

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

Número 9
Enero - diciembre 2014

INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



INNOTEC (ISSN1688-3691 / ISSN 1688-6593 [en línea] es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

Equipo editorial

Dirección

Dr. Jorge Silveira, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Consejo editorial

Dr. Daniel Conde Scalone, Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias, Sección Limnología, Uruguay

MBA. Ing. Mariela De Giuda, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Gerencia de Tecnología y Gestión, Uruguay

Dr. Andrés Dieste, Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Gerencia de Investigación Desarrollo e Innovación, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren, Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay

Dr. Tomás López, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Gerencia de Investigación Desarrollo e Innovación, Uruguay

Dra. Laura Moya Silva, Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

MSc. Daniel Volpe, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Gerencia de Análisis, Ensayo y Metrología, Uruguay

Edición

Lic. Marina Barrientos, Centro de Información Técnica, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Administración de OJS y soporte técnico

Lic. Lorena Fiori, Centro de Información Técnica. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Diseño

Manosanta Desarrollo Editorial
<http://manosanta.com.uy>

Acerca de INNOTEC

INNOTEC es una revista científica arbitrada en modalidad doble ciego, editada anualmente en Montevideo, Uruguay, por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) a través de su Centro de Información Técnica y publicada en formato papel y en versión digital en Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>).

Reúne trabajos originales con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica con el fin de contribuir a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico. La transferencia de conocimiento y el intercambio con la comunidad son objetivos prioritarios de INNOTEC. Nuestra publicación está dirigida a investigadores, académicos, tecnólogos y estudiantes vinculados a los campos temáticos que aborda y que responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país. INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Google Académico, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



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

La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto, y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported. Estas condiciones para la reproducción total o parcial de los artículos se aplican también en la versión impresa de la revista.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores.

INNOTEC - NÚMERO 9 - Enero a diciembre 2014

ISSN 1688-3691

Título clave: INNOTEC

Título clave abreviado: Innotec

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU
Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724, ints. 1314 y 1350
ditec@latu.org.uy
<http://www.latu.org.uy>
<http://ojs.latu.org.uy>

SUMARIO

Instrucciones a los autores	4
Índice de autores	97
Índice temático	99

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.

Objetivos específicos

- 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 INNOTECH 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 para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

Metrología

7 Análisis de incertidumbre en calibración de medidores de presión según DKD-R 6-1. Cinco métodos de cálculo

Constantino, Pablo; Camacho, Ignacio; Acquarone, Alejandro.

14 Diseño de un instrumento de bajo costo para la calibración de micromanómetros diferenciales

Constantino, Pablo; Camacho, Javier; Maciel, Andrés; Acquarone, Alejandro.

Aguas

19 Evaluación de la remoción de nutrientes y compuestos organoclorados y sus rutas de bioacumulación con la planta flotante

Eichhornia crassipes expuesta a efluentes de pulpa de celulosa

Míguez, Diana; Martínez-Bengochea, Anabel; Carrara, María Victoria; Bombi, Katherine; Ferreira, Natalia; Cartmell, Elise.

Alimentos

24 Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo

Escobar, Daniela; Arcia, Patricia; Curutchet, Ana; Pelaggio, Ronny; Urrestarazu, Pedro; Márquez, Rosa.

31 Efecto del perfil de caseínas, recuento de células somáticas y composición de la leche en el rendimiento del queso Dambo

Escobar, Daniela; Pelaggio, Ronny; Grille, Lucía; Colzada, Enrique; Rampoldi, Cecilia; Carro, Silvana; Delucchi, Inés; Viola, Natalia; Nolla, Juan Pablo; Reinares, Rosana; Chilibroste, Pablo; Piedrabuena, Laura.

43 Percepción del consumidor sobre los tipos de carne picada que se comercializan en Montevideo

Raggio, Laura; Gámbaro, Adriana; Pagano, Teresa; Montesano, Ana; Garmendia, Juan.

50 Potencial tecnológico de harina de plátano verde con cáscara (Musa AAB) como sustituto de grasa para geles cárnicos

Araya-Quesada, Yorleny; Morales-Torres, Alejandra; Vargas-Aguilar, Pedro; Wexler, Lea.

61 Elaboración de pan multigrano con harinas precocidas por extrusión

Crosa, María José; Tihista, Hugo; Próspero, María Inés; Cadenazzi, Mónica; Souto, Laura; Curutchet, Ana; Ferreyra, Verónica; Suburú, Gabriela; Escudero, Jorge.

70 Chips de papa, la fritura en vacío y beneficios para la salud

Crosa, María José; Elichalt, Marta; Skerl, Verónica; Cadenazzi, Mónica; Olazábal, Laura; Silva, Roberto; Suburú, Gabriela; Torres, Marina; Vilaró, Francisco; Estellano, Gabriel.

Biotechnología

75 Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX® System Q7, DuPont) utilizando "WET POOLS"

Mussio, Paula; Martínez, Inés; Soumastre, Martina; Maquieira, Ana Ma.

84 Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina y elastasa en extractos de vegetales autóctonos

Macció, Laura; Vallés, Diego; Cantera, Ana María.

Nanotecnología

91 Caracterización de las antocianinas de la flor de ceibo como sensibilizadores naturales para su uso en celdas fotovoltaicas

Cerdá, María Fernanda; Enciso, Paula.

Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en campos temáticos que responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU y del país.

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y equipos de investigación de otras instituciones en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la 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 en la web: <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 de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU 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 y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente.

Los artículos son publicados en papel y online. La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto, y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la Nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

Estas condiciones para la reproducción total o parcial de los artículos se aplican también en la versión impresa de la revista.

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. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas previstas por la organización y su Consejo editorial para cada edición y de realizar modificaciones que favorezcan la óptima presentación de los artículos en la revista.

Proceso de revisión

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso.

El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla y que no forman parte del staff editorial. Los comentarios y recomendaciones de los árbitros son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU, no obstante el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, nivel académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

Normas de presentación y envío de los textos

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia ditec@latu.org.uy.

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

Definiciones:

Autor. Persona o colectividad responsable del contenido intelectual del documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, 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.

Materiales 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 hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

Discusión y Conclusiones. Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

Reconocimientos. Breve agradecimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

Referencias y citas en el texto. Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

Los artículos deben presentar:

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

Nombre completo de todos los autores (solo en metadatos de OJS), ingresados en orden decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Debe indicarse la sección o departamento al que pertenecen y organización/institución de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes.

Resumen en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

Palabras clave, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo: introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras, gráficos e imágenes (ver sección *Estilo y formato de citas y referencias* en este documento). 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.

Secciones. Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en 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 y gráficos. Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto e incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. En caso de utilizar fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, 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. Las mismas se numeran según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

Además de estar insertadas en el artículo, cada figura, gráfico y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Por favor, evite las notas al pie en el desarrollo del artículo. Denominaciones en latín: Deben ir en cursiva.

Estilo y formato de citas y referencias

Ejemplos usuales de citas

Registro de citas textuales

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

Registro de cita ideológica o paráfrasis

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

Ejemplos usuales de referencias

Monografías (Libros)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. *Título del libro en cursiva*. Nº de edición. Lugar de edición: editorial. (Serie; Nº). ISBN (Este último si se posee)

Bobbio, Norberto, 1958. *Autobiografía*. Madrid: Taurus. ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. *Barley for food and health: science, technology, and products*. Nueva York: John Wiley & Sons

Revistas como un todo

Título de la publicación en cursiva. 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 o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen (Número), páginas.

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Module scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp.625-638.

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: *MK Marketing + Ventas*, (143), pp.33-37

Normas

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. No. o código de la norma: *Título*. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. UNIT-ISO 9001: *Sistemas de gestión de calidad - requisitos*. Montevideo: UNIT.

Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

Responsabilidad principal, año. *Título* [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001. *Facts and ideas of testing wood durability above ground* [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en: <http://www.bfafh.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

Patentes

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número. Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P, 2009. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.

Análisis de incertidumbre en calibración de medidores de presión según DKD-R 6-1. Cinco métodos de cálculo

Uncertainty analysis on pressure gauges calibrations according to DKD-R 6-1. Five calculation methods

Constantino, Pablo ⁽¹⁾, Camacho, Javier ⁽²⁾, Acquarone, Alejandro ⁽¹⁾.

⁽¹⁾Departamento de Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - ⁽²⁾VIA University College, Denmark.

Contacto: pconstan@latu.org.uy

RECIBIDO: 23/04/2014 – APROBADO: 30/09/2014

Resumen

Este trabajo presenta un estudio de las contribuciones de incertidumbre e incertidumbre expandida que tienen lugar en la calibración de un medidor digital de presión por comparación directa con una balanza de presión. Se discute la ecuación propuesta por la guía DKD-R 6-1 para la estimación de incertidumbre, según plataforma GUM y Monte Carlo, proponiendo un modelo alternativo. Se determinan las diferencias que existen en las incertidumbres resultantes obtenidas según estos métodos y en qué forma los distintos componentes del modelo influyen en estas diferencias, según la magnitud de su incertidumbre estándar y la distribución de probabilidad (DDP) asociada que se le asigna.

El desarrollo se realiza según el método GUM utilizando la metodología analítica. Adicionalmente se repite el ejercicio en forma comparativa utilizando cuatro diferentes herramientas de cálculo. Dos de estas herramientas están basadas en aproximaciones numéricas del método clásico: software GUM Workbench © y método numérico de Kragten. Las otras dos son consistentes con el suplemento 1 de la Guía de la Expresión de la Incertidumbre de Medida, según el método de Monte Carlo (MCM), en un caso el lenguaje R y por otra parte MCM Alchimia, aplicación desarrollada por uno de los autores.

Palabras clave: Metrología, presión, balanza de presión, incertidumbre, Monte Carlo, GUM, GUM Workbench, R, MCM Alchimia, Kragten, DKD-R 6-1.

Abstract

This paper focuses a study of the contributions of uncertainty and expanded uncertainty that take place in the calibration of a digital pressure gauge by direct comparison with a pressure balance. The work is performed based on the GUM method, using an analytical approach. The equation given by the DKD-R 6-1 guideline for uncertainty analysis is discussed proposing an alternative model. It is aimed to determine the differences in the resulting uncertainty, according to the different platforms used, and how the standard uncertainty and assigned probability function (FDP) associated to different magnitudes of the model impact these differences.

The development will be performed according to the GUM framework using the analytical methodology. In addition to this, the exercise is repeated in a comparative basis, using four calculation tools. Two of them are based on numerical approaches of the classical method, GUM Workbench software© and Kragten method, and the rest are based on the Supplement 1 to the Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement, in one case by mean of the R language and the second one using MCM Alchimia, application developed by one of the authors.

Keywords: Metrology, Pressure, Pressure Balance, Uncertainty, Monte Carlo, Software, GUM, GUM Workbench, R, MCM Alchimia, Kragten, DKD-R 6-1.

Introducción

A partir del año 2008, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) ha realizado una fuerte inversión en patrones fundamentales de alta precisión para el laboratorio de presión, contando a la fecha con cinco ensambles Pistón-Cilindro de incertidumbres menores a 30 ppm, los cuales cubren un intervalo entre 0 y 70 MPa. En este marco el departamento de metrología científica del LATU comenzó a brindar apoyo a los laboratorios

secundarios de calibración, ya sea dando trazabilidad a sus patrones de presión, así como participando en asesoramientos y organizando ensayos de aptitud con ellos. Las medidas sobre las cuales se realiza este estudio corresponden a las realizadas para la obtención de los valores de referencia en el ensayo de aptitud de la magnitud presión, realizado entre mayo y diciembre de 2013. Se estudian aquí los distintos aspectos y parámetros de entrada que involucran la estimación de incertidumbre según el método clásico (GUM), confrontándolos con resultados

obtenidos a través de métodos estocásticos (MCM) y evaluando posibles explicaciones a las diferencias obtenidas.

Calibración de medidores digitales con balanza de presión. A medida que comienzan a estar disponibles en plaza balanzas de presión industriales de precios más accesibles, es de esperar que en los próximos años los laboratorios secundarios en Uruguay comiencen a utilizar estos equipos como patrones de referencia, dejando los instrumentos digitales de menor precisión y estabilidad como patrones de trabajo. Si bien la confiabilidad de los patrones de tipo fundamental es mayor a la de los equipos digitales, existen otras consideraciones que se deben tener en cuenta al realizar calibraciones con estos patrones, exigiendo en general una mayor competencia de los técnicos así como un mayor conocimiento de las características de su equipo específico. Dentro de las particularidades que tienen las calibraciones de este tipo es de destacar la diversidad de magnitudes que influyen en el proceso de comparación. Esto es debido a que al ser la presión una magnitud derivada la calibración de medidores se realiza en forma de comparación indirecta, obteniéndose la presión generada por el patrón de magnitudes tales como la masa aplicada en el pistón, densidad del aire circundante, área efectiva del ensamble pistón-cilindro, temperatura del mismo, gravedad local, etcétera, y no de un valor único de presión leído en el instrumento, corregido según su curva de calibración e incertidumbre asociada. En la medida que tanto los patrones utilizados como los calibrandos aumentan su precisión, muchas de estas magnitudes del modelo pueden llegar a alternar su significancia en la incertidumbre de calibración resultante. Esto no solo se observa para diferentes calibraciones, sino incluso a lo largo de una misma calibración; una magnitud de entrada puede pasar de ser un contribuyente menor a ser la controlante del proceso según la fracción del intervalo que se esté midiendo.

El propósito de este trabajo es evaluar estas influencias en una calibración específica y, al mismo tiempo, estudiar en qué medida las variantes inherentes a los procesos de cálculo pueden llegar a impactar en estos valores.

Materiales y Métodos

Herramientas

Existen numerosas herramientas informáticas en la actualidad para la estimación de incertidumbres de calibración, la mayoría de las cuales están basadas en la ley de propagación de incertidumbre. No obstante, a partir de la aprobación del suplemento 1 de la Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida (JCGM, 2008a) también es posible estimar la incertidumbre del mesurando por medio de simulaciones de Monte Carlo. En este trabajo se utilizan las cuatro herramientas de cálculo que se detallan a continuación:

GumWorkbench. Este software comercial está ampliamente difundido y es consistente con los lineamientos de la guía JCGM 100:2008 (JCGM, 2008a). Como información de salida, esta aplicación permite obtener un presupuesto de incertidumbre con las incertidumbres estándar de los contribuyentes, la estimación de los grados de libertad efectivos del proceso y los resultados e incertidumbre expandida del mesurando.

Método de Kragten (Kragten, 1995). Este método sugiere una aproximación numérica a la obtención de los coeficien-

tes de sensibilidad de los contribuyentes de incertidumbre, evitando por este medio el cálculo de las derivadas parciales del modelo y utilizando el potencial de las planillas de cálculo para realizar el proceso en forma estructurada. En este caso se sostiene que si asumimos que las incertidumbres típicas de las magnitudes de entrada son muy pequeñas con respecto al valor de esta, o que la función del mesurando $y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$ es lineal en x_i , es posible aproximar los coeficientes de sensibilidad según la expresión siguiente (Kragten, 1995):

$$\frac{\delta_f}{\delta_x} = \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)}$$

Este método permite obtener los mismos elementos de salida que el GUM Workbench.

Lenguaje R. La estimación de incertidumbre del modelo según el método de Monte Carlo se diseñará primeramente en este lenguaje, ampliamente reconocido como herramienta para el cálculo estadístico. Por ser este un proceso estocástico no se obtendrá un resultado único, sino una población de resultados con una FDP asociada cuyos parámetros estadísticos permiten obtener un valor medio y un intervalo de confianza como resultados para el mesurando.

MCM Alchimia (Constantino, 2013). Esta aplicación también utiliza el método de Monte Carlo para la estimación de incertidumbres. Como información de salida también permite obtener las contribuciones de incertidumbre para los parámetros de entrada en el modelo. Estos valores los obtiene realizando simulaciones de estas magnitudes, manteniendo el resto de las variables fijas en su esperanza matemática.

