con la cara dorsal sin excavación, pero con coloración levemente más clara (principalmente en el macho). Telson muy agudo. Presentan de 12 a 17 dientes pectíneos en cada peine. Cara ventral

del segmento caudal V con las carenas VL y VSM, con una carena mediana formada por 16 gránulos gruesos. Quelíceros con diente sub distal, aunque en algunos casos pueden presentarse dos dientes vestigiales unidos en la base

..... *Bothriurus buecherli* San Martín 1963.

## Comentarios sobre las familias y especies de escorpiones de Uruguay

### Familia Bothriuridae Simon, 1880.

La familia Bothriuridae es predominantemente neotropical. Actualmente se conocen 12 géneros sudamericanos, dos géneros africanos y un género australiano –que también fue citado para La India (Lourenço, 1996)–, lo que sugiere un origen en el viejo supercontinente Gondwana (Lourenço y Monod, 2000; Prendini, 2003; Ojanguren-Affilastro, 2005). En Uruguay es la familia más diversa con cuatro especies descritas, y otras entidades aún no descritas. Son escorpiones de tamaño medio, con un periodo de actividad que puede ser estival o invernal, y que se encuentran distribuidos por todo el territorio nacional. Algunas de sus especies presentan hábitos sinantrópicos muy marcados (Toscano-Gadea, 2011a).

#### *Bothriurus bonariensis* (C. L. Koch 1842) (Figura 1 y 2)

**Tamaño:** Mide entre 50 y 70 mm, los machos son algo más grandes que las hembras.

**Coloración:** Variable, dependiendo de si se lo encuentra al sur o al norte del Río Negro. Al sur su coloración es negra uniforme pero varía al castaño-rojizo si se lo encuentra al norte. A pesar de las diferencias en la coloración, por el momento se considera a estas distintas poblaciones como pertenecientes a una misma especie.

**Diferencias entre los sexos:** Dimorfismo sexual evidente. Los machos poseen una glándula ubicada en una hendidura o foseta en la zona dorsal de la vesícula que resulta fácilmente distinguible por su color blanco intenso (Figura 3). Posiblemente a través de esta estructura se segreguen sustancias que estimulen o apacigüen a la hembra durante el cortejo y la cópula (Peretti, 1997). Los machos además presentan los pedipalpos más globosos y la tibia y el tarso más cortos. En la cara interna, en la base del dedo móvil (inferior) del macho se observa una espina (Figura 4) que interviene en la sujeción de la pinza de la hembra durante el cortejo y cópula (Figura 5).

Las hembras poseen los pedipalpos más alargados, la tibia y el tarso largos y sin la espina de la cara interna del pedipalpo. Aunque se observa una coloración más clara en el lugar donde estaría ubicada la foseta, no existe una depresión profunda como la que está presente en los machos.

**Hábitats:** Viven tanto en ambientes naturales como modificados. Se ubican debajo de refugios criptozoicos: troncos caídos, piedras, cortezas de árboles y hojarasca, con elevada humedad y ausencia de luz (Costa & Pérez-Miles, 1994; Toscano-Gadea, 2002). Presentan escasa sinantropía; existen eventuales registros de incursión dentro de la vivienda humana, pero es común encontrarlo en la periferia de la misma, donde se ubica debajo de restos de construcciones o pilas de leña. Muy abundante en praderas ganaderas donde se refugia debajo del estiércol vacuno y en los montes cultivados (San Martín, 1961). Excava refugios o galerías, que pueden llegar a medir varios centímetros de largo (San Martín, 1961).

**Reproducción:** Sexuada, las hembras tienen entre 40 y 50 crías una vez al año.

**Peligrosidad:** Se considera inofensivo para el hombre.

**Actividad:** Meses cálidos, desde finales de noviembre hasta finales de marzo. En el norte del nuestro país puede finalizar entrado abril. Nocturno.

**Distribución:** Está presente en Argentina, Brasil y Uruguay. En Uruguay está distribuido en todo el territorio nacional.

**Comentarios:** Carenas ubicadas en la cara ventral del segmento caudal V forman un semicírculo casi completo (Figura 6).

#### *Bothriurus rochensis* San Martín 1965. (Figura 7)

**Tamaño:** Entre 40 y 50 mm. Las hembras son más pequeñas que los machos.

**Coloración:** Aspecto muy similar al de *B. bonariensis* (lo cual lleva a confusiones en su determinación). Cuerpo negro oscuro con extremidades de coloración castaño rojiza, lo cual permite su identificación (San Martín, 1965).

**Diferencias entre los sexos:** Dimorfismo sexual evidente. Los machos poseen foseta en la cara dorsal del telson (aunque menos profunda que en *B. bonariensis*), y pedipalpos globosos con la tibia y el tarso cortos. En la cara interna del palpo, en la base del dedo móvil se observa una espina. Las hembras tienen las tibias y tarsos de los pedipalpos más alargados y sin la espina característica de los machos.