Materiales

El patrón utilizado es una Balanza de Presión Neumática marca DHI modelo PG-7102 con un ensamble pistón-cilindro reentrante de relación de masa 200 kPa/kg modelo PC-7100/7600-200. Como calibrando se utiliza un manómetro digital marca FLUKE modelo 700G07. El método utilizado está basado en DKD-R 6-1 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003) y se realiza para 10 puntos de la escala de medida que cubre un intervalo de 0,34 a 3,40 MPa.

Modelo matemático de la calibración

El modelo resultante en una calibración de este tipo podría subdividirse en tres etapas. En primer lugar, el cálculo de parámetros del modelo como la densidad del fluido (N_2), dependiente de la presión medida, o la densidad del aire, dependiente de las condiciones ambientales durante el ensayo. Luego es calculada la presión generada por el patrón, y en la última etapa estos valores son utilizados en la propia calibración del instrumento de muestra.

La presión generada en el caso de balanzas neumáticas puede expresarse según el siguiente modelo matemático, DKD-R 6-1 ec. 31 y 32 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003):

$$P = \frac{\sum M \cdot gl \cdot (1 - \frac{\rho_a}{\rho_m})}{A_{(0,tr)} \cdot [1 + \alpha(t_p - t_r) \cdot (1 + \lambda \cdot P_N)]} + [(\rho_f - \rho_a) \cdot gl \cdot \Delta h]$$

Donde:

- ΣM : Masa total en kg.
- gl : Acel. de la gravedad local en m/s².
- ρ_a : Densidad del aire en kg/m³.
- ρ_m : Densidad de las masas en kg/m³.
- ρ_f : Densidad del fluido (N₂) en kg/m³.
- $A_{(0,tr)}$: Área efectiva del ensamble a presión cero y t de referencia (20 °C) m².

- α : Coef. de expansión térmica en °C⁻¹.
- T_p : Temperatura del pistón en °C.
- T_r : Temperatura de referencia en °C.
- λ : Coeficiente de deformación con P en Pa⁻¹.
- P_N : Presión Nominal en Pa.
- Δh : Diferencia de nivel entre el patrón y el calibrando en m.

En esta ecuación debe hacerse notar que algunos parámetros surgen de cálculos independientes, por ejemplo, la densidad del aire (ρ_a) responderá a la ecuación CIPM-2007 (Picard, et al., 2008):

$$\rho = \frac{p \cdot M_a}{Z \cdot R \cdot T} \left[1 - x_v \cdot \left(1 - \frac{M_v}{M_a} \right) \right]$$

Con:

- ρ : Densidad del aire en kg/m³.
- p : Presión atmosférica en Pa.
- M_a : Masa molar de aire seco = 28,96546.10⁻³ kg/mol.
- Z : Factor de compresibilidad adimensional.
- R : Constante molar de los gases.
- T : Temperatura en K.
- x_v : Fracción molar de vapor de agua adimensional.
- M_v : Masa molar de vapor de agua 0,01801528 kg/Mol.

El valor de x_v se determina a partir de:

$$x_v = \frac{h}{100} (\alpha + \beta \cdot p + \gamma \cdot t^2) \cdot \frac{e^{(AT^2+BT+C+\frac{D}{T})}}{P}$$

Mientras que Z está determinada por la fórmula:

$$Z = 1 + \frac{P}{T} [a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + (b_0 + b_1 t)x_v + (c_0 + c_1 t)x_v^2] + \frac{p^2}{T^2} (d + ex_v^2)$$

Con:

- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> t: Temperatura ambiente °C. h: Humedad relativa. α: 1,0062. β: 3,14 x 10⁻⁸ Pa⁻¹. γ: 5,6.x10⁻⁷ k⁻². A: 1,2378847 x 10⁻⁵ k⁻². B: -1,9121316 x 10⁻² k⁻¹. C: 33,93711047. D: -6,3431645 x 10⁻³ K. | <ul style="list-style-type: none"> a_0 = 1,58123 x 10⁻⁶ KPa⁻¹. a_1 = -2,9331 x 10⁻⁸ Pa⁻¹. a_2 = 1,1043 x 10⁻¹⁰ K⁻¹Pa⁻¹. b_0 = 5,707 x 10⁻⁶ KPa⁻¹. b_1 = -2,051 x 10⁻⁸ Pa⁻¹. c_0 = 1,9898 x 10⁻⁴ KPa⁻¹. c_1 = -2,376 x 10⁻⁶. d = 1,83 x 10⁻¹¹ k²Pa⁻². e = -0,765 x 10⁻⁸ K²Pa⁻². |
|---|--|

Puede verse que la densidad del aire dependerá de las condiciones de humedad y temperatura ambiente, además de

la presión atmosférica. En este trabajo se calcula el intervalo de valores de h , t y P durante la calibración. A partir de esta ecuación se obtiene un valor único de ρ_a al que se le asigna la incertidumbre calculada según método analítico. Este valor y su incertidumbre asociada son válidos tanto para el método GUM como para MMC (Constantino, 2013).

En el caso de la temperatura del ensamble pistón-cilindro, su valor será la media de toda la calibración con una incertidumbre indicada por el informe de calibración del sensor de temperatura, a la que se adicionará una variable de variación de temperatura de valor cero (Δt_p) cuya incertidumbre será representada por medio de una FDP uniforme con intervalo en sus cotas máxima y mínima.

Otro parámetro variable que no puede obtenerse directamente es la densidad del fluido, en este caso Nitrógeno. Debe tenerse en cuenta que esta densidad variará significativamente en cada punto medido del intervalo de lectura, dependiente de la presión (p) y temperatura (T), y responderá a la expresión:

$$\rho_{f(T,P)} = \rho_{f(T_0,p_0)} \cdot \frac{p}{p_0} \cdot \frac{T_0}{T}$$

Donde:

- $\rho_{f(T,P)}$: Densidad del Nitrógeno a temperatura T y presión p.
- $\rho_{f(T_0,p_0)}$: 1,25046 kg.m⁻³.
- p_0 : 1013,25 hPa.
- T_0 : 273,15 K.

Para este parámetro se asignará una incertidumbre del 5% de su valor, según una DDP uniforme.

Otro parámetro que variará es el set de masas utilizado. La densidad de las mismas es 8000 kg/m³, ya que tanto las pesas como el pistón y la campana de soporte están calibrados en masa convencional.

Finalmente, debe tenerse en cuenta la ecuación propia de la calibración del instrumento digital. Esta puede expresarse para la corrección media ascendente/descendente según la guía DKD-R 6-1 ec. 9 y 10 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003):

$$C_i = \Delta p_i = pp_i - pl_i + (\delta_{p,desv.cero} + \delta_{p,repeticibilidad} + \delta_{p,histéresis})_i$$

Donde pp_i corresponde a la presión generada por el patrón, pl_i al promedio de lecturas del calibrando en el intervalo i , $\delta_{p,desv.cero}$, $\delta_{p,repeticibilidad}$ y $\delta_{p,histéresis}$ corresponden a las contribuciones de incertidumbre para la desviación de cero, la repetibilidad y la histéresis, respectivamente.

La ecuación resultante para la corrección media en cada punto i del intervalo calibrado es entonces:

$$C_i = \frac{\Sigma M_i \cdot gl \cdot (1 - \frac{\rho_a}{\rho_m})}{A_{(0,tr)} \cdot \{1 + \alpha [(t_p + \Delta t_p) - t_r] \cdot (1 + \lambda \cdot P_{Ni})\}} + \left\{ \left[(1,25046 \cdot \frac{(P_{Ni} + 1x10^5)}{101325} \cdot \frac{273,15}{273,15 + t_p}) - \rho_a \right] \cdot gl \cdot \Delta h \right\} - pl_i + (\delta_{p,desv.cero} + \delta_{p,repeticibilidad} + \delta_{p,histéresis})_i$$

Para simplificar el cálculo de los coeficientes de sensibilidad en el método analítico el cálculo se realiza en forma secuencial según la ecuación:

$$C_i = \frac{F_i}{A_i} + Cnr - pl_i + (\delta_{p.desv.cero} + \delta_{p.repetibilidad} + \delta_{p.histéresis})_i$$

Donde: F representa la fuerza aplicada, A el área efectiva del ensamble pistón-cilindro y Cnr la corrección por nivel de referencia.

$$F = \sum M \cdot gl \cdot (1 - \frac{\rho_a}{\rho_m})$$

$$A = A_{(0, tr)} \cdot \{1 + \alpha[(t_p + \Delta t_p) - t_r] \cdot (1 + \lambda \cdot P_{Ni})\}$$

$$Cnr = \left\{ \left(1,25046 \cdot \frac{P_{Ni}}{1013,25} \cdot \frac{273,15}{273,15 + (t_p + \Delta t_p)} \right) - \rho_a \right\} \cdot gl \cdot \Delta h$$

Resultados

En el ensayo realizado las componentes de desviación de cero y de repetibilidad, calculada como el desvío estándar de 10 medidas, arrojaron un valor nulo. Por su parte, solamente los puntos correspondientes a 0,68 MPa, 1,36 MPa y 2,38 MPa presentaron histéresis no nulas, de valor 100 Pa (una división) en todos los casos. Estos puntos se marcan con fondo oscuro en las tablas para facilitar la visualización de las conclusiones.

La Tabla 1 resume los resultados e incertidumbre obtenidos para cada intervalo, según los métodos de cálculo utilizados. Para poder realizar una evaluación comparativa entre los métodos de cálculo según el concepto de tolerancia numérica, se expresan las incertidumbres obtenidas con un número mayor de cifras significativas al indicado según GUM. Como criterio de comparación se utiliza el concepto de tolerancia numérica δ de la incertidumbre (JCGM, 2008b, pp. 31-35).

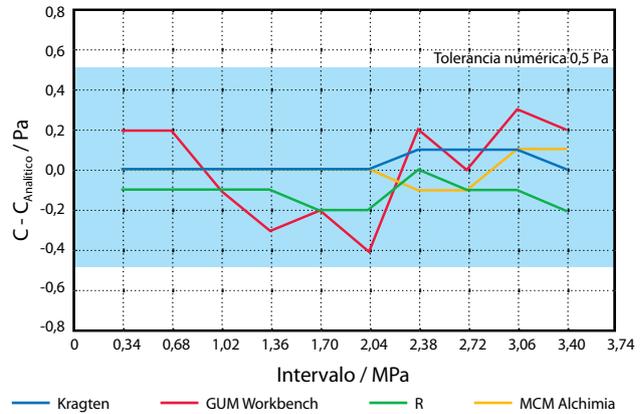


Gráfico 1. Resultados del mesurando según los cinco métodos de cálculo y tolerancia numérica de U.

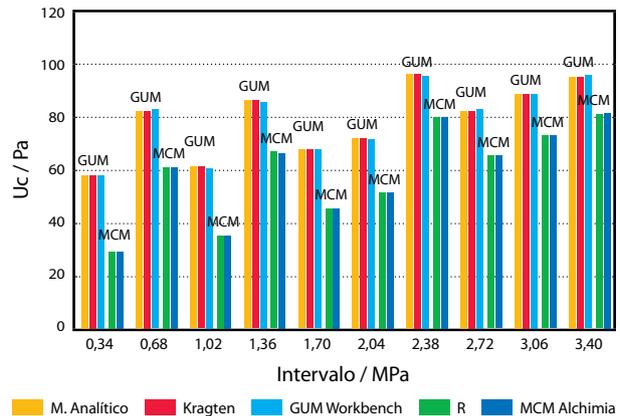


Gráfico 2. Diagrama comparativo de incertidumbre expandida, métodos GUM y MCM.

Nominal/MPa	Resultados del mesurando-Corrección/Pa					Criterio
	GUM	Aproximación numérica (GUM)		Monte Carlo		Tol. numérica
	Analítico	Kragten	GUM Workbench	R	MCM Alchimia	δ /Pa
0,34	-2,2	-2,2	-2	-2,3	-2,2	0,5
0,68	33,8	33,8	34	33,7	33,8	0,5
1,02	26,1	26,1	26	26,0	26,1	0,5
1,36	137,3	137,3	137	137,2	137,3	0,5
1,70	194,2	194,2	194	194,0	194,2	0,5
2,04	320,4	320,4	320	320,2	320,4	0,5
2,38	337,8	337,9	338	337,8	337,7	0,5
2,72	403,0	403,1	403	402,9	402,9	0,5
3,06	537,7	537,8	538	537,6	537,8	0,5
3,40	375,8	375,8	376	375,6	375,9	0,5

Tabla 1. Resultados del mesurando según los cinco métodos de cálculo.

Nominal/MPa	Evaluación de incertidumbre expandida- U_c /Pa					
	GUM		Aproximación numérica (GUM)		Monte Carlo	
	M. Analítico	Kragten	GUM Workbench	R	MCM Alchimia	
0,34	58,2	58,2	58	29,3	29,3	
0,68	82,8	82,8	83	61,5	61,3	
1,02	61,5	61,5	61	35,6	35,5	
1,36	86,4	86,4	86	66,9	66,7	
1,70	67,8	67,8	68	45,7	45,8	
2,04	72,1	72,1	72	51,8	51,8	
2,38	96,2	96,2	96	80,2	80,5	
2,72	82,6	82,6	83	65,5	65,7	
3,06	88,7	88,7	89	73,4	73,3	
3,40	95,5	95,5	96	81,4	81,5	

Tabla 2. Incertidumbre expandida del mesurando según los cinco métodos de cálculo.

Discusión

En referencia a los resultados de calibración, el Gráfico 1 muestra que no existen diferencias significativas entre ninguno de los enfoques o herramientas de cálculo utilizados en lo que refiere al resultado del mesurando. Es pertinente notar que la mayor variación corresponde al método GUM Workbench. La magnitud de estas diferencias puede deberse a que en este software no pueden obtenerse los resultados con más cifras significativas de las que determina la expresión de incertidumbre de acuerdo a GUM (JCGM, 2008a), lo que aporta una diferencia mayor con respecto al valor calculado analíticamente, debido al redondeo.

Por su parte, la Tabla 2 y el Gráfico 2 expresan que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos utilizando herramientas basadas en la plataforma GUM, como tampoco existen entre aquellas herramientas que permiten realizar el cálculo por medio de simulaciones de Monte Carlo (R y MCM Alchimia). Sin embargo, existe un importante sesgo entre las incertidumbres expandidas obtenidas por medio de estos dos métodos estadísticos, GUM y MCM.

La guía JCGM101:2008 (JCGM, 2008b, p. 34) indica que en caso de diferencias entre GUM y MCM mayores que la tolerancia numérica δ , el valor de MCM debe ser considerado correcto, no obstante diferencias de esta magnitud no pueden ser explicadas por un cambio en el enfoque de cálculo, sino que deben hacerse consideraciones al modelo matemático propuesto en cada caso que permitan justificar esas diferencias. Se evalúan posibles contribuyentes de incertidumbre según el método analítico GUM y comparan con los valores obtenidos para el MCM mediante el lenguaje R.

La Tabla 3 muestra que no existen diferencias significativas entre las incertidumbres obtenidas para la presión generada según GUM y MCM. Como se planteó anteriormente, la repetibilidad y el desvío de cero arrojaron incertidumbre nula. Por otra parte, la histéresis solo influye en tres de los puntos, por lo que el sesgo no puede ser explicado por los valores de incertidumbres de los contribuyentes individuales.

Incertidumbre en la presión generada por el patrón

Nominal/MPa	$U_{P.Patrón}$ /Pa	
	GUM	MCM
0,34	6,98	6,96
0,68	14,0	13,9
1,02	21,1	21,0
1,36	28,2	28,2
1,70	35,6	35,5
2,04	43,2	43,0
2,38	50,9	50,8
2,72	59,0	58,9
3,06	67,4	67,3
3,40	76,1	75,9

Tabla 3. Incertidumbre expandida de presión del patrón según GUM y MCM.