**Hábitats:** Esta especie se encuentra tanto en ambientes naturales como modificados. Se ubica debajo de refugios criptozoicos, principalmente pedregales, hojarasca y troncos caídos (San Martín & Gambardella, 1967; Toscano-Gadea, 1996). Muy abundantes en la franja costera del departamento de Rocha, en montes nativos o cultivados y aun en zonas anegables (Toscano-Gadea, 2011a). Excavan refugios o galerías pero sensiblemente más cortas que *B. bonariensis*. Presentan alta sinantropía, durante los meses cálidos es común hallarlos dentro de las viviendas humanas.

**Reproducción:** Sexuada, las hembras tienen un promedio de 40 crías una vez al año.

**Peligrosidad:** Se lo considera inofensivo para el hombre.

**Actividad:** Meses cálidos, desde noviembre hasta finales de marzo. Nocturno.

**Distribución:** Esta especie es endémica de Uruguay, presente en los departamentos de Maldonado, Lavalleja y Rocha.

#### *Bothriurus buecherli* San Martín 1963. (Figura 8)

**Tamaño:** Entre 30 y 50 mm. Machos algo más grandes que las hembras.

Coloración: Castaño clara con áreas depigmentadas en forma de manchas amarillas (San Martín, 1963). Las cuales forman franjas depigmentadas dorsales a lo largo del mesosoma.

Diferencias entre los sexos: Dimorfismo sexual menos evidente que los casos anteriores. Machos con glándula de la cara dorsal del telson poco visible y de coloración menos conspicua. Se mantiene el dimorfismo sexual observado en otras especies de *Bothriurus*. Los machos poseen los pedipalpos globosos, con la tibia y el tarso cortos. En la cara interna del palpo, en la base del dedo móvil se observa una espina. Las hembras tienen las tibias y tarsos de los pedipalpos más alargados y sin la espina presente en los machos.

Hábitats: En áreas naturales se ubica en refugios criptozoicos, principalmente de zonas serranas (Costa y Pérez-Miles, 1994; Toscano-Gadea, 2002). Es de escasa sinantropía, aunque posee hábitos peri domiciliarios. Es posible encontrarlo en la cercanía de viviendas humanas en algunos balnearios de la Costa de Oro. No realizan galerías, sólo refugios rudimentarios.

Reproducción: Sexuada, las hembras tienen un promedio de 30 crías una vez al año.

Peligrosidad: Se lo considera inofensivo para el hombre.

Actividad: Meses cálidos, desde noviembre hasta finales de abril. Nocturno.

Distribución: Especie endémica de Uruguay. Presente en los departamentos de Montevideo, Canelones, Maldonado, Rocha y Lavalleja.

#### ***Urophonius iheringi* Pocock 1893. (Figura 9)**

Tamaño: Entre 30 y 45 mm. Machos más grandes que las hembras.

Coloración: Clara, con manchas oscuras irregulares ubicadas en la cara dorsal del cuerpo y extremidades. Por su coloración a simple vista pueden confundirse con ejemplares de *B. buecherli*.

Diferencias entre los sexos: Dimorfismo sexual evidente. Los machos poseen una espina en la cara interna del pedipalpo, una pequeña depresión debajo de la misma y una serie de tres o cuatro gránulos accesorios, en la base de la cara interna del dedo fijo. Todas estas estructuras están ausentes en las hembras (Acosta, 1988).

Hábitats: No construye galerías, se ubica en la periferia de las rocas alisando el sustrato. Las hembras construyen cámaras de cría donde se refugian durante la gestación. Tiene hábitos peri domiciliarios. Existen escasos registros de su presencia dentro de la vivienda humana. Se ha adaptado a las plantaciones en montes cultivados (Pinos), donde se sitúa en la gruesa cobertura de hojarasca del suelo y dentro de los troncos en descomposición (Toscano-Gadea, MS en preparación).

Reproducción: Sexuada, las hembras tienen entre 30 y 40 crías una vez al año.

Peligrosidad: Se lo considera inofensivo para el hombre, aunque su aguijonazo es doloroso.

Actividad: Meses fríos, otoño a invierno, generalmente desde mayo a setiembre. Se propone que el período reproductivo invernal podría ser una adaptación para no competir por recursos con otras especies de escorpiones (Maury, 1968; 1969; Ojanguren-Affilastro, 2005). Nocturnos.

Comentarios: Como ya se dijo, el aspecto del cuerpo puede recordar a *B. buecherli*, pero el segmento V del metasoma y la vesícula de *U. iheringi* son más largas que en la otra especie.

#### **Familia Euscorpiidae Laurie, 1896.**

La familia Euscorpiidae se encuentra presente en Europa y América del Sur, donde fue introducida por el hombre. Se conocen entre cuatro y seis géneros (Fet et al., 2000). En Uruguay está presente solamente una especie.

#### ***Euscorpius flavicaudis* (De Geer 1778). (Figura 10)**

Tamaño: Entre 50 y 60 mm. Macho de mayor tamaño que la hembra.

Coloración: Cuerpo negro homogéneo, con patas castaño claro. Sobresale el metasoma por la coloración amarilla de la vesícula (*flavicaudis* significa cola amarilla).