Cálculo de U_{pl} según DKD-R 6-1

La guía DKD-R 6-1:2003 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003) propone utilizar el valor promedio de las lecturas con una FDP uniforme de intervalo igual al valor de la división del calibrando. Por ejemplo, en el caso de la ec. 1 de esta guía se indica que:

$$U_{up/down} = k \cdot \sqrt{u_{standard}^2 + u_{resolution}^2 + u_{zero-deviation}^2 + u_{repeatability}^2}$$

Sin embargo, este modelo de estimación no toma en cuenta que el valor de lectura del calibrando (pl) está compuesto por un promedio de dos distribuciones uniformes, lo que resulta en una distribución triangular de probabilidad, con intervalo igual a la resolución del calibrando. Como en el ensayo se realiza en base a dos corridas, también debe evaluarse si el valor de esta magnitud es obtenido como el promedio ascendente/descendente en una corrida o si se promedian además ambas corridas. En este último caso tampoco es correcto utilizar esta distribución triangular, ya que el valor de P es obtenido de promediar nuevamente dos magnitudes con FDP triangular o las cuatro lecturas con distribución uniforme.

El Gráfico 3 compara la incertidumbre estándar en la lectura del calibrando (pl) aplicando la ley de propagación de incertidumbres a las cuatro opciones anteriores.

u_{pl} según forma de cálculo

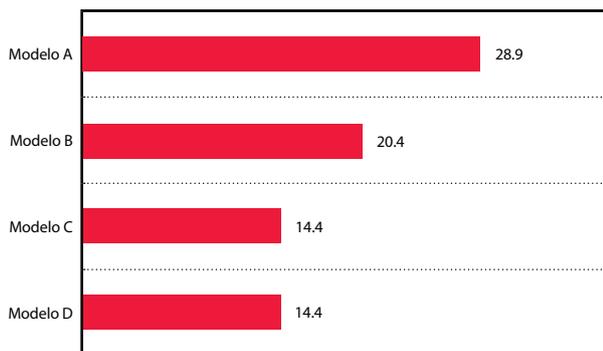


Gráfico 3. Incertidumbre estándar de pl según 4 modelos de cálculo.

Donde:

Modelo A: Cálculo según DKD-R 6-1.

Modelo B: $pl = (pl_{ascenso} + pl_{descenso})/2$.

Modelo C: $pl = (pl_{AD,corrida1} + pl_{AD,corrida2})/2$.

Modelo D: $pl = (pl_1 + pl_2 + pl_3 + pl_4)/4$.

En este caso pl_{AD} corresponde al valor promedio ascenso/descenso a cuya incertidumbre se asigna distribución triangular resultante del promedio, mientras que pl_i corresponde a lecturas individuales con FDP uniforme. Es pertinente notar que el resultado en los casos C y D son iguales entre sí pero diferentes a los obtenidos según modelos A y B, ya que estos últimos incluyen dos lecturas adicionales.

Cálculo de U_{pp} según DKD-R 6-1

La misma consideración anterior puede hacerse en el caso de la presión generada por el patrón, que es tomada cuatro veces y de ellas se obtendrá un promedio. Sin embargo, en este ensayo en el que el patrón es una balanza de presión las incertidumbres controlantes del modelo son las correspondientes a la calibración de las masas y de las dimensiones y coef. de deformación λ del ensamble pistón/cilindro. Es razonable que estas magnitudes de contribución tipo B se consideren correlacionadas con coeficiente de correlación de 1 en las cuatro medidas, por lo que en este caso puede suponerse una sola medida del patrón y es aceptable suponer el modelo propuesto por DKD-R 6-1 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003) para este parámetro.

Cálculo de $U_{\Delta P}$ según MCM

El modelo MCM, libre de consideraciones deterministas, implica considerar todas las operaciones necesarias para arribar al resultado, las cuales impactan en el resultado de incertidumbre, tanto en su valor como en su distribución de probabilidad. En el modelo matemático propuesto para MCM se promediaron los valores de corrección $=pp-pl$ en las cuatro lecturas:

$$\Delta P = \frac{(pp_1 - pl_1) + (pp_2 - pl_2) + (pp_3 - pl_3) + (pp_4 - pl_4)}{4}$$

Donde pp_i corresponde a la presión generada por el patrón en la corrida i y pl_i al valor correspondiente en la lectura del calibrando. Este modelo con el cual se realizaron los cálculos primarios no tiene en cuenta, no obstante, la correlación existente entre las lecturas del patrón mencionada antes.

Cálculo comparativo con el modelo matemático de DKD-R 6-1 corregido

La Tabla 4 expone la incertidumbre expandida para las correcciones aplicando los métodos GUM (analítico) y MCM (software R) al mismo modelo corregido según las consideraciones anteriores:

$$C_i = pp_i - \left(\frac{p_{1,i} + p_{2,i} + p_{3,i} + p_{4,i}}{4} \right)_i + (\delta_{p,desv.cero} + \delta_{p,repetibilidad} + \delta_{p,histéresis})_i$$

Nominal/MPa	U_C/Pa		Σ	k calculado
	GUM	MCM		
0,34	29,7	29,3	14,9	1,97
0,68	66,0	61,5	33,1	1,85
1,02	35,7	35,6	17,8	2,00
1,36	70,5	66,9	35,2	1,90
1,70	45,8	45,7	22,9	2,00
2,04	51,9	51,8	26,0	1,99
2,38	82,2	80,1	41,0	1,95
2,72	65,7	65,6	32,8	2,00
3,06	73,3	73,5	36,7	2,00
3,40	81,4	81,4	40,7	2,00

Tabla 4. Incertidumbre expandida del modelo matemático corregido.

Puede notarse primeramente a partir de esta Tabla 4 (en segunda y tercera columna) que los resultados en MCM, contemplando las magnitudes correlacionadas, son idénticos a los calculados sin tener en cuenta esta consideración (Tabla 2, columna «R»). Una segunda observación es que la mayoría de los puntos arrojan resultados idénticos entre GUM y MCM, excepto en tres de ellos que son precisamente aquellos que presentan histéresis no nula.

El Gráfico 4 presenta histogramas de frecuencias de la simulación, aportados por el software R, para dos puntos consecutivos, uno de ellos con histéresis no nula (Punto 0,68 MPa) y el otro (Punto 1,02 MPa) sin aportar incertidumbre por histéresis.

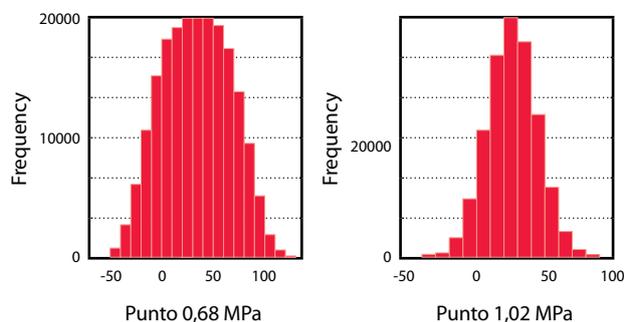


Gráfico 4. Histogramas comparativos para puntos con y sin histéresis.

En el primer caso puede verse que la histéresis (con FDP uniforme) «uniformiza» en buena medida la función distribución resultante del modelo. Al perder su forma gaussiana, la plataforma GUM se aleja de los resultados de MCM y por tanto deja de tener validez como estimador de incertidumbre para el modelo. El menor valor de U en estos casos es debido a que para un nivel de confianza del 95,45% el factor de cobertura que se obtiene de GUM para un resultado con FDP Normal es de 2, en tanto si la función distribución fuera perfectamente uniforme, el factor de cobertura para un nivel de confianza de 95,45% es cercano al 1,7 (JCGM, 2008a, p. 70). La cuarta y quinta columna de la Tabla 4 muestran el desvío estándar (σ) del vector resultante por MCM y su k calculado como U_C/σ a partir de esta colección de resultados. Se observa que en los puntos con histéresis no nula el k calculado es de menor valor que el supuesto para una distribución normal, mientras que el resto pueden asumirse normales, como supone la plataforma GUM de acuerdo al teorema del límite central.

Conclusiones

Modelo DKD-R 6-1 (Deutscher Kalibrierdienst, 2003). El modelo de estimación de incertidumbre propuesto por esta guía no resultó validado por los valores obtenidos por MCM. Este cálculo arroja valores de U sobreestimados, ya que no tienen en cuenta la obtención del valor de lectura del calibrando a partir de un promedio de lecturas independientes. Estos resultados erróneos pueden resolverse realizando el cálculo a partir del modelo corregido propuesto en este artículo (Tabla 4).

GUM vs. MCM. Se observa que el método GUM aplicado al modelo corregido puede considerarse válido en tanto una magnitud de entrada con FDP uniforme no sea la magnitud controlante del proceso. En este último caso, el factor de cobertura k tomará valores menores a 2 para un

nivel de confianza de 95,45%, por lo que el método GUM en estos puntos no es aplicable. Debe tenerse en cuenta que en la calibración de instrumentos de baja precisión estas magnitudes uniformes pueden ser controlantes en todo el intervalo de lectura, por lo que el método GUM podría no ser válido (JCGM, 2008b, p. 34) en ningún punto a lo largo del intervalo de lectura del instrumento.

Magnitudes correlacionadas. No se encontraron diferencias entre los valores calculados teniendo en cuenta la correlación existente para valores del patrón y los resultados obtenidos considerando todas magnitudes independientes.

Herramientas de cálculo. No se encontraron diferencias entre los resultados de calibración obtenidos por las diferentes herramientas de cálculo aplicadas, obteniéndose resultados idénticos al método analítico a partir de las cuatro herramientas alternativas. Respecto al valor de incertidumbre expandida, se obtuvieron valores equivalentes al método analítico según las herramientas basadas en la ley de propagación de incertidumbres (métodos Kragten y GUM Workbench), así como resultados equivalentes entre sí para las dos herramientas basadas en el método de Monte Carlo (software R y MCM Alchimia).

Reconocimientos

Se agradece al personal del departamento de Metrología Química del LATU, que organizó el ensayo de aptitud que permitió la realización de este estudio.

Referencias

- Constantino, Pablo, 2013. Aspectos computacionales en la estimación de incertidumbres de ensayo por el Método de Monte Carlo. En: *INNOTEC*, (8), pp.3-22.
- Deutscher Kalibrierdienst, 2003. *Guideline DKD-R 6-1. Calibración of pressure gauge* [En línea]. Braunschweig: DKD. [Consulta 10 de abril de 2014]. Disponible en: http://www.dkd.eu/dokumente/Richtlinien/dkd_r_6_1_e.pdf
- JCGM, 2008a. *JCGM 100. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement*. [En línea]. Sèvres: JCGM. [Consulta 2 de mayo de 2013] Disponible en: http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf
- JCGM, 2008b. *JCGM 101. Evaluación of measurement data – Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” – Propagation of distributions using a Monte Carlo method* [En línea]. Sèvres: JCGM. [Consulta 2 de mayo de 2013] Disponible en: http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf
- Kragten, J., 1995. A standard scheme for calculating numerically standard deviation and confidence intervals. En: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, (28), pp.89-97.
- Picard, A., Davis, R.S., Glaser, M., Fujii, K., 2008. Revised formula for the density of moist air (CIPM-2007). En: *Metrologia*, (45), pp.149–155.

Diseño de un instrumento de bajo costo para la calibración de micromanómetros diferenciales

Design of a low cost device for the calibration of differential micromanometer

Constantino, Pablo ⁽¹⁾, Camacho, Javier ⁽²⁾, Maciel, Andrés ⁽¹⁾, Acquarone, Alejandro ⁽¹⁾.

⁽¹⁾Departamento de Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - ⁽²⁾ VIA University College Denmark.

Contacto: pconstan@latu.org.uy

RECIBIDO: 21/5/2014 - APROBADO: 26/11/2014

Resumen

Este artículo describe el diseño y construcción de un prototipo de sistema primario basado en el sistema de campana invertida para la calibración de medidores de presión diferencial de rangos bajos. Se discute la construcción del instrumento, se realiza una caracterización dimensional y se efectúa la calibración de un sensor diferencial electrónico, comparando estos resultados con los obtenidos por el Centro Español de Metrología (CEM) para el mismo instrumento.

Palabras clave: Metrología, presión, campana invertida, presión diferencial, micromanómetro.

Abstract

This paper describes the design and development of a primary system prototype based on the diving bell manometer, for the calibration of low range differential pressure gauges. Construction of the instrument is discussed, and a basic dimensional characterization is accomplished. With this prototype a digital differential sensor calibration is performed, and then compared these results with those obtained by the Spanish National Metrology Institute (CEM) for the same instrument.

Keywords: Metrology, pressure, diving bell, differential manometer, micromanometer.

Introducción

Cada vez es más frecuente en Uruguay la necesidad de calibrar equipos medidores de intervalos ultra bajos de presión, del orden de 1 a 3 kPa en plena escala. Si bien son instrumentos que existen en el mercado hace años, las aplicaciones existentes eran mayormente para reducción de costos en sistemas de aire acondicionado, control de fugas en la industria o similares, para los cuales las exigencias en exactitud u otras condiciones metrológicas de los instrumentos no eran muy demandantes. En estos últimos años, en la medida que más laboratorios uruguayos implementan sistemas de calidad consistentes con ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization, 2005), comienza a surgir la necesidad de contar con patrones adecuados para satisfacer la demanda de calibración de estos instrumentos. Las aplicaciones de micromanómetros diferenciales son variadas, al igual que las precisiones y tipos de instrumentos disponibles. Además de las aplicaciones mencionadas, se utilizan en equipos médicos, salas de presurización o certificación de salas limpias, donde deben existir atmósferas controladas que permitan establecer condiciones adecuadas de trabajo y baja contaminación.

La dificultad principal en la calibración de este tipo de instrumentos de intervalos tan bajos de presión es que la incertidumbre relativa aportada por los patrones normales suele ser excesiva en relación a la resolución de los mismos.

Cuando se requieren calibraciones de alta precisión, se deben utilizar patrones de tipo fundamental, que pueden ser balanzas diferenciales de presión que constan de dos ensambles pistón-cilindro dispuestos en la misma plataforma. También es posible conectar dos balanzas con ensambles pistón-cilindro similares a las entradas de baja y alta presión del instrumento diferencial. En ambos casos se realizan pequeñas variaciones de masa en uno de los ensambles para efectuar la comparación a lo largo del intervalo de lectura del instrumento.

Debido al alto costo de los patrones fundamentales de pistón-cilindro, este sistema de medida resulta inadecuado para la actual demanda existente en Uruguay, por lo que se propone buscar una solución alternativa que permita obtener incertidumbres de calibración adecuadas a las necesidades de los laboratorios locales, sin realizar inversiones tan elevadas. Por otra parte, la utilización de patrones digitales tampoco representa una solución a la demanda, ya que los bajos intervalos de confirmación metrológica para equipos digitales y la necesidad de calibrar los mismos en laboratorios del exterior implica necesariamente la intermitencia del servicio a lo largo del año.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo y la construcción de un prototipo de bajo costo basado en el sistema de Campana invertida (o campana sumergida), que pueda ser caracterizado dimensionalmente en el laboratorio de Longitud del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Con

este prototipo se realizan mediciones de un equipo digital para verificar el correcto funcionamiento de este sistema modificado y se evalúan mejoras y correcciones al diseño que permitan desarrollar un instrumento final capaz de medir presiones diferenciales con exactitud e incertidumbre adecuadas.

Materiales y Métodos

Sistema de campana invertida

Este antiguo sistema mecánico de medición de presión diferencial, hoy en desuso, consta de dos campanas de acero inoxidable invertidas, sumergidas parcialmente en un líquido y suspendidas de la palanca o brazo de una balanza de dos platos, funcionando en equilibrio. Al variar la cantidad de gas dentro de una de las campanas, este desplaza el líquido interior generando una fuerza de empuje positiva o negativa que debe equilibrarse con pesos en la balanza. El área efectiva de la campana, obtenida mediante la calibración dimensional y la diferencia de masa entre los platos, determina la diferencia de presión entre una y otra campana según la ecuación:

$$\Delta P = \frac{m \cdot g_l}{A}$$

Con: m la masa agregada, g_l la gravedad local y A el área efectiva de la campana.

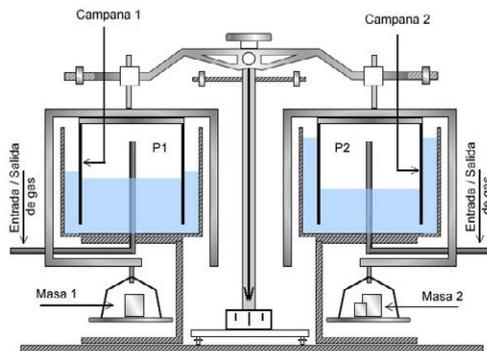


Figura 1. Diagrama de balanza de dos campanas.

Si bien este es el sistema básico, se han propuesto también sistemas en los que las campanas están conectadas a una balanza de torsión y la lectura en unidades de presión se realiza en forma directa (Rostron Hindley, 1947).

En algunos laboratorios nacionales existen aún hoy en servicio balanzas de campana simple, donde una sola campana es suspendida de uno de los brazos de una balanza de dos platos, mientras que el otro se conserva con un plato simple, equilibrado con masas. La variación de masas en uno y otro plato determina el diferencial de presión positivo y negativo.

Aunque este tipo de equipos se ha dejado de fabricar, la evolución de la metrología en las últimas décadas permite realizar mediciones dimensionales y de masa con mucha facilidad y precisión, por lo que algunas características pueden ser simplificadas y modernizadas para mejorar el instrumento tradicional.

El diseño propuesto es un sistema de campana de tipo simple (una sola campana) suspendido de una balanza digital en la cual se leerán las diferencias de masa.

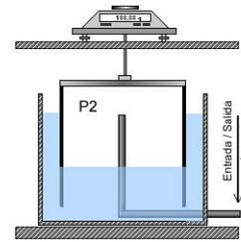


Figura 2. Diagrama del prototipo propuesto.

Elemento sensor. Como elemento sensor (cilindro de campana) se requiere utilizar un cilindro recto, en lo posible sin costuras ni deformidades visibles en el extremo cerrado que puedan incrementar la incertidumbre en la medida del área específica en forma dimensional. El largo de este elemento también es importante, ya que esta magnitud determinará el intervalo de medición de la balanza. Luego de varias propuestas se decide utilizar una sección de termo de acero inoxidable, cortado con un cortador de tubos.

Depósito. El depósito contenedor de fluido dentro del cual estará sumergida parcialmente la campana invertida debe tener convenientemente un diámetro cercano al de la campana. Por otra parte, se prioriza la transparencia del mismo para permitir la visualización del comportamiento del instrumento en servicio. Para esto se utiliza un cilindro de vidrio con una perforación a través de la cual se introducirá un tubo de acero inoxidable con el que se variará la presión del sistema. Para simplificar el modelo, este mismo tubo oficiará de venteo para el equilibrio inicial del instrumento. Como fluido se utiliza agua destilada.

Instrumentos de medición. La caracterización del instrumento depende básicamente de la medición del diámetro interior de la campana a partir del cual se calculará el área específica. Debido a la geometría del instrumento, no se cuenta en el LATU con patrones adecuados para medir el diámetro interior en forma directa, por tanto se opta por medir el diámetro exterior con un reloj comparador Mitutoyo modelo ID-G112X, ajustando el cero del instrumento con un bloque patrón clase 0 (Mitutoyo) (Figuras 3 y 4) de dimensiones similares al diámetro estimado.



Figura 3. Ajuste de cero del comparador.

El espesor de chapa se mide con un micrómetro, intercalando en la cara interna del cilindro (campana) una esfera de acero de diámetro conocido (Figuras 5 y 6).



Figura 4. Medición del diámetro exterior de la campana.



Figura 5. Medición del espesor de chapa.

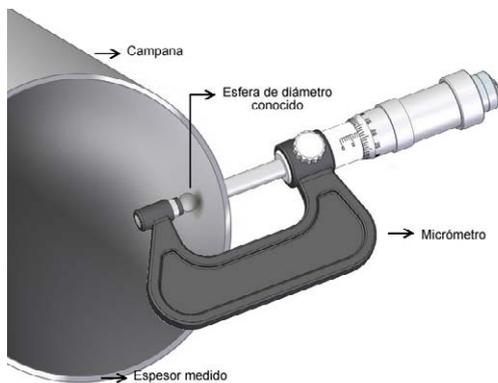


Figura 6. Diagrama de medición del espesor de chapa.

Para las medidas de masa se utilizará una balanza marca Mettler modelo PJ3000 con intervalo nominal 3000 g y divi-

sión 0,02 g debido a su adecuado rango de medida, además de contar con dispositivo para pesar colgando del plato.

Validación de las mediciones. Para la prueba de funcionamiento y validación de resultados se calibra un módulo de presión diferencial FLUKE modelo 700P01 y se comparan los resultados con los obtenidos por otro NMI (Instituto Nacional de Metrología) con magnitudes declaradas en KCDB (Key Comparison Database) del BIPM (Oficina Internacional de Pesas y Medidas) para este intervalo.

Modelo matemático. La presión generada por un manómetro de campana invertida está dada por la siguiente ecuación (Zvizdic, et al., 2007):

$$P = \frac{\left[\sum_i \left[m_i \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_{mi}} \right) \right] \right] \cdot g}{A_o \cdot [1 + 2 \cdot \alpha (t - 20)]}$$

Donde A_o es el área efectiva a la temperatura de referencia, g es la gravedad local, ρ_a es la densidad de aire circundante y ρ_{mi} la densidad de las masas en el punto i . α es el coeficiente de expansión térmica lineal de la balanza y el depósito, y finalmente t es la temperatura de la balanza durante su uso.

La medida del área (A_o), teniendo en cuenta el método de medida, se obtiene a partir del diámetro según:

$$A_o = \pi \left(\frac{D_e - 2 \cdot E}{2} \right)^2$$

Donde D_e es el diámetro exterior y E el espesor de chapa. Para el cálculo de incertidumbre se tuvieron en cuenta las incertidumbres de calibración del micrómetro y comparador, repetibilidad, variación de temperatura, incertidumbre en la calibración de la esfera, resolución de los instrumentos y el componente de variabilidad debida al cambio en el eje del cilindro. Dado el pobre acabado del objeto utilizado como campana, la existencia de soldaduras y la falta de rigidez se obtuvo un valor de incertidumbre tipo A, más de 10^3 veces mayor que el conjunto de componentes tipo B, por lo que en este prototipo estas últimas pueden considerarse despreciables.

Resultados

Se construyó el prototipo con las partes mencionadas. La Figura 7 muestra dos perspectivas del prototipo construido. En las fotos el instrumento está conectado al módulo de presión Fluke con el que se realiza la validación de las mediciones.



Figura 7. Balanza de campana conectada a un módulo de presión diferencial.

Para las mediciones del diámetro de campana se realizaron 5 repeticiones de medidas en 3 diámetros girados 120° entre sí a 1 cm aproximadamente del extremo cerrado de la campana. Las medidas a lo largo de la altura de la campana no se pudieron realizar; la fuerza de medida del reloj comparador deformaba significativamente la geometría del cilindro provocando errores importantes en el diámetro medido.

Resultados de las mediciones

Intervalo máximo de medición en la campana = 8 mbar. El poco peso de la campana y su distribución no permite el correcto funcionamiento más allá de este valor debido a que pierde verticalidad variando el área específica en un valor desconocido.

$$\text{Área específica de la campana} = A_0 = (4,3866 \times 10^{-3} \pm 3,9 \times 10^{-6}) \text{ m}^2$$

Validación de mediciones. Se realiza la calibración de un sensor piezoresistivo marca FLUKE modelo 700P01 y se comparan estos resultados con los obtenidos por el CEM para el mismo instrumento.

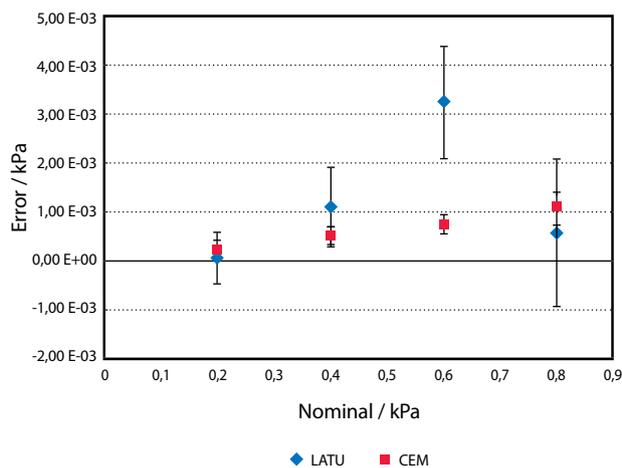


Gráfico 1. Resultados de calibración comparativos LATU-CEM.

El análisis de errores normalizados arroja resultados concordantes en todos los puntos excepto el correspondiente a 0,6 kPa que parece estar fuera de la tendencia. Una

posible explicación de esta conducta irregular es que al utilizar cilindros de uso doméstico puede haberse dado un rozamiento entre la campana y el contenedor por defectos en la geometría de ambos.

Nominal / kPa	Error normalizado
0,2	0,3
0,4	0,7
0,6	2,1
0,8	0,4

Tabla 2. Errores normalizados LATU-CEM.

Al aplicar una regresión lineal en ambas calibraciones puede verse que se obtienen resultados casi idénticos.

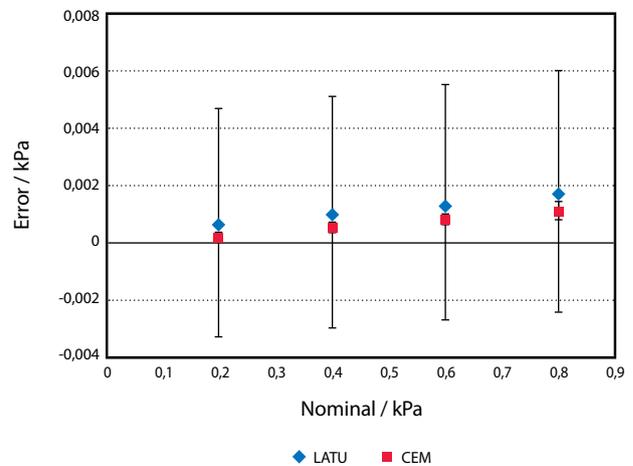


Gráfico 2. Resultados de regresión comparativos LATU-CEM.

La contribución de incertidumbre aportada por la regresión en el caso de los resultados obtenidos con la campana invertida es significativa debido a la falta de linealidad de los puntos en la curva. Sin embargo, al amortiguar las diferencias con un ajuste lineal puede verse que la curva de calibración obtenida con el prototipo es casi idéntica a la obtenida por CEM.

Nominal / kPa	Resultados LATU		Resultados CEM	
	Error / kPa	U _{Error} / kPa	Error / kPa	U _{Error} / kPa
0,2	7 x 10 ⁻⁵	5,3 x 10 ⁻⁴	2,5 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ⁻⁴
0,4	1,09 x 10 ⁻³	8,2 x 10 ⁻⁴	5,0 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ⁻⁴
0,6	3,2 x 10 ⁻³	1,1 x 10 ⁻³	7,6 x 10 ⁻⁴	1,2 x 10 ⁻⁴
0,8	6 x 10 ⁻⁴	1,5 x 10 ⁻³	1,11 x 10 ⁻³	2,9 x 10 ⁻⁴

Tabla 1. Resultados de calibración comparativos LATU-CEM.

Conclusiones

Resultados

Si bien el objetivo de este trabajo es solamente la construcción y prueba de un prototipo de bajo costo, los resultados obtenidos con el mismo son muy cercanos a los de una calibración anterior realizada por un NMI con capacidades reconocidas, por lo que el sistema diseñado se considera confiable.

Características constructivas

A continuación se enumeran algunas mejoras necesarias para el desarrollo de un equipo definitivo, de acuerdo a las observaciones realizadas durante el ejercicio con este prototipo.

- **Masa de la campana.** La masa de la campana elegida es insuficiente, lo que impidió utilizar el instrumento en todo el intervalo posible dado por la altura de la campana. Esto se debe a que cuando el empuje (ascendente) es cercano a la fuerza ejercida por la masa, el cilindro pierde estabilidad. Esto provoca la pérdida de la verticalidad afectando el valor de área específica expuesta. Es recomendable utilizar una masa al menos 5 veces mayor que la equivalente al empuje para el máximo intervalo posible.
- **Diámetro.** Las características dimensionales del elemento sensor son controlantes en la incertidumbre del instrumento, en particular el diámetro. Es deseable utilizar un cilindro con un acabado de precisión para minimizar el aporte de incertidumbre de esta magnitud. Por otra parte es conveniente utilizar un elemento sensor con mayor diámetro. Una mayor área específica permite una mayor precisión, menores incertidumbres relativas y no modifica el intervalo de lectura. Es recomendable un diámetro mayor a 15 cm.
- **Materiales.** Si bien originalmente los elementos se diseñaban de acero inoxidable, estos no permiten ver el comportamiento del fluido dentro y fuera de la campana. Es conveniente, por tanto, evaluar la utilización de un material transparente. Esto permite además tener una referencia del desplazamiento del líquido, con lo que puede estimarse también la presión aplicada, aunque con menor precisión.
- **Rigidez.** El material de la campana debe ser suficientemente rígido, de modo que permita la calibración en diámetro a distintos ejes y alturas.

- **Nivel.** El nivel perfectamente vertical de la campana es crítico para la medida del área específica en servicio, por lo que se recomienda disponer de niveles y dispositivos de ajuste de nivel tanto en la campana como en el depósito para asegurar que trabajen alineados.
- **Balanza.** Las características metrológicas de la balanza utilizada se consideran adecuadas para este instrumento.
- **Sistema general.** Los resultados obtenidos demuestran que el diseño general propuesto para el prototipo es suficientemente preciso para realizar las mediciones propuestas, logrando el objetivo de diseñar un instrumento económico que no insume altos costos para mantener su trazabilidad y que puede ser calibrado en la institución.

Continuación del trabajo

Es recomendable la construcción de un instrumento final basado en el prototipo probado en este ejercicio que incluya las mejoras detalladas anteriormente.

Reconocimientos

Se agradece a todo el personal de Metrología Científica del LATU, quienes de una manera u otra tomaron parte en la discusión del modelo, selección de partes y su posterior construcción. También se extiende el reconocimiento al Sr. Ángel Flores Torres, colega del laboratorio nacional de presión de Chile (ENAE), quien nos proporcionó excelentes fotos y manuales de su balanza Junkalor de campana simple, lo que nos permitió ajustar mejor algunos aspectos de nuestro diseño.

Referencias

- International Organization for Standardization, 2005. ISO/IEC 17025: *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*. Ginebra: ISO.
- Rostron Hindley, H. A., 1947. Direct-reading differential micromanometer. En: *Journal of Scientific Instruments*, 24(11), pp.295-296.
- Zvizdic, D., Grgec Bermanec, L., Schultz, A. y Veliki, T., 2007. Characterization of LPM diving bell manometer. En: *IMEKO. IMEKO 20th TC3, 3rd TC16 and 1st TC22 International Conference Cultivating Metrological Knowledge*. (Mérida 27 de noviembre a 1 de diciembre de 2007). Mérida: IMEKO.