Diferencias entre los sexos: Dimorfismo sexual evidente. El macho posee pedipalpos más grandes y desarrollados, que poseen un lóbulo en la cara dentada superior del dedo móvil, que se corresponde a una hendidura en la cara inferior del dedo fijo. Las hembras poseen los pedipalpos menos desarrollados y las estructuras anteriormente descritas se encuentran muy poco desarrolladas.

Hábitats: Esta especie fue introducida al país por la importación de mercaderías, probablemente desde Europa, con el puerto de Montevideo como la posible vía de ingreso al país (Toscano-Gadea, 1998). En Montevideo se lo encuentra asociado a terrenos baldíos, donde se ubican en huecos entre ladrillos o bloques. Altamente sinantrópico, comúnmente ingresa a los domicilios. Registros recientes sugieren que esta especie está ampliando su zona de distribución en Montevideo (Toscano-Gadea, 2011b).

La distribución original de esta especie abarca el sur de Europa. También se halló en Inglaterra una población en el puerto de Shearnes, en Kent (Benton, 1991; 1993), donde podría haber colonizado de la misma forma en que lo hizo en Uruguay.

Reproducción: Sexuada, las hembras tienen una camada al año de aproximadamente 20 o 30 crías.

Peligrosidad: Se lo considera inofensivo para el hombre.

Actividad: Meses cálidos, de noviembre a finales de febrero. Nocturno.

Distribución: Departamento de Montevideo.

### Familia Buthidae C.L. Koch, 1837.

La familia Buthidae posee distribución cosmopolita, con especies en todos los continentes a excepción de la Antártida y Nueva Zelanda. Hasta el momento se conocen más de 70 géneros, dentro de los cuales se encuentra *Tityus*, que es exclusivamente americano e incluye a gran cantidad de especies de importancia médica para el ser humano (Fet et al., 2000; Flórez, 2001; Ojanguren-Affilastro, 2005). Muchas de las especies de este género tienen la capacidad de reproducirse partenogénicamente, ya sea en forma obligada u opcional, lo que otorga un elevado potencial colonizador y las convierte en especies altamente exitosas en la invasión de nuevos ambientes. En el país existen dos especies de Buthidae, ambas pertenecientes al género *Tityus*.

#### *Tityus uruguayensis* Borelli 1901. (Figura 11)

**Tamaño:** Entre los 40 y 50 mm. Machos y hembras poseen tamaño similar.

**Coloración:** Castaña, el cuerpo es algo más oscuro mientras que los apéndices y el metasoma son más claros. La coloración del cuerpo los hace casi totalmente crípticos contra el sustrato.

**Diferencias entre los sexos:** Dimorfismo sexual casi inexistente a simple vista. La lamela basal intermedia de los peines de las hembras es de aproximadamente el doble de tamaño que en los machos (Ojanguren-Affilastro, 2005). El primer diente pectíneo de los machos es algo más grande y globoso que en la hembra (Lourenço y Maury, 1985).

**Hábitats:** Habita tanto en zonas naturales como artificiales, debajo de piedras (ubicado en su cara ventral), troncos, materiales de construcción. De baja sinantropía, se registran escasas citas de su presencia dentro de la vivienda humana, pero puede tener hábitos peridomiciliarios. No practica galerías. Posiblemente se encuentre presente en todo el territorio nacional. En posición de reposo, los ejemplares mantienen el metasoma apoyado en el sustrato, enrollado y dispuesto al costado del cuerpo. Es común encontrar más de un ejemplar debajo de un refugio (Figura 12).

**Reproducción:** Esta especie es considerada partenogénica (Zolessi, 1985). Estudios actuales señalan la presencia frecuente de machos, por lo que la partenogénesis podría ser facultativa y la hembra recurriría a este tipo de reproducción bajo determinadas circunstancias (Toscano-Gadea, 2001; 2008).

**Características diagnósticas:** En la vesícula poseen una estructura denominada “apófisis subacuclear”, la cual se asemeja a un segundo aguijón aunque algo más pequeño. Esta estructura es importante para su identificación (Figura 13).

**Peligrosidad:** Si bien el C.I.A.T. posee registros de accidentes causados por esta especie (Heuhs et al., 2002), presentaron escasa sintomatología. A pesar de ello y por pertenecer al género *Tityus*, esta especie debe considerarse potencialmente peligrosa.

**Actividad:** Meses cálidos, de enero a marzo. Nocturno.

**Distribución:** Uruguay, sur de Brasil (Río Grande do Sul) y Argentina (provincia de Entre Ríos).

#### *Tityus trivitattus* Kraepelin 1898. (Figura 14)

**Tamaño:** Entre 40 y 70 mm. Machos y hembras poseen tamaño similar.

**Coloración:** Amarillo-castaña. El cuerpo tiene dorsalmente tres bandas longitudinales de color castaño oscuro. El aguijón y los dedos de las quelas se encuentran fuertemente pigmentados de color negro.

**Diferencias entre los sexos:** Dimorfismo sexual casi inexistente a simple vista. En los machos el segmento caudal V es ligeramente más globoso y la pinza es algo más robusta, y con una levisima lobulación en la cara dentada interna de los dedos que está ausente en las hembras (Ojanguren-Affilastro, 2005). Sin embargo, casi con seguridad las poblaciones presentes en Uruguay son sólo de hembras partenogénicas.

**Hábitats:** Esta especie también fue introducida en Uruguay, pero en este caso desde Argentina. En Uruguay solo hay dos citas de su presencia: en un establecimiento rural y en las inmediaciones de la Plaza de Toros del departamento de Colonia (Toscano-Gadea, 2011a, b). Tienen hábitos peridomiciliarios y son de alta sinantropía. Este comportamiento y la composición de su veneno hacen que deba ser considerada peligrosa.

**Reproducción:** Especie con poblaciones partenogénicas (Toscano-Gadea, 2005) y sexuadas (Maury, 1997). Las hembras viven entre cuatro y cinco años luego de llegar a adultas y son capaces de tener una camada de entre 20 y 30 crías por año.

**Características diagnósticas:** Al igual que lo observado en *T. uruguayensis*, esta especie posee una apófisis subacuclear. En este caso, esta estructura es notoriamente más pequeña que el aguijón. Al igual que en el caso anterior, en posición de reposo mantienen el metasoma apoyado en el sustrato y dispuesto al costado del cuerpo (Figura 15).

**Peligrosidad:** Su veneno tiene acción neurotóxica, por lo cual debe calificarse como peligroso para el ser humano. En el norte de la República Argentina se han reportado varios casos fatales, sobre todo en niños pequeños (Maury, 1997).

**Actividad:** Principalmente durante los meses cálidos, de noviembre a marzo, aunque es posible encontrar ejemplares activos durante todo el año. Nocturno.

**Distribución:** Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil.

Figura 1



Figura 2



Figura 3



Figura 4



Figura 5



Figura 6



Figura 7



Figura 8



Figura 9



Figura 10



Figura 11



Figura 12



Figura 13



Figura 14



Figura 15



Figura 1: Macho de *Bothriurus bonariensis*. Coloración de los ejemplares del sur de Uruguay. / Figura 2: Macho de *Bothriurus bonariensis*. Coloración de los ejemplares del norte de Uruguay. / Figura 3: Detalle de la hendidura ubicada en la zona dorsal de la vesícula, de un macho de *Bothriurus bonariensis*. / Figura 4: Detalle de la espina ubicada en la cara interna del pedipalpo de un macho de *Bothriurus bonariensis*. / Figura 5: Macho y hembra de *Bothriurus bonariensis* durante la danza nupcial. Los pedipalpos del macho (izquierda) son más grandes que los de la hembra (derecha). / Figura 6: Carenas de *B. bonariensis*. Forman un semicírculo casi cerrado. / Figura 7: Macho de *Bothriurus rochensis*. / Figura 8: Macho de *Bothriurus buecherli*. / Figura 9: Macho de *Urophonius iheringii*. / Figura 10: Macho de *Euscorpium flavicaudis*. / Figura 11: Hembra de *Tityus uruguayensis*. / Figura 12: Hembras de *Tityus uruguayensis* juntas, debajo de un tronco caído. / Figura 13: Detalle del telson y la apófisis sub aculear en *Tityus uruguayensis*. / Figura 14: Hembra de *Tityus trivittatus*. / Figura 15: Detalle del telson y la apófisis sub aculear en *Tityus trivittatus*.

## Glosario

*Apófisis subaculear*: Se encuentra por debajo del aguijón y es relativamente similar en forma a éste. Su forma puede ser aguzada o roma según la especie y no inocula veneno. En Uruguay es una estructura presente solo en las especies de Buthidae.

*Carena*: Series ordenadas de gránulos, o elevaciones del tegumento, ubicados en el tegumento del escorpión. Su disposición tiene importancia en la identificación de las especies, particularmente en Bothriuridae.

*Dientes pectíneos*: Se encuentran en la cara ventral del cuerpo. Son estructuras que cumplen funciones sensoriales. A la estructura que agrupa a los dientes pectíneos se le da el nombre de peine o pecten.

*Diente subdistal*: Es el nombre del tercer diente (contando desde el extremo apical) ubicado en el dedo móvil de los quelíceros. Su número, forma y características tiene importancia en la identificación de las especies, particularmente en Bothriuridae, pudiendo haber uno o dos.

*Dimorfismo sexual*: Diferencias morfológicas entre machos y hembras de una misma especie.

*Glándula del telson*: Es un tejido glandular, generalmente ubicado en una depresión o foseta, de color claro y de profundidad variable. Se encuentra en la cara dorsal de la vesícula de varias especies de la familia Bothriuridae y es especialmente conspicua en machos.

*Hábitos peri domiciliarios*: Se refiere a la tendencia de algunos animales a vivir en la cercanía o periferia de construcciones humanas.

*Hábitos sinantrópicos*: Se refiere a los animales que viven en estrecha asociación con los seres humanos. En el caso de los escorpiones hacemos referencia a aquellos que viven dentro de la vivienda humana.