Evaluación de la remoción de nutrientes y compuestos organoclorados y sus rutas de bioacumulación con la planta flotante *Eichhornia crassipes* expuesta a efluentes de pulpa de celulosa

Evaluation of nutrient and chlorinated organics removal and their bioaccumulation pathways with the floating plant *Eichhornia crassipes* exposed to pulp mill effluents

Míguez, Diana ⁽¹⁾, Martínez-Bengochea, Anabel ⁽¹⁾, Carrara, María Victoria ⁽¹⁾, Bombi, Katherine ⁽²⁾, Ferreira, Natalia ⁽²⁾, Cartmell, Elise ⁽³⁾.

⁽¹⁾Departamento Aguas y Productos Químicos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽²⁾Departamento Aguas, Unidad Fray Bentos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU. Parque Industrial, Barrio Anglo, Fray Bentos, Río Negro, Uruguay – ⁽³⁾ Cranfield Water Science Institute, Cranfield University, Bedfordshire, Reino Unido.

Contacto: dmiguez@latu.org.uy

RECIIDO: 30/5/2014 - APROBADO: 20/11/2014

Resumen

El presente trabajo piloto tuvo como objetivo estudiar el proceso de bioacumulación de nutrientes y compuestos organoclorados en *Eichhornia crassipes* expuesta a efluentes de una fábrica de celulosa que vierte en aguas del Río Uruguay, cerca de la ciudad de Fray Bentos, Río Negro, Uruguay. Se caracterizaron los principales atributos del efluente, antes y después del cultivo con *Eichhornia*, así como también se estudiaron las concentraciones de los halógenos orgánicos en plantas control y en plantas sometidas al efluente. Se observaron cambios macroscópicos en la planta, los compuestos organoclorados se bioacumularon principalmente en las hojas, registrándose valores de 9,4 µg/g frente a 2,1 µg/g observados en la biomasa control. La remoción de nutrientes fue del orden del 90%. Los resultados obtenidos sugieren que la fitorremediación con plantas flotables es un método potencialmente ventajoso para ser utilizado como tratamiento terciario en países tropicales y subtropicales para disminuir la concentración de compuestos orgánicos clorados recalcitrantes y como método de remoción de nitratos y fosfatos de efluentes de plantas de celulosa.

Palabras clave: *Eichhornia crassipes*, efluente, fitorremediación, halógenos orgánicos, bioacumulación.

Abstract

The aim of this pilot study was to evaluate the bioaccumulation processes of *Eichhornia crassipes* exposed to a secondary effluent obtained from a Kraft pulp mill that drains the effluents into the River Uruguay, near Fray Bentos city, Río Negro, Uruguay. The effluent was characterized before and after the *Eichhornia* culture, and organic halogens concentrations were determined in control and exposed specimens. Macroscopic changes were observed in the plant and the bioaccumulation routes were studied, the higher chlorinated organic compounds were found in the leaves (at a concentration of 9,4 µg/g by comparison to 2,1 µg/g of the control biomass). Nutrient removal was in the order of 90%. The results suggest that phytoremediation with floating plants can be advantageously alternative as a tertiary treatment methodology in subtropical and tropical countries to diminish the concentration of recalcitrant chlorinated organics and also to remove nitrate and phosphate from pulp mill effluents.

Keywords: *Eichhornia crassipes*, effluent, phytoremediation, chlorinated organics, bioaccumulation.

Introducción

Las plantas flotantes representan importantes hábitats en los ríos y son fuente de alimento de macroinvertebrados, tales

como larvas de insectos y crustáceos, peces, aves y mamíferos acuáticos. El género *Eichhornia* (o jacinto de agua) tiene una distribución muy extendida en cursos de agua del mundo, incluyendo el Río Uruguay. Se trata de una planta tropical

flotante, considerada una especie invasora en diversas regiones del planeta (incluso en la región biogeográfica de origen). Sus tallos y raíces a menudo albergan bacterias fijadoras de nitrógeno, vertebrados e invertebrados, a veces en relaciones simbióticas o como fuente de alimento (Poi de Neiff, 2003; Ruiz Téllez, et al., 2008).

Se asume que las plantas acuáticas representan un componente clave de los humedales, ya que regulan los intercambios entre los sistemas terrestres y acuáticos, son capaces de asimilar directamente los compuestos potencialmente contaminantes, y promueven procesos de purificación aumentando la diversidad biológica y de reacciones químicas. *Eichhornia crassipes* es una especie muy utilizada en la construcción de humedales artificiales, dado que tiene un crecimiento rápido y la propiedad de almacenar nutrientes y contaminantes (Maine, et al., 2007). Por lo tanto, son plantas óptimas para tratamientos de fitorremediación, constituyendo una alternativa de bajo costo que puede ser utilizada para descontaminación de suelos y aguas (Pereira, et al., 2014).

El proceso de bioacumulación utilizando plantas es capaz de eliminar importantes porcentajes de metales pesados tóxicos de efluentes secundarios sin la producción de toxicidad, por lo cual esta técnica es muy recomendable para las aguas que se mezclan con efluentes industriales (Tripathi, et al., 2011), aunque se ha observado que ciertos metales tales como cobre, cobalto y cadmio pueden enlentecer su crecimiento (Buta, et al., 2011). Aprovechando su capacidad de asimilación de contaminantes, se han desarrollado distintos sistemas de tratamiento de efluentes industriales (como por ejemplo efluentes de papeleras) utilizando el jacinto de agua (*E. crassipes*) (Yedla, et al., 2002).

La aplicación de jacintos de agua para el uso del tratamiento terciario de efluentes de plantas de pulpa de celulosa con proceso Kraft es prometedora, puesto que, en condiciones experimentales, se han logrado eficiencias de remoción de materia orgánica de 46-75% y 11-17% de compuestos fenólicos totales (Lagos, et al., 2009). Además, por su capacidad de asimilación de nutrientes, se ha propuesto que *E. crassipes* se puede utilizar como una medida de remediación para los lagos eutróficos, controlando la producción de biomasa fitoplanctónica (Meerhoff, et al., 2002). Actualmente se cuenta con antecedentes científicos sobre el papel de *E. crassipes* en fitorremediación, constatándose la capacidad de estas especies de macrófitos acuáticos para disminuir metales pesados, como el cobre (Cu) y mercurio (Hg), de efluentes (Maine, et al., 2007; Mishra, et al., 2013). En este sentido, este último autor encontró una reducción de Cu del 63,6% en el efluente de una papelería.

De acuerdo a estos antecedentes, se explora la utilización de *Eichhornia crassipes* como estrategia de fitorremediación y complementario al tratamiento químico convencional para eliminar contaminantes tóxicos de efluentes de la industria de la pulpa y el papel.

Materiales y Métodos

Efluente

Las muestras de efluente se obtuvieron de una fábrica ubicada en el bajo Río Uruguay cerca de la ciudad de Fray Bentos, Río Negro, Uruguay. Dicha planta industrial utiliza el proceso elemental Kraft libre de cloro para el blanqueo de celulosa.

El efluente se recogió a la salida del tratamiento secundario durante la producción de invierno del año 2009. Las principales características del efluente fueron: DBO₅ de 29,0 mg/L (como O₂), 0,563 mg/L de amoníaco (como N) y 1,84 mg/L de AOX (como Cl). La muestra del efluente también se caracterizó en términos de contenido de nutrientes (nitritos, nitratos, fósforo total y soluble), pH, conductividad eléctrica y color (ver Tabla 1).

Plantas

Los especímenes de *E. crassipes* que se expusieron al efluente se recolectaron en un sitio aguas arriba de la planta de pulpa de celulosa (latitud: 33° 5'35.31" S; longitud: 58° 10'43.05" W) en octubre del año 2009. Como control negativo para el análisis de organoclorados acumulados en la planta se colectaron ejemplares de *E. crassipes* en el año 2006, antes de la puesta en marcha de la planta de celulosa. Se conservaron distintas partes de las plantas (tallos, hoja y raíces) congeladas a -80 °C para analizarlas y comparar sus concentraciones con las muestras expuestas al efluente.

Tratamientos

En noviembre de 2009 los ejemplares de *E. crassipes* fueron expuestos al efluente por duplicado, utilizando régimen de lote, en tanques de polietileno de 20 litros conteniendo cinco litros de la muestra de efluente cada uno (Figura 1). La exposición fue de 31 días y se mantuvo en un lugar protegido dentro del laboratorio, con luz natural y a temperatura ambiente. Las pérdidas en volumen de cultivo debido a la evapotranspiración fueron contrarrestadas por adición de agua desionizada hasta el nivel original día por medio. Como control negativo se tomó una muestra de efluente (antes de comenzar con el ensayo) y se analizaron valores de conductividad, pH, nitrito, nitrato, fósforo total y fósforo soluble, para poder ser comparados con los valores del efluente al terminar el ensayo.



Figura 1. *Eichhornia crassipes* en presencia de efluente secundario al principio del ensayo.

Reactivos

Para los ensayos realizados por Soxhlet y EOX se utilizaron los siguientes reactivos: alcohol isopropílico: Mallinckrodt

Químicos Lote H08B01 (ACS) 99,5%, ciclohexano: Mallinckrodt Químicos Lote 4878KVVB 100% puro y acetona: Merck KGaA 99,8% puro.

Tras el período de exposición se cosecharon las plantas. Los tallos, hojas y raíces se separaron y trituraron utilizando un mortero y nitrógeno líquido. Su fracción lipófila se extrajo con 40 mL de una mezcla de ciclohexano:acetona (1:1) con un extractor líquido-líquido semi-automático (Soxtec System HT 1043, Tecator, Suecia).

Se pesaron las grasas obtenidas en cada porción de planta, se reconstituyeron con la mezcla de disolventes antes utilizada y se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno. Los residuos evaporados se reconstituyeron en 0,5 mL de ciclohexano para finalmente medir EOX por el método de combustión/coulombimetría, utilizando un equipo Mitsubishi- COSA, modelo TOX-100.

También se determinaron los halógenos totales (TX). Las porciones trituradas de raíz, tallo y hoja se pesaron y quemaron directamente en el bote del equipo TOX-100 para la determinación de los halógenos totales (TX) por combustión/coulombimetría.

El fósforo total y los fosfatos fueron analizados mediante el método de inyección en flujo con equipo Lachat 8500, de acuerdo a QuikChem Method 31-115-01-3-D (Lachat Instruments, 2009) y los nitritos y nitratos por el método QuikChem Method 10-107-04-1-A (Lachat Instruments, 2000). La conductividad se basó en la norma ISO 7888 (International Organization for Standardization, 1985). El pH se midió con electrodo, basándose en la norma APHA 4500 H-B (American Public Health Association, et al., 2001) y el DBO₅ se determinó por el método respirométrico APHA 5210 D (American Public Health Association, et al., 2001).

Resultados

Durante el desarrollo del experimento, el color de las hojas se tornó verde brillante, con un desarrollo importante de la

planta. Después de una semana, los tallos expuestos mostraron signos de nodulación en los pecíolos, característica típica de la especie estudiada, mientras que en otras plantas no se observó ensanchamiento del pecíolo. El peso promedio inicial de la planta fue de 497 ± 311 g y la masa vegetal final fue de 277 ± 256 g, peso húmedo.

Se observaron anfípodos, posiblemente del género *Hyalella*, viviendo en las raíces.

En este marco experimental, la absorción de nutrientes por parte de las plantas se evidencia por la disminución de fósforo y nitrato en los efluentes (Tabla 1).

Se utilizó la medida de color como una herramienta de monitoreo durante la prueba para analizar el efluente. El comportamiento de la variación del color fue similar en ambos duplicados (Gráfico 1).

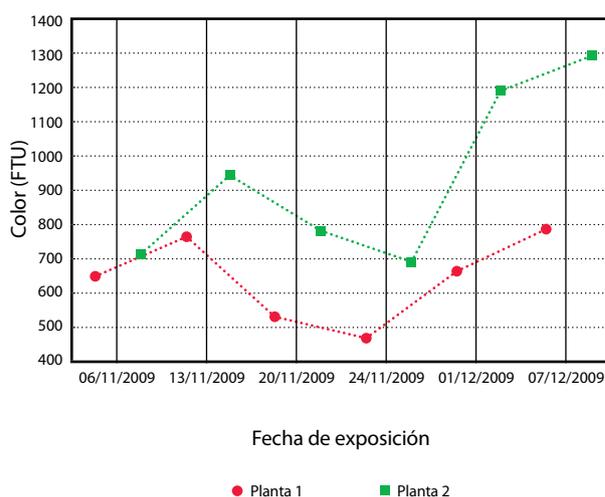


Gráfico 1. Análisis de color del efluente secundario en el transcurso de la exposición de *E. crassipes*.

Parámetros	Valor previo a la exposición	Valor posterior a la exposición	Variación (%)
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	1326	5300	-300
pH	7,18	7,80	-8,6
Nitrito (como N) (mg/L)	0,31	0,072	76,8
Nitrato (como N) (mg/L)	1,34	0,016	98,8
Fósforo total (como P) (mg/L)	1,47	0,564	61,6
Fósforo soluble (como P) (mg/L)	1,47	0,095	93,5

Tabla 1. Parámetros analizados en el efluente secundario, previo y luego de la exposición a la planta.

<i>E. crassipes</i>	Compuestos orgánicos halogenados extraíbles ($\mu\text{g}/\text{g}$) (como Cl)			Compuestos halogenados totales ($\mu\text{g}/\text{g}$) (como Cl)		
	Raíces	Tallo	Hojas	Raíces	Tallo	Hojas
No expuesto	0,64	3,6	2,1	2,2	6,7	5,9
Expuesto	1,3	5,2	9,4	2,1	5,9	16,1

Tabla 2. Análisis de halógenos orgánicos extraíbles y halógenos totales en plantas de *E. crassipes* que fueron expuestas y no expuestas al efluente secundario.

Eliminación de compuestos orgánicos clorados

La ruta de distribución de compuestos orgánicos clorados existentes en el efluente de la fábrica de pulpa de celulosa se evidenció por un aumento en la concentración desde la raíz hacia las hojas (Tabla 2 y Gráfico 2).

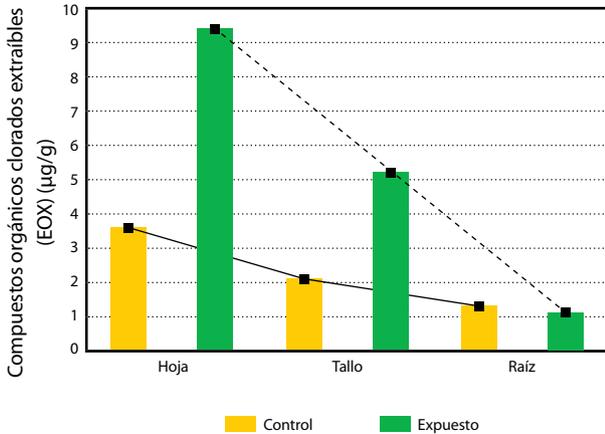


Gráfico 2. Distribución de halógenos orgánicos extraíbles (EOX) en diferentes tejidos (hojas, tallo y raíces) de plantas expuestas y no expuestas al efluente secundario.

Discusión

En este trabajo se demuestra que *E. crassipes* es capaz de absorber compuestos orgánicos halogenados y reducir la concentración de nutrientes de los efluentes analizados. La eficiencia de remoción de nutrientes en nuestra experiencia (65% y 78,0%, respectivamente), en especial para nitrato, fue similar a la reportada por Maine et al. (2007), quienes obtuvieron un porcentaje del 98,8% para el nitrato y un 76,8% para el nitrito. De acuerdo a Gao et al. (2014) la remoción de nitrógeno puede deberse no solamente a los procesos de asimilación por parte de la planta, sino a transformación a través de nitrificación y desnitrificación acopladas que producirían nitrógeno gas.