*Introducción antropogénica*: Se refiere a la introducción de una especie no nativa por la acción directa del ser humano.

*Metasoma*: También denominado cola. Es la parte final del cuerpo del escorpión (Segmentos 15 a 19). En el último segmento se encuentra el telson, el cual está conformado por la vesícula y el aguijón.

*Mesosoma*: Segunda parte del cuerpo. Se encuentra antes del metasoma, a diferencia del prosoma, éste se encuentra segmentado (Segmentos 8 a 14).

*Partenogénesis*: Es un tipo de reproducción basada en el desarrollo de células sexuales femeninas no fecundadas. En el caso de las especies presentes en Uruguay, la partenogénesis podría ser del tipo telítoca (la descendencia es exclusivamente femenina).

*Pedipalpos*: Segundo par de apéndices prosomáticos. Están formados por seis artejos, de los cuales los últimos dos (tibia y tarso) forman las pinzas o quelas. De éstas el tarso (inferior) es móvil, mientras que la tibia (superior) es inmóvil.

*Prosoma*: Se designa de esta forma a la primera parte del cuerpo. No se encuentra segmentado (Segmentos 1 a 6).

*Quelíceros*: Primer par de apéndices prosomáticos que pueden extenderlos hacia delante, utilizándolos para sujetar y cortar a las presas. Están formados por tres artejos –triarticulados–, el primero fijo y los dos restantes móviles.

*Telson*: Estructura ubicada en la parte final del metasoma o cola y formada por la vesícula y el aguijón.

## Reconocimientos

Un sincero agradecimiento a Fernando Costa, Fernando Pérez-Miles y Miguel Simó por su continuo apoyo y sugerencias durante la confección de esta clave. A Anita Aisenberg por sus comentarios y sugerencias y particularmente a los revisores que mejoraron sustancialmente la presentación de la Clave. Las Figuras 5, 9 y 11 son cortesía de Laura Watson, la Figura 14 es cortesía de Mario Lalinde.

## Referencias

- ACOSTA, L.E. Contribución al conocimiento taxonómico del género *Urophonius* Pocock, 1893 (Scorpiones, Bothriuridae). En: *The Journal of Arachnology*. 1988, 16:23-33.
- BENAMÚ, M.A. Clave para la determinación de algunas familias de arañas (*Araneae, araneomorphae*) de Uruguay. En: *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*. 2007, 2da. época (16):1-19.
- BENTON, T.G. The life history of *Euscorpium flavicaudis* (Scorpiones, Chactidae) En: *The Journal of Arachnology*. 1991, 19:105-110.
- BENTON, T.G. The reproductive ecology of *Euscorpium flavicaudis* in England. En: *Memoirs of the Queensland Museum*. 1993, 33(2):445-460.
- COSTA, F.G.; PÉREZ-MILES, F. Ecología de los escorpiones Bothriuridae de Sierra de las Ánimas, Maldonado, Uruguay. En: *Aracnología*. 1994, 21:1-5.
- FET, V.; SISSOM, W.D.; LOWE, G.; BRAUNWALDER, M. *Catalog of the scorpions of the world (1758–1998)*. New York: New York Entomological Society, 2000.
- FLÓREZ, E.D. Escorpiones de la familia Buthidae (Chelicerata: Scorpiones) de Colombia. En: *Biota Colombiana*. 2001, 2(1):25-30.
- GIULIANI, L.; SIMÓ, M.; ACOSTA, L. Orden Opiliones. En: VIERA, C. *Arácnidos del Uruguay: diversidad, comportamiento y ecología*. Montevideo: Banda Oriental, 2011. pp. 79-90.
- HEUHS, L.; POSE, D.; GONZALEZ, S.; DELFINO, N. Accidentes por escorpiones en Uruguay. En: *II Congreso Uruguayo de Toxicología Clínica y I Encuentro del Conosur sobre antídotos*. Montevideo: [s.n.], 2002. p.25.
- LOURENÇO, W.R. Can a Bothriurid scorpion be present in the Himalayas of India. En: *Entomologische Mitteilungen der Zoologische Museum Hamburg*. 1996, 12(154): 83-90.
- LOURENÇO, W.R.; MAURY, E.A. Contribution à la connaissance systématique Scorpions appartenant au «complexe» *Tityus bolivianus* Kraepelin, 1895 (Scorpiones, Buthidae). En: *Revue Arachnologique*. 1985, 6(3):107-126.
- LOURENÇO, W.R.; MONOD, L. Description of a new genus and species of scorpion (Bothriuridae) from Brazil. En: *Ekologia*. 2000, 19(3):145-152.
- MATTONI, C.I. *Patrones evolutivos en el género Bothriurus (Scorpiones, Bothriuridae): Análisis filogenético*. Córdoba:

- Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2003. (Tesis de Doctorado).
- MAURY, E.A. Aportes al conocimiento de los escorpiones de la República Argentina I. Observaciones biológicas sobre *Urophonius brachycentrus* (Thorell, 1877) (Bothriuridae). En: *Physis*. 1968, 27(75):407-418.
  - MAURY, E.A. Observaciones sobre el ciclo reproductivo de *Urophonius brachycentrus* (Thorell, 1877) (Scorpiones, Bothriuridae). En: *Physis*. 1969, 29(78):131-139.
  - MAURY, E.A. *Tityus trivittatus* en la Argentina nuevos datos sobre distribución, partenogénesis, sinantropía y peligrosidad (Scorpiones, Buthidae). En: *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*. 1997, 24:1-24.
  - MONTES DE OCA, L.; PÉREZ-MILES, F. Las arañas Mygalomorphae del Uruguay: clave para familias, géneros y especies. En: *INNOTEC*. 2009, (4):41-49.
  - OJANGUREN-AFFILASTRO, A.A. Estudio monográfico de los escorpiones de la República Argentina. En: *Revista Ibérica de Aracnología*. 2005. 75-241.
  - PERETTI, A.V. Relación de las glándulas caudales de machos de escorpiones Bothriuridae con el comportamiento sexual (Scorpiones). En: *Revue Arachnologique*. 1997, 12 (3):31-41.
  - PRENDINI, L. A new genus and species of bothriurid scorpion from the Brandberg Massif, Namibia, with a reanalysis of bothriurid phylogeny and a discussion on the phylogenetic position of *Lisposoma* Lawrence. En: *Systematic Entomology*. 2003, 28:149-172.
  - SAN MARTÍN, P.R. Observaciones sobre la ecología y distribución geográfica de tres especies de escorpiones en el Uruguay. En: *Revista de la Facultad de Humanidades y Ciencias*. 1961, 19:175-212.
  - SAN MARTÍN, P.R. Una nueva especie de *Bothriurus* (Scorpiones, Bothriuridae) del Uruguay. En: *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle*. 1963, 2ª. Serie, 35 (4):400-418.
  - SAN MARTÍN, P.R. Escorpiofauna Uruguaya II *Bothriurus rochensis*, nueva especie de Bothriuridae del Uruguay. En: *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 1965, VIII(106):1-22.
  - SAN MARTÍN, P.R.; L.A. de GAMBARDELLA. Contribución a la ecología de los escorpiones (Bothriuridae). Hábitat de tres especies de *Bothriurus* del Uruguay y su aplicación en la sistemática. En: *Bulletin du Muséum National D'Histoire Naturelle*. 1967, 39(1):188-196.
  - TOSCANO-GADEA, C.A. Escorpiofauna de los Bañados del Este II Departamento de Rocha, Uruguay. En: *Encuentro de Jóvenes Biólogos*. Montevideo: Facultad de Ciencias, 1996. p.136-137.
  - TOSCANO-GADEA, C. A. *Euscorpium flavicaudis* (Degeer, 1778) in Uruguay: first record from the new world. En: *Newsletter of the British Arachnological Society*. 1998, 81:6.
  - TOSCANO-GADEA, C. A. Is really *Tityus uruguayensis* (Scorpionida, Buthidae) parthenogenic? En: FET, Victor; SELDEN, Paul. *Scorpions 2001: In Memoriam of Gary A. Polis*. London: British Arachnological Society, 2001. pp.359-364.
  - TOSCANO-GADEA, C.A. Fenología y distribución de la escorpiofauna del Cerro de Montevideo, Uruguay: un estudio de dos años con trampas de caída. En: *Revista Ibérica de Aracnología*. 2002, 5:77-82.
  - TOSCANO-GADEA, C.A. Confirmation of parthenogenesis in *Tityus trivittatus* Kraepelin 1898 (Scorpiones, Buthidae). En: *The Journal of Arachnology*. 2005, 32:866-869.
  - TOSCANO-GADEA, C. A. Nuevos aportes para una vieja controversia: ¿Es *Tityus uruguayensis* (Scorpiones, Buthidae) realmente partenogénico? En: *Actas de las IX Jornadas de Zoología del Uruguay, Facultad de Ciencias*. Montevideo: FCIEN, 2008. pp. 75.
  - TOSCANO-GADEA, C.A. Escorpiones en el Uruguay. En: *AISENBERG, A.; TOSCANO-GADEA, C.A.; GHIONE, S. Guía de arácnidos del Uruguay*. Montevideo: MEC, 2011a pp.196-199.
  - TOSCANO-GADEA, C.A. Los escorpiones en Uruguay: pasado, presente y futuro. En: *VIERA, C. Arácnidos del Uruguay: diversidad, comportamiento y ecología*. Montevideo: Banda Oriental, 2011b. pp. 51-76.
  - ZOLESSI, L. C. DE. La partenogénesis en el escorpión amarillo *Tityus uruguayensis* (Borelli, 1900) (Scorpionida: Buthidae). En: *Revista de la Facultad de Humanidades y Ciencias*. 1985, 3ra. época 1:25-32.