Algunos de los factores que podrían haber afectado las concentraciones acuosas de las sustancias orgánicas existentes en el efluente ensayado incluyen la hidrólisis, el factor de partición agua/carbón orgánico, el ingreso en la planta y su metabolismo (Chuluun, et al., 2009). Para compuestos clorados de muy baja biodegradabilidad, como los esperados en el efluente de pulpa de celulosa, estos autores encontraron que la acumulación en otra especie de planta flotante (*Acorus gramineus*) se produciría principalmente en la raíz, mientras que en el presente trabajo se encontró la mayor proporción de compuestos clorados en las hojas.

Una de las posibles razones que explican la inhibición del crecimiento después de 20 días de exposición es la alta salinidad, como sugieren Sooknah y Wilkie (2004). Además, según estos autores, la reducción de nutrientes sigue una cinética de primer orden en cultivos de 31 días, discontinuos o por lotes, afectando la producción de biomasa.

En posteriores experiencias, aunque se conoce la poca degradabilidad de los compuestos a remover, se debería

incluir un control sin exponer las plantas para evaluar la degradación de estos compuestos, escalar este experimento a piloto, pero con ingreso de los efluentes en forma continua (Govindaswamy, et al., 2011), y, finalmente, utilizar esta tecnología en humedales construidos (Olukanni y Kokumo, 2013) como tratamiento terciario de los efluentes considerados. Luego de haber realizado ese tratamiento depurador, la planta puede usarse como sustrato para producir bioetanol o biogás para producción de energía a partir de biomasa o para generar biofertilizantes por compostaje (Patel, 2012), entre otras aplicaciones. Deberá estudiarse el ciclo de vida total, incluyendo la posibilidad de generación de dioxinas de la quema de las plantas que contienen estos contaminantes a la hora de decidir la disposición final.

Conclusiones

En base a los resultados de eliminación de compuestos organoclorados y la alta remoción de nutrientes (en el orden de 90% en esta experiencia), se sugiere que este método sería ventajoso como tratamiento terciario de efluentes de pulpa de celulosa. Las rutas de distribución de organoclorados dentro de la planta demostraron su acumulación principalmente en las hojas. El presente trabajo es el punto de partida para continuar con una línea de investigación de aplicaciones tecnológicas de bajo costo y ambientalmente sustentables para disminuir el aporte de nutrientes hacia cursos de agua desde fuentes puntuales industriales y como medida de mitigación de los riesgos de contaminación debidos a sustancias organocloradas persistentes.

Reconocimientos

Se agradece al LATU y a la Universidad de Cranfield, ya que este trabajo fue realizado en el marco de la tesis doctoral de Diana Míguez.

Referencias

- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, 2001. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20a ed. Washington: APHA. Standard Method 5210 D.
- American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, 2001. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20a ed. Washington: APHA. Standard Method 4500 H⁺-B.
- Buta, E., Paulette, L., Mihăiescu, T., Buta, M., Cantor, M., 2011. The influence of heavy metals on growth and development of *Eichhornia crassipes* species, cultivated in contaminated water. En: *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), pp.135-141.
- Chuluun, B., Iamchaturapatr, J. y Seong Rhee, J., 2009. Phytoremediation of organophosphorus and organochlorine pesticides by *Acorus gramineus*. En: *Environmental Engineering Research*, 14(4), pp.226-236.
- Gao, Y., Yi, N., Wang, Y., Ma, T., Zhou, Q., Zhang, Z., Yan, S., 2014. Effect of *Eichhornia crassipes* on production of

- N₂ by denitrification in eutrophic water. En: *Ecological Engineering*, 68, pp.14-24.
- Govindaswamy, S., Schupp, D.A. y Rock, S.A., 2011. Batch and continuous removal of arsenic using hyacinth roots. En: *International Journal of Phytoremediation*, 13(6), pp.513-527.
- International Organization for Standardization, 1985. ISO 7888. *Water quality. Determination of electrical conductivity*. Ginebra: ISO.
- Lachat Instruments, 2000. *Determination of nitrate/nitrite in surface and wastewaters by flow injection Analysis*. Milwaukee: Lachat Instruments. Method 10-107-04-1-A.
- Lachat Instruments, 2009. *Determination of total phosphorus in brackish and fresh waters by flow Injection analysis*. Milwaukee: Lachat Instruments. Method 31-115-01-3-D.
- Lagos, C., Urrutia, R., Decap, J., Martínez, M. y Vidal, G., 2009. *Eichhornia crassipes* used as tertiary color removal treatment for Kraft Mill effluent. En: *Desalination*, 246, pp.45-54.
- Maine, M.A., Suñe, N., Hadad, H., Sanchez, G. y Bonetto, C., 2007. Removal efficiency of a constructed wetland for wastewater treatment according to vegetation dominance. En: *Chemosphere*, 68, pp.1105-1113.
- Meerhoff, M., Rodríguez-Gallego, L. y Mazzeo, N., 2002. Potencialidades y limitaciones del uso de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms en la restauración de lagos hipereutróficos subtropicales. En: Fernández, A. y Chalar, G., eds. *Agua en Iberoamérica: de la limnología a la gestión en Sudamérica*. Buenos Aires: CYTED XVII. pp.61-74.
- Mishra, S., Mohanty, M., Pradhan, C., Patra, H.K., Das, R. y Sahoo, S., 2013. Physico-chemical assessment of paper mill effluent and its heavy metal remediation using aquatic macrophytes: A case study at JK Paper Mill, Rayagada, India. En: *Environmental Monitoring and Assessment*, 185, pp.4347-4359.
- Olukanni, D.O. y Kokumo, K.O., 2013. Efficiency assessment of a constructed wetland using *Eichhornia crassipes* for wastewater treatment. En: *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 2(12), pp.450-454.
- Patel, S., 2012. Threats, management and envisaged utilizations of aquatic weed *Eichhornia crassipes*: an overview. En: *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11(3), pp.249-259.
- Pereira, F., De Castro, E.M., De Olivera, C., Pires, M.F., Pereira, M.P., Ramos, S.J. y Faquin V., 2014. Lead tolerance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. – Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. En: *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86(3), pp.1423-1433.
- Poi de Neiff, A., 2003. Macroinvertebrates living on *Eichhornia azurea* Kunth in the Paraguay River. En: *Acta Limnológica Brasileira*, 15(1), pp.55-63.
- Ruiz Téllez, T., de Rodrigo López, E. M., Lorenzo Granado, G., Albano Pérez, E., Morán López, R. y Sánchez Guzmán, J.M., 2008. The water hyacinth, *Eichhornia crassipes*: an invasive plant in the Guadiana River Basin (Spain). En: *Aquatic Invasions*, 3(1), pp.42-53.
- Sooknah, R.D. y Wilkie, A.C., 2004. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. En: *Ecological Engineering*, 22, pp.27-42.
- Tripathi, S. y Tripathi, B.D., 2011. Efficiency of combined process of ozone and bio-filtration in the treatment of secondary effluent. En: *Bioresource Technology*, 102(13), pp.6850-6.
- Yedla, S., Mitra, A., Bandyopadhyay, M., 2002. Purification of pulp and paper mill effluent using *Eichhornia crassipes*. En: *Environmental Technology*, 23(4), pp.453-65.

Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo

Influence of transglutaminase on the yield of Uruguayan Dambo cheese

Escobar, Daniela ⁽¹⁾, Arcia, Patricia ⁽¹⁾, Curutchet, Ana ⁽²⁾, Pelaggio, Ronny ⁽¹⁾, Urrestarazu, Pedro ⁽¹⁾, Márquez, Rosa ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Gerencia de I+D+i, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay – ⁽²⁾ Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay.

Contacto: rmarquez@latu.org.uy

RECIBIDO: 30/05/2014 - APROBADO: 07/11/2014

Resumen

El queso Dambo uruguayo es un queso de mediana humedad de origen danés con formulación modificada. Esta investigación estudió el uso de la enzima transglutaminasa en la producción de queso Dambo tipo barra para aumentar el rendimiento del proceso.

Se fabricaron quesos aplicando un diseño experimental completamente al azar con parcelas divididas medidas en el tiempo, considerando dos factores (concentración de la enzima y momento de agregado) en tres niveles, por triplicado, tomando como referencia el queso sin enzima.

Los quesos fueron analizados a lo largo de cuatro meses en peso, pH, contenido de proteínas, humedad y materia grasa. Se calculó el rendimiento relativo al queso referencia, la recuperación de extracto seco y el contenido en proteínas y materia grasa en el queso respecto a la leche. Se analizó el perfil de textura y se determinaron las propiedades sensoriales con un panel de jueces entrenados.

Los resultados mostraron que la única condición con diferencia significativa al 5% en el rendimiento relativo fue el momento de agregado de la enzima, resultando como momento óptimo la incorporación de la misma junto con el cuajo, independientemente de la dosis utilizada. El rendimiento logrado fue un 6% superior al queso referencia.

Palabras clave: Queso Dambo tipo barra, enzima, rendimiento, textura, análisis sensorial.

Abstract

The Uruguayan Dambo cheese is a mid-moisture Danish cheese made with a modified formula. This study examined the use of transglutaminase to increase the process yield in the production of Dambo cheese.

Cheeses were made using an experimental design with completely randomized split plot measures over time, considering two factors (enzyme concentration and moment of addition) in three levels, by triplicate, taking as reference the cheese without enzyme.

Cheeses were analyzed along four months considering weight, pH, protein, moisture and fat matter. The yield relative to the reference cheese was calculated, as also the dry matter recovery and protein and fat content in the cheese compared to milk. Texture profile analysis was performed and sensory properties were evaluated using a panel of trained judges.

The results showed that the only condition with a significant difference of 5% in relative yield was the moment of the enzyme's addition showing that the optimal time corresponds to the addition with rennet regardless the dose used. The yield achieved was 6% higher than the reference cheese.

Keywords: Dambo cheese bar type, enzyme, yield, texture, sensory analysis.

Introducción

El queso Dambo uruguayo es un queso de mediana humedad o pasta semidura —de entre 36,0 y 45,9% de humedad según la reglamentación MERCOSUR (1994)—, de origen danés, cuya fórmula ha sido modificada en Uruguay. Se elabora a partir de leche de vaca utilizando cultivos lácticos específicos

y de coagulación enzimática, con un tiempo de maduración aproximado de 4 semanas.

El queso Dambo es uno de los más exportados por Uruguay. En 2011, el 85% de los quesos de pasta semidura fabricados en Uruguay fueron exportados y su producción aumentó un 6% en 2011 y un 83% en los últimos cinco años (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2013).

Más del 50% de los quesos de pasta semidura que se producen corresponden a quesos tipo barra. El queso Dambo tipo barra es una formulación más reciente que el queso Dambo tradicional que se fabrica con algunas diferencias tecnológicas que permiten producir un queso de mayor dureza y más feteable, tal como los consumidores lo demandan, con mayor estabilidad en el tiempo. La gran producción de este tipo de quesos en el país fundamenta el interés en aumentar el rendimiento en la producción de queso Dambo tipo barra.

La transglutaminasa (TG) es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, que se encuentra en tejidos animales, plantas y microorganismos. Se caracteriza por entrecruzar proteínas a través de enlaces covalentes, específicamente entre los aminoácidos glutamina y lisina. Este entrecruzamiento tiene efectos sobre las propiedades de las proteínas, la capacidad de gelificación, la estabilidad térmica, la capacidad de retención de agua, etcétera. La TG es utilizada ampliamente en productos de la pesca, surimi, productos cárnicos, pastas secas, productos lácteos y panificados, entre otros. Tiene un gran potencial para mejorar la firmeza, elasticidad, viscosidad, estabilidad al calor y capacidad de retención de agua en alimentos mediante la reacción enzimática (Kuraishi, et al., 2001).

Durante el proceso de transformación de la leche en queso, las caseínas forman una red proteica conocida como coágulo o gel. Son varios los factores que influyen en la formación de esta cuajada, entre ellos pH, concentración de calcio, concentración de caseína, tratamiento térmico utilizado y proteínas presentes. El uso de TG afecta tanto la primera como la segunda etapa de formación del gel (Bönisch, et al., 2008). La TG forma enlaces entre las α - β - y κ -caseínas (Aaltonen, et al., 2014) y además produce entrecruzamientos con la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina en la cuajada (Cozzolino, et al., 2003; Özrenk, 2006). Estos entrecruzamientos podrían favorecer un aumento del rendimiento quesero, afectando positivamente la rentabilidad del producto.

Varios autores han estudiado el impacto de la TG en las proteínas de la leche y en las propiedades físicas y de textura de los geles resultantes de la acidificación (Bönisch, et al., 2007; Jaros, et al., 2007, 2010). Özer et al. (2012) demostraron que la acción específica de la TG en geles de cuajo se ve afectada por los parámetros del procesamiento, como la temperatura de coagulación, la concentración de TG y el pH de la leche inicial, por lo cual es necesario optimizar estos parámetros antes de realizar la incorporación de TG en la fabricación de quesos.

Otro ingrediente utilizado en la fabricación de quesos es la enzima quimosina, que actúa sobre la κ -caseína produciendo caseinomacropéptidos (CMP). Es importante tanto el momento de agregado de la quimosina como la temperatura, para que la acción de la TG no enlentezca la liberación de CMP durante la fase primaria de la coagulación (Özer, et al., 2013).

En base al potencial de la TG se diseñó este estudio con el objetivo de conocer si el uso de la enzima como coadyuvante tecnológico es capaz de aumentar el rendimiento en la producción de uno de los quesos más fabricados en Uruguay, el queso Dambo tipo barra, estudiando las condiciones óptimas del proceso y cómo afecta su uso en las características típicas de dicho queso.

Materiales y Métodos

El queso Dambo fue elaborado a partir de leche cruda de vaca. La leche se analizó a su ingreso a la planta piloto determinándose: pH (pHmetroMettler Toledo SevenMulti, electrodo com-

binado de penetración InLab), acidez titulable (grados Dornic, ISO/TS 22113/IDF RM 204, 2012), porcentaje de proteínas (ISO 8968/IDF 20, 2001), porcentaje de materia grasa (ISO 1211/IDF1, 2010), porcentaje de extracto seco (ISO 6731/IDF 21, 2010) y densidad por picnometría (AOAC 925.22, 2005).

Para evitar los efectos de las diferencias de cada lote de leche utilizado, con cada lote de leche se fabricaron cuatro lotes de queso: un lote de queso referencia (sin TG) y tres lotes de queso con TG (ACTIVA® YG, Ajinomoto, Francia), según el diseño aleatorio del experimento. De esta manera se fabricaron un total de 27 lotes de queso con tres concentraciones diferentes de TG agregada en tres momentos distintos del proceso.

Cada lote de queso fue elaborado en tina quesera doble O con doble camisa y sistema de agitación y corte mecánico controlado, a partir de 50 L de leche previamente pasteurizados a 72 °C durante 15 segundos. Cuando la leche alcanzó los 33 °C se incorporaron 10 mL de cloruro de calcio Promilk® al 33% y fermentos mesófilos y termófilos homofermentativos de acidificación rápida Choozit® RA21 de Danisco, Dupont, en una dosis de 3,125 DCU (Direct Culture Unit) por lote. A los 30 minutos se agregaron 3 mL de coagulante de quimosina pura Maxiren® dejándolo actuar durante 25 minutos en las mismas condiciones. Luego se cortó la cuajada con cuchilla mecánica hasta obtener un tamaño de grano de maíz y se cocinó hasta llegar a 42 °C. Se drenó la masa hacia un cajón de pre-prensa con red donde se hizo un pre-prensado manual.

Se formaron los quesos en moldes de polipropileno de 1 Kg de capacidad con desuerador y tapa y se prensaron verticalmente durante 3 horas, con rotaciones intermedias. Cuando los quesos alcanzaron un pH de 5,4 se refrigeraron a 4 ± 2 °C. A las 16 horas se sumergieron en salmuera a 19 grados Baumé durante 5 horas con volteo a medio tiempo. Se realizó un oreo por 24 horas a 4 ± 2 °C y se envasaron a vacío en bolsas Maraflex ARG2. Los quesos fueron conservados en cámara de maduración a 8 ± 2 °C hasta el momento de su análisis y fueron analizados en sus parámetros fisicoquímicos a tiempo 0 (momento de envasado), 1, 2, 3 y 4 meses de envasados. El perfil de textura y el análisis sensorial se realizaron a los 1, 2, 3 y 4 meses de envasados.

Diseño experimental

Se elaboró un diseño experimental completamente al azar con parcelas divididas medidas en el tiempo, considerando dos factores (concentración de la enzima y momento de agregado) en tres niveles. Los experimentos se realizaron por triplicado, tomando como referencia el queso sin enzima.

Las concentraciones de TG utilizadas fueron 0,1, 0,5 y 1,0 unidades TG / g de proteína en leche, donde una unidad de la enzima es la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de ácido l-glutámico γ monohidroxamato en un minuto a pH 6 y 37 °C.

Los momentos de incorporación de TG en el proceso fueron: «con el cuajo», manteniendo las restantes condiciones de fabricación iguales al queso referencia, «con el cuajo en frío» a 15 °C, habiéndose realizado todo el proceso previo también a 15 °C, y «al corte», incorporando la enzima luego de alcanzado el tamaño grano de maíz.

Análisis fisicoquímico de los quesos

Peso: Se utilizó balanza de precisión Shimadzu BX22KH.

pH: Se midió con pHmetro Mettler Toledo SevenMulti y electrodo combinado de penetración InLab.

Humedad, proteínas, materia grasa: Se analizaron con FoodScan® Labtype 78800 Foss, Dinamarca, previamente calibrado según las normas ISO 5534/IDF 004, 2004, ISO 8968/IDF 20, 2001 e ISO 1735/IDF 005, 2004, respectivamente.

Perfil de textura instrumental

Se realizó el análisis de perfil de textura (TPA) con texturómetro TA-XT-Plus Texture Analyzer (Stable Micro Systems Ltd., UK). Se determinaron dureza, elasticidad y cohesividad.

Perfil sensorial

Se analizaron 15 atributos con un panel de 10 jueces entrenados (ISO 22935-1, 2009; Lavanchy, et al., 1993; Montero, et al., 2005): intensidad de olor, firmeza táctil, firmeza en boca, elasticidad, friabilidad, solubilidad, impresión de humedad, adhesividad, intensidad de sabor, dulce, amargo, salado, ácido, picante y retrogusto. Los jueces evaluaron la intensidad de cada atributo usando una escala no estructurada de 0 a 7. La evaluación se realizó en una sala normalizada según ISO 8589, luego de 1, 2, 3 y 4 meses de maduración de los quesos.

Análisis de datos

Para estudiar la variabilidad en todos los parámetros analizados en cada tiempo del estudio, se realizó un ANOVA de dos factores con interacción (concentración de enzima y momento de agregado).

Para estudiar el efecto de la concentración de enzima y el tiempo de maduración, se realizó un ANOVA de dos factores con interacción (concentración de enzima y tiempo de maduración) por diseño de parcelas divididas.

Para determinar la diferencia significativa entre muestras se utilizó el test de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Los análisis se realizaron usando XLSTAT Version 2011 (Addinsoft 1995-2010, France) e Info Stat Statistical Software versión 2011.

Cálculos de rendimiento y aprovechamiento de los sólidos de queso

$$\text{Rendimiento Relativo (\%)} = \frac{\text{peso del queso con TG}}{\text{peso queso referencia}} \times 100$$

Las recuperaciones de los sólidos del queso se determinaron según:

$$\text{Recuperación de Extracto Seco (\%)} = \frac{\text{peso queso} \times \text{extracto seco queso}}{\text{peso leche} \times \text{extracto seco leche}} \times 100$$

$$\text{Recuperación de Proteínas (\%)} = \frac{\text{peso queso} \times \text{proteínas en queso}}{\text{peso leche} \times \text{proteínas leche}} \times 100$$

$$\text{Recuperación de Materia Grasa (\%)} = \frac{\text{peso queso} \times \text{materia grasa queso}}{\text{peso leche} \times \text{materia grasa leche}} \times 100$$

Resultados

Rendimiento y parámetros fisicoquímicos de quesos

En el Gráfico 1 se presentan los perfiles del rendimiento relativo al queso de referencia (100%) obtenidos en la fabricación de los quesos en cada una de las condiciones del estudio, según el momento de agregado de TG y su concentración.

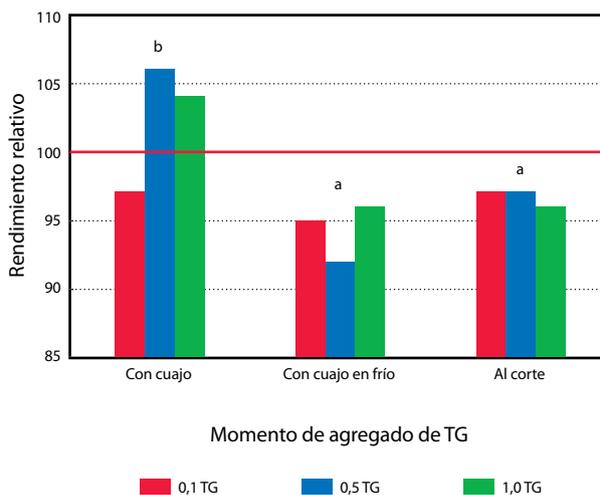


Gráfico 1. Rendimiento de la producción de quesos fabricados en las diferentes condiciones del estudio, relativo al queso referencia (100%). Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p > 0,05$).

Del estudio del momento de agregado de la enzima (con el cuajo, con cuajo en frío y al corte) se observa que la única condición que mostró una diferencia significativa ($p=0,005$) en el rendimiento relativo fue el momento de agregado de la enzima, no importando la dosis de TG utilizada, ni encontrándose interacción entre los factores estudiados. El agregado de TG con el cuajo fue el que mostró el mayor rendimiento relativo del proceso.

No se encontraron diferencias significativas en la variación del peso de los quesos a lo largo del estudio.

Los aumentos de rendimiento encontrados fueron de un 6% y 4% respecto al queso referencia cuando la TG se incorporó junto con el cuajo en una concentración de 0,5 y 1,0 U TG / g de proteína en la leche, respectivamente.

La recuperación relativa del extracto seco para los quesos a los que la TG se incorporó junto con el cuajo se muestra en el Gráfico 2. Se encontró diferencia significativa ($p=0,0009$) en las concentraciones de TG utilizadas; los quesos fabricados con 0,5 y 1,0 U TG / g proteína fueron los que presentaron mayor recuperación relativa de extracto seco y no se encontraron diferencias a lo largo del tiempo.

En cuanto a la recuperación relativa de proteínas, no se hallaron diferencias respecto al momento de incorporación de la enzima a lo largo de todo el estudio. Al analizar la condición de agregado de la enzima con cuajo a lo largo del tiempo, se encontró que existe interacción entre el momento de agregado de la enzima y su concentración ($p=0,0210$). En la Tabla 1 se

muestran las recuperaciones relativas de los quesos respecto al queso referencia. Se puede afirmar que a los 3 y 4 meses del estudio la concentración 1,0 U TG / g proteína da mayor recuperación relativa de proteínas que la concentración 0,1 U TG / g proteína.

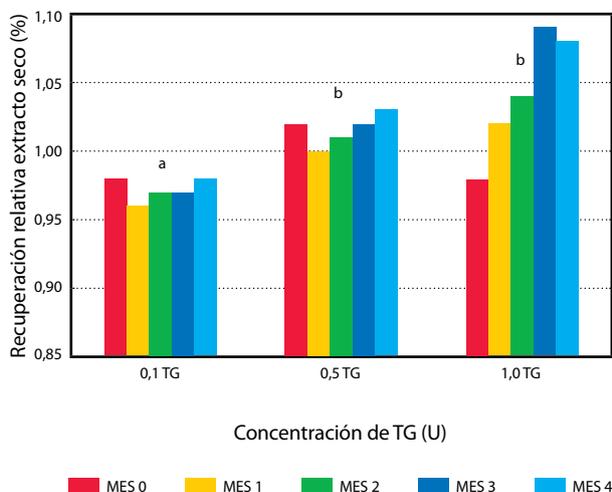


Gráfico 2. Variación de la recuperación relativa del extracto seco a lo largo del tiempo del estudio para los quesos con TG incorporada con el cuajo. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p > 0,05$).

U TG / g proteína agregadas	Mes 0	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4
0,1 TG	0,98 a	0,97 a	0,98 a	0,98 a	0,97 a
0,5 TG	0,99 ab	0,96 a	0,99 ab	0,98 a	0,99 abc
1,0 TG	0,96 a	1,02 abc	1,03 abc	1,08 c	1,08 c

Tabla 1. Recuperación relativa de proteínas a lo largo del tiempo en los quesos con TG incorporada con cuajo en sus distintas concentraciones. Letras diferentes indican que los valores son significativamente diferentes al 5% de confianza.

El estudio de la recuperación relativa de materia grasa mostró diferencias significativas ($p = 0,003$) según el momento de agregado de la enzima, pero no se vio afectada por la concentración. Los momentos de agregado de la enzima al corte y con cuajo dieron mayores recuperaciones relativas de materia grasa que el momento en frío.

En el Gráfico 3 es posible apreciar la variación de la recuperación de materia grasa en los quesos fabricados con la incorporación de TG con cuajo. No se observaron diferencias significativas ($p = 0,0810$) en esta recuperación al 5% de confianza. Al 10% de confianza se puede afirmar que efectivamente existe diferencia entre la concentración 0,1 y las concentraciones 0,5 y 1,0U de TG/ g proteína.

En cuanto a la humedad relativa solo se presentó una diferencia significativa según el momento de agregado de enzima a tiempo 0 ($p = 0,008$). En el tiempo 0 la humedad fue mayor al agregar la enzima junto con cuajo que al agregarla

al corte. Se observó que al agregar la TG con cuajo las dosis utilizadas no presentan diferencias significativas al 5% de confianza, aunque al 10% de significancia sí hay diferencias, siendo mayor la humedad con la dosis 0,5 de TG, tal como lo muestra el Gráfico 4.

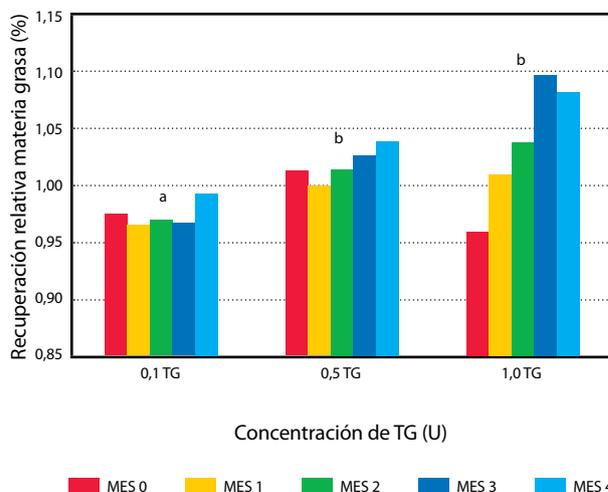


Gráfico 3. Variación de la recuperación relativa de materia grasa a lo largo del tiempo para quesos fabricados con TG incorporada con el cuajo. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p > 0,1$).

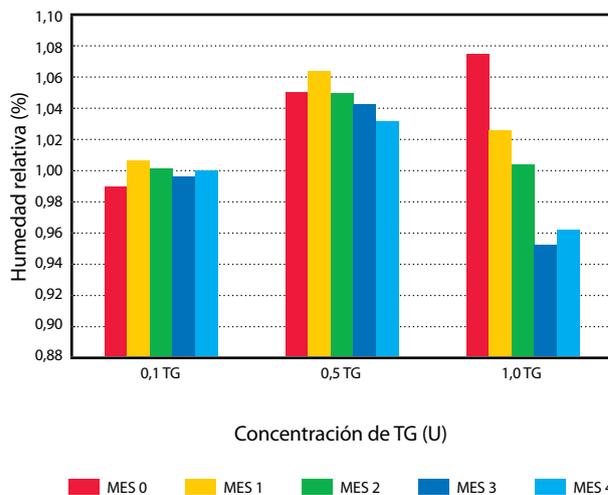


Gráfico 4. Variación de la humedad relativa de los quesos fabricados con TG incorporada con cuajo a lo largo del tiempo.

El Gráfico 5 muestra la variación del pH de los quesos fabricados con TG incorporada con cuajo. Se encontraron diferencias significativas según la concentración de enzima utilizada ($p < 0,001$), obteniéndose valores de pH menores con el uso de 0,5 y 1,0 U TG/ g proteína.

Perfil de textura instrumental

Respecto al análisis del perfil de textura, se analizaron los resultados de dureza, elasticidad y cohesividad.

En el Gráfico 6 se presentan los resultados de los análisis de dureza de los quesos con TG incorporada con cuajo a lo

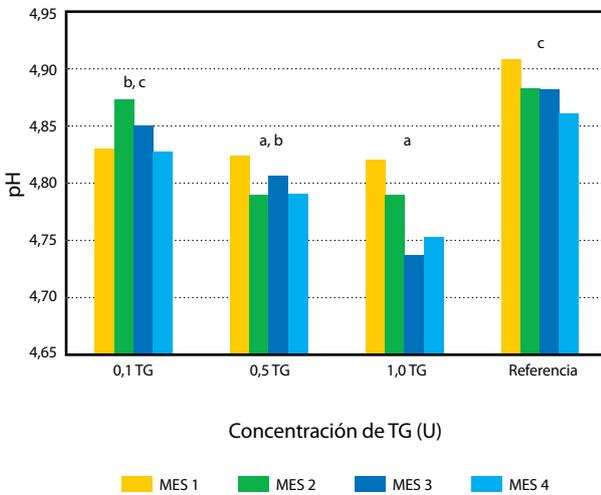


Gráfico 5. Variación del pH de los quesos fabricados con TG incorporada con cuajo a lo largo del tiempo del estudio. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p>0,05$)

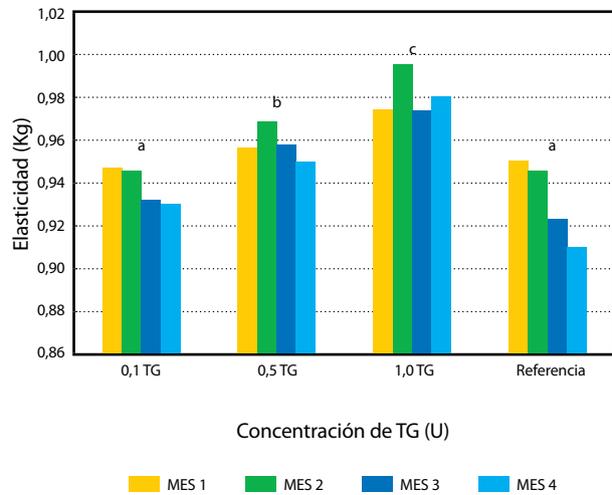


Gráfico 7. Elasticidad de los quesos fabricados incorporando la TG con cuajo y del queso referencia. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p>0,05$).