# ÍNDICE DE AUTORES

---

Acco, Steve; 5  
Acevedo, Xiomara; 5  
Álvarez, Beatriz; 69  
Buxedas, Luciana; 64  
Casanova, Susana; 75  
Casiano, Rodrigo; 5  
Cecchetto, Gianna; 49  
Cerdá Bresciano, María Fernanda; 69  
Crosa, María José; 31  
Cucatti, Mónica Regina; 5  
Enciso, Paula; 69  
Escobar Gianni, Daniela Verónica; 21, 25  
Francini, Lorena; 5  
Gandini, Alessandro; 59  
García, Vania; 5  
Gonçalves de Melo, Monique; 5  
Guamis, Buenaventura; 16  
Harispe, Rodrigo; 21  
Iade, Juan; 75  
Irisity, Mariana; 31  
Jimenez, Elizabeth; 5  
Jimenez, Linda Patricia; 5  
Jorcín, Santiago; 16  
Larrea, Elena; 5  
Larrosa, Andrés; 75  
Lema, Patricia; 38  
López, Tomás; 16  
Lopretti, Mary; 64, 59, 55, 43  
Losada, Leticia; 75  
Madrigal-Carballo, Sergio; 43  
Márquez Romero, Rosa; 21, 25  
Minini, Lucía; 69  
Miyagushu, Luciana; 5  
Navas, Lucía; 5  
Panizzolo, Luis Alberto; 38  
Pantoja, María Rosa; 5  
Pauletti, Miguel S.; 38  
Pazos, Alberto; 5  
Phillips, Andrene; 5  
Piagentini, Andrea; 38  
Pianzzola, María Julia; 49  
Ramos, Ana; 5  
Ramos, Mikol; 43  
Random, Dwight; 5  
Regalado, Laura; 5  
Reinares, Rosana; 5  
Rivera, Myriam Jessel; 5  
Rocha, Eliana; 5  
Rodríguez, Analía; 38  
Rodriguez, Gerardo; 43  
Rozycki, Sergio; 38  
Sala, Angelina; 21  
Salazar Arzate, Claudia Marcela; 5  
Sanabria, Analía; 49  
Sibaja Ballester, María del Rosario; 55  
Silva, Susana; 5  
Silvera, Carlos; 21  
Siri, María Inés; 49  
Sousa, Renata; 5  
Ticona, Galia; 5  
Toro, Cristina; 5  
Torres, Pedro Hernán; 5  
Toscano-Gadea, Carlos Antonio; 82  
Uekane, Thais; 5  
Uribe, Christian; 5  
Vacaflor, Patricia; 5  
Vázquez Zeballos, Sylvia Enid; 64  
Vega Baudrit, José Roberto; 55  
Vivino, Enrique; 5  
Zaccari, Fernanda; 31  
Zamora, Vanessa; 43  
Zirbesegger, Heinz; 25

# ÍNDICE TEMÁTICO

---

## A

Acidez; 25, 27, 29, 31, 32, 35  
ADN; 50, 51, 52  
Agentes antimicrobianos; 52  
Aminoácidos; 25, 26, 27, 29, 38, 40, 61  
Andamiajes 3D; 43, 44, 45, 46, 47

## B

Bebida de arroz; 17  
Bioetanol; 64, 65  
Biomasa; 55, 59, 64, 67  
Biopolímeros; 43, 44, 46, 47, 58, 59  
**Biotecnología; 43 - 68**  
Butia Capitata; 31, 36, 37

## C

Ca<sup>++</sup>; 16, 17, 18, 20  
Calidad de frutos; 31  
Carbohidratos; 12, 17, 25, 26, 27, 60  
Carne; 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 75, 76  
Cáscara; 25, 31, 32, 35, 36, 55, 56, 57, 58  
Celdas solares; 69, 70, 71  
Cenizas; 25, 26, 27, 30, 56  
Cepas de levadura; 65, 65  
Clave; 47, 82, 88, 89  
Colágeno; 43, 44, 45, 46, 47, 48, 75, 76, 80  
Color; 21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 58, 61, 76, 82, 83, 84, 86, 88  
Coloración; 38, 82, 83, 84, 85, 86, 87  
Combustibles fósiles; 69  
Conservador; 21, 23, 24  
Cosecha; 31, 32, 33, 36  
Cuero; 75, 76, 79, 80  
**Cueros; 75 - 81**  
Cultivo; 16, 25, 26, 43, 44, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67, 70  
Curtido; 75, 76, 78, 79, 80

## D

Defectos; 31, 32, 33, 34  
Degradación; 35, 39, 44, 60, 64, 65, 66, 67  
Desechos agroindustriales; 55, 58  
Desgarro; 75, 76, 79, 80

Dextranos; 55, 56, 57, 58  
Dulce de leche; 38, 39, 40, 41

## E

Electricidad; 70  
Energía solar; 69  
Ensamblado ITO/TiO<sub>2</sub>; 70, 71, 72, 73, 74  
Enzimas; 17, 44, 59, 60, 61, 62, 64, 66, 67  
**Escorpiones; 82 - 89**  
Escorpiones; 82, 84, 85, 88, 89  
Estabilidad; 16, 17, 18, 20, 23, 25, 27, 28, 29, 46, 57, 70, 71, 72, 73, 74  
Esteroles; 11, 25, 26, 27, 29, 30  
Evaluación Sensorial; 22, 23

## F

Fibras; 16, 25, 76, 80  
Ficocianina; 69, 70, 71, 72, 73, 74  
Fruta; 31, 32, 33, 37, 56, 58  
Frutos; 31, 32, 33, 34, 35, 36

## G

Grasa; 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 17, 26, 27, 28, 29, 76

## H

Harina; 25, 26, 27, 28, 29, 75  
Hidrólisis; 10, 57, 59, 60, 67, 68  
Hongos; 22, 24, 25, 27, 29, 33, 43, 55, 56, 59, 60, 61, 63, 64, 65  
Humedad; 22, 23, 25, 26, 27, 29, 33, 46, 50, 52, 61, 84

## I

INM; 5

## J

Jugo; 31, 32, 35, 55, 56, 57, 58

## K

Kraft; 59, 60, 61, 62, 65

## L

Leche de arroz; 16, 17, 18, 19, 20  
Leuconostoc mesenteroides; 55, 56, 57  
Levaduras; 22, 24, 25, 27, 29, 56, 60, 65, 67, 68  
Lignina; 59, 60, 61, 62, 64, 65, 66, 67

## M

Materia grasa; 25, 26, 27  
Materia seca; 22, 31, 32, 35, 36  
Materiales de Referencia Certificados; 5  
Materiales poliméricos; 59, 62  
Melanoidinas; 38, 39  
**Metrología; 5 - 15**  
Microbiología; 18, 20, 49, 50  
Microorganismos; 17, 20, 52, 60, 61, 64, 65, 68  
MR; 5, 6, 10  
MRC; 5, 6, 10  
Murchera; 49, 50, 51, 52

## N

Nanoestructuras; 69  
**Nanotecnología; 69 - 74**  
Nitrógeno; 5, 6, 7, 12, 39, 44

## P

Palmar; 31, 23, 36, 37  
Palmas; 31, 32  
Panificados; 25, 26, 29  
Papa; 49, 50, 52, 53  
Parámetros de medición; 38, 5  
Pastas; 25, 26  
Patas de gallina; 75, 76, 80  
PCR; 49, 50, 51, 52, 53, 54  
Películas biodegradables; 21, 22, 24  
Películas comestibles; 21, 22, 23, 24  
Perfil de ácidos grasos; 16, 25, 26, 27, 28  
PH; 17, 18, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 56, 57, 58, 61, 65, 70, 76  
Piña; 55, 56, 57, 58  
Piquelado; 76  
Polímeros; 21, 43, 44, 55, 60  
Poros; 45, 46, 47  
Poscosecha; 31, 33  
Potasio; 6, 8, 9, 11, 12, 14, 21, 22, 23, 24, 70, 73  
Proteínas; 11, 12, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 38, 56, 61, 75, 76  
Proteínas lácteas; 21, 22  
Pulpa; 31, 32, 33, 35, 36, 60

## Q

Quitosano; 21, 43, 44, 45, 46, 47

## R

Ralstonia solanacearum; 49, 53, 54  
Reacción de Maillard; 38, 39, 40  
Recurtientes sintéticos; 75, 80

## S

Sacarificación; 64, 67  
Sacarosa; 38, 39, 40, 44, 46, 47, 55, 56, 57  
Saccharomyces cerevisiae; 64, 65, 66, 68  
Semilla de zapallo; 25, 26, 29  
Sensorial; 21, 22, 23, 24, 39, 41  
Separadores; 21, 22, 23, 24  
Sodio; 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 25, 26, 32, 39, 41, 44, 56, 61, 75, 76, 80  
Solubilidad; 21, 22, 23, 24  
Suero de quesería; 22  
Sustrato; 56, 57, 60, 61, 62, 67, 85, 86

## T

Tamaño; 16, 17, 18, 19, 20, 46, 47, 50, 72, 74, 75, 83, 84, 85, 86  
Taninos vegetales; 75, 76, 80  
Tapas de empanadas; 21, 22, 23  
**Tecnología Alimentaria; 16 - 42**  
Tejidos; 33, 43, 44, 46, 47, 60  
TiO<sub>2</sub>; 69, 70, 71, 72, 73, 74  
Tracción; 76, 79, 80  
Trans-β-caroteno; 31, 32, 33, 35, 36

## U

UAPH; 16, 17, 18, 20  
Uruguay; 16, 17, 20, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 37, 49, 50, 53, 54, 70, 74, 75, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89  
UV; 61, 64, 65

## V

Vida útil; 21, 22, 24  
Vitamina B1; 25, 26, 28  
Vitamina E; 25, 26, 29

Υ-irradiación; 64, 66



# **INNOTEC**

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY





ISO 9001:2008  
NRO. 15367



ISO 9001:2008  
NRO. 15367



LATU. Centro de Información Técnica  
Avda. Italia 6201, entrepiso. Montevideo - Uruguay  
Tel. +(598) 2601 3724 int. 1364  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
<http://www.latu.org.uy>  
<http://ojs.latu.org.uy>  
<http://citein.blogspot.com>  
<http://facebook.com/citein.latu>