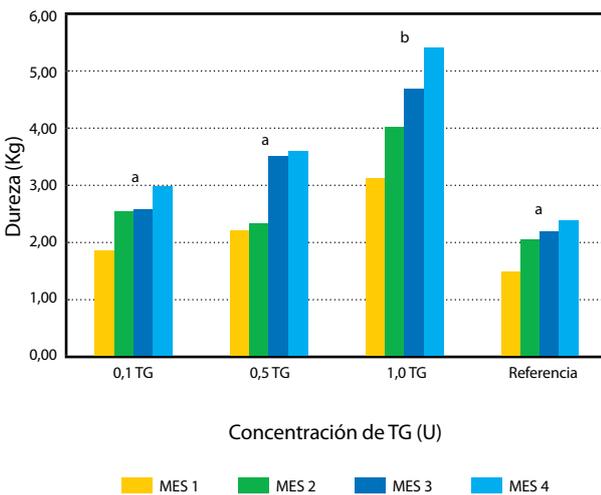


Gráfico 6. Dureza de los quesos fabricados incorporando la TG con cuajo y del queso referencia. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p>0,05$)

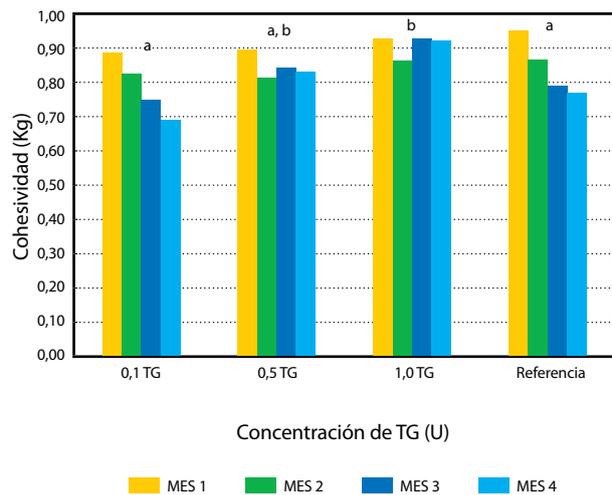


Gráfico 8. Cohesividad de los quesos fabricados incorporando la TG con cuajo y del queso referencia. Letras distintas indican medias con diferencia significativa ($p>0,05$)

largo del tiempo y de los quesos referencia correspondientes. Se puede observar que la concentración de TG afectó la dureza de los quesos fabricados a lo largo de todo el estudio, produciéndose los quesos más duros con 1,0 U de TG / g de proteína.

La elasticidad de los quesos (Gráfico 7) fue afectada significativamente tanto por la concentración de TG como por el momento de su incorporación. Los quesos con concentraciones de 0,5 y 1,0 U TG / g proteína son siempre más elásticos que los quesos con 0,1 U TG / g proteína.

Respecto a la cohesividad estudiada en la condición con cuajo a lo largo del tiempo, se observó que es mayor en los

quesos fabricados con 1,0 U TG / g proteína que en el queso referencia (Gráfico 8).

Perfil sensorial

En el Gráfico 9 se presentan los resultados de la evaluación sensorial realizada por los jueces a los 30 días de maduración de los quesos elaborados con la TG incorporada con cuajo. Estos parámetros no experimentaron variaciones significativas a los 2, 3 y 4 meses del estudio, más allá de las propias del proceso de maduración del queso.

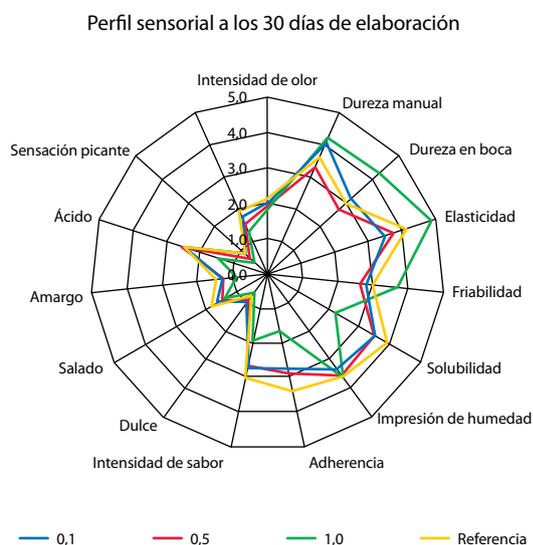


Gráfico 9. Resultados de los análisis sensoriales de los diferentes atributos estudiados para la condición con cuajo a los 30 días de maduración.

Desde el punto de vista sensorial se puede afirmar que a los 30 días de elaborados los quesos con 1,0 U TG / g proteína presentaron mayor dureza en boca y menor solubilidad ($p < 0,05$) que los quesos fabricados con la menor concentración de enzima y que el queso de referencia. En cuanto a los cambios de los quesos con el tiempo a los 2, 3 y 4 meses del estudio no se hallaron más variaciones que las atribuibles al proceso de maduración de un queso.

Discusión

Rendimiento y parámetros fisicoquímicos de quesos

Hasta ahora se han realizado pocos estudios sobre la incorporación de TG en la fabricación de quesos. Özer et al. (2013) encontraron que la modificación de la matriz del queso debido a la reticulación de proteínas por TG es una herramienta eficaz para obtener un aumento de rendimiento en queso blanco aunque con características de textura modificadas. Se ha observado que el aumento en el rendimiento real de los quesos no se debe únicamente a la retención de más suero en el queso. Sayadía et al. (2013), en su estudio del tratamiento enzimático de la leche con TG, observaron un aumento en la relación humedad / proteína en el queso blanco iraní bajo en grasa.

Bönisch et al. (2008) estudiaron el efecto de la TG en la coagulación de la leche utilizando TG con adición de glutatión y constataron que al incorporar la enzima en la leche pre-incubada a distintos tiempos antes que el cuajo, la condición de agregado de TG junto con el cuajo fue la que presentó menor tiempo de coagulación, afectando el rendimiento del queso. La pre-incubación de la TG podría causar inhibición de la hidrólisis de la κ -caseína en la fase primaria de la coagulación.

A su vez, Özer et al. (2013) investigaron la adición de la TG a dos temperaturas: 30 y 34 °C, concluyendo que el uso de mayor temperatura provocó un mayor rendimiento en

el queso blanco, aludiendo a que la temperatura presenta influencia en la cinética de la reorganización de las proteínas. En el presente estudio la utilización de 15 °C (con cuajo en frío) presentó rendimientos menores al queso de referencia.

En base a los resultados de los estudios mencionados anteriormente, en este trabajo se constató que los mejores rendimientos en la producción de queso se obtuvieron con el agregado de la TG junto con el cuajo.

La mayor recuperación de extracto seco, encontrada al utilizar concentraciones de TG de 0,5 y 1,0 U TG / g proteína en esta investigación, podría deberse a la incorporación de proteína de suero en el queso, según lo demostrado por Özer et al. (2013), en el caso de queso blanco, y por Sayadía et al. (2013), en queso blanco iraní bajo en grasa.

En base al Gráfico 1 y los resultados de contenido de humedad y materia grasa, podría afirmarse que la mayor humedad y recuperación relativa de materia grasa cuando se agrega TG con cuajo inducen el mayor rendimiento debido a una mayor retención de agua y materia grasa en la red proteica. Aaltonen et al. (2014) demostraron una mayor incorporación de agua en queso Edam estandarizado con proteínas de suero.

Perfil de textura instrumental

Sayadía et al. (2013) hallaron que la dureza del queso blanco iraní aumenta con la concentración de TG utilizada en su fabricación, tal como se demostró con este estudio para el queso Dambo tipo barra, correlación similar a la hallada por Özer et al. (2013). Estos autores atribuyen a que la función principal de TG en el queso es formar enlaces isopeptídicos, lo que conduce a una red de gel con menores agregados y tamaños de poros, resultando en una red más restringida, por lo que se prevé que la dureza sea debido a una mayor cantidad de puntos de contacto entre las proteínas de la matriz del queso.

En lo referente a la elasticidad de los quesos, Özer et al. (2013) determinaron que los quesos tratados con TG mantienen la elasticidad más estable durante la maduración, comparados con los quesos que no se elaboran con TG. En este estudio esto se dio para los quesos fabricados con la mayor concentración de TG adicionada junto con el cuajo (0,5 y 1,0 U TG / g proteína).

Se constató que los quesos fabricados con 0,5 y 1,0 U TG / g proteína son los que presentaron mayores valores de cohesividad. En el trabajo de Özer et al. (2013) se demostró que la cohesividad no presenta diferencias significativas con el tiempo, sin embargo, se hallaron valores más altos en el queso blanco salado tratado con TG respecto a la referencia. Esto se justifica porque tanto el número como la fuerza de los enlaces de la proteína en los quesos tratados con enzimas son afectados por la TG.

Perfil sensorial

Los quesos fabricados con 1,0 U TG / g proteína incorporada junto con el cuajo mostraron cambios significativos en su textura, ya que presentaron mayor dureza, elasticidad y cohesividad, y también en su sabor, pues tuvieron menor intensidad de sabor, menor sabor ácido y menor sensación picante. Esto último puede deberse a que al tener más enzima los quesos fueron menos solubles, provocando una menor movilidad de los sabores en la lengua, lo que llevó a una detección menor.

Conclusiones

El mayor rendimiento quesero se dio al incorporar la TG junto con cuajo. Con los estudios específicos que se hicieron de esa condición, se constató que al incorporar 0,5 y 1,0 U TG / g de proteína el rendimiento aumentó un 6 y un 4%, respectivamente, en relación al queso Dambo barra tradicional sin enzima. A efectos prácticos, en la fabricación del queso Dambo se entiende que la condición con cuajo es la más fácil de adecuar a las condiciones que poseen las fábricas, porque se puede hacer con la infraestructura de una quesería tradicional y en las mismas condiciones de proceso, sin requerir mayor *know-how*, equipamiento, entrenamiento adicional del personal, y simplemente incorporando un ingrediente más en la fabricación.

Los quesos con TG incorporada con cuajo como coadyuvante en su fabricación mantienen las características propias del queso Dambo tipo barra con una mayor dureza que el queso tradicional, lo cual es un atributo deseable para obtener mejores características de feteabilidad.

Reconocimientos

Los autores agradecen la iniciativa, el apoyo permanente y la colaboración de los representantes de Ajinomoto Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., especialmente a Claudio Pagani, Thiago Granado Franco, Ryusuke Kojima y Andrea Valezin.

También agradecen el apoyo analítico brindado por el Departamento de Productos Agropecuarios de la Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología del LATU, en particular a Jacqueline Cea, Karina Salvo y María Victoria Figueredo.

Referencias

- Aaltonen, T., Huuonen, I. y Myllärinen, P., 2014. Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. En: *International Dairy Journal*. Artículo en impresión, 38(2), pp.179-182.
- AOAC International, 2005. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 925.22.
- Bönisch, M.P., Heidebach, T.C. y Kulozik, U., 2008. Influence of transglutaminase protein cross-linking of the rennet coagulation of casein micelles. En: *Food Hydrocolloids*, 22, pp.288-297.
- Bönisch, M.P., Huss, M., Weigl, K. y Kulozik, U., 2007. Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. En: *International Dairy Journal*, 17, pp.1360-1371.
- Cozzolino, A., Di Pierro, P., Mariniello, L., Sorrentino, A., Masi, P. y Porta, R., 2003. Incorporation of whey proteins into cheese curd by transglutaminase. En: *Biotechnology Applied Biochemistry*, 38, pp.289-295.
- International Organization for Standardization, 2012. ISO/TS 22113 (IDF RM 204): *Milk and milk products. Determination of the titratable acidity of milk fat*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2010. ISO 1211 (IDF 1): *Milk - Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2010. ISO 6731 (IDF 21): *Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2009. ISO 22935-1 (IDF 99-1): *Milk and milk products. Sensory analysis. Part 1: General guidance for the recruitment, selection, training and monitoring of assessors*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2007. ISO 8589: *Sensory analysis: general guidance for the design of test rooms*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2004. ISO 1735 (IDF 005): *Cheese and processed cheese products. Determination of fat content. Gravimetric method (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2004. ISO 5534 (IDF 4): *Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2001. ISO 8968 (IDF 20): *Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldahl method)*. Ginebra: ISO.
- Jaros, D., Jacob, M., Otto, C. y Rohm H., 2010. Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. En: *International Dairy Journal*, 20, pp.321-327.
- Jaros, D., Heidig, C. y Rohm, H., 2007. Enzymatic modification through microbial transglutaminase enhances the viscosity of stirred yogurt. En: *Journal of Texture Studies*, 38, pp.179-198.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. y Susa, Y., 2001. Transglutaminase: its utilization in the food industry. En: *Food Reviews International*, 17(2), pp.221-246.
- Lavanchy, P., Berodier, F., Zannoni, M., Noël, Y., Adamo, C., Squella, J. y Herrero, L., 1993. L' évaluation sensorielle de la texture des fromages à pâte dure ou semidure. Étude interlaboratoires. En: *Lebensm. Wiss. Techno.*, 26, pp.5-68.
- MERCOSUR, 1994. *Resolución GMC/RES 79/94, del 4 de noviembre de 1994. Identidad y calidad de quesos*. Brasilia: Mercosur
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, 2013. *Estadísticas del sector lácteo 2011*. Montevideo: DIEA.
- Montero, H., Aranibar, G., Cañameras, C., y Castañeda, R., 2005. Metodologías para la caracterización sensorial de quesos argentinos. En: *Jornadas de Análisis Sensorial (JASLIS 2005)*, (Buenos Aires 6-8 de septiembre de 2005). Buenos Aires: [s.n.].
- Özer, B., Adnan Hayaloglu, A., Yaman, H., Gürsoy, A. y Sener, L., 2013. Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. En: *International Dairy Journal*, 33(2), pp.129-134.
- Özer, B., Guyot, C. y Kulozik, H., 2012. Simultaneous use of transglutaminase and rennet in milk coagulation: Effect of initial milk pH and renneting temperature. En: *International Dairy Journal*, 24, pp.1-7.
- Özrenk, E., 2006. The use of transglutaminase in dairy products. En: *International Journal of Dairy Technology*, 59, pp.1-7.
- Sayadia, A., Madadloub, A. y Khosrowshahia, A., 2013. Enzymatic cross linking of whey proteins in low fat Iranian white cheese. En: *International Dairy Journal*, 29(2), pp.88-92.

Efecto del perfil de caseínas, recuento de células somáticas y composición de la leche en el rendimiento del queso Dambo

Effect of caseins profile, somatic cells count and milk composition in Dambo cheese yield

Escobar, Daniela ⁽¹⁾, Pelaggio, Ronny ⁽¹⁾, Grille, Lucía ⁽²⁾, Colzada, Enrique ⁽³⁾, Rampoldi, Cecilia ⁽¹⁾, Carro, Silvana ⁽²⁾, Delucchi, Inés ⁽⁴⁾, Viola, Natalia ⁽⁵⁾, Nolla, Juan Pablo ⁽⁶⁾, Reinares, Rosana ⁽¹⁾, Chilibroste, Pablo ⁽³⁾, Piedrabuena, Laura ⁽⁷⁾.
⁽¹⁾ Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación y Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - ⁽²⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay - ⁽³⁾ Departamento de Producción Animal y Pasturas (Bovinos de Leche), Facultad de Agronomía - UdelaR, Montevideo, Uruguay - ⁽⁴⁾ INIA, Programa de Producción de Leche. Laboratorio de Calidad de Leche - ⁽⁵⁾ CLALDY S.A., Uruguay - ⁽⁶⁾ PILI S.A., Uruguay - ⁽⁷⁾ CRI Lechero del Litoral, Uruguay.

Contacto: descobar@latu.org.uy

RECIBIDO: 30/05/2014 – APROBADO: 15/10/2014

Resumen

El rendimiento quesero influye en la competitividad de las industrias queseras, por lo que se busca producir leche de mayor valor y su mejor aprovechamiento. El conocimiento de la materia prima repercute en la toma de decisiones del productor y la industria.

El objetivo de este estudio fue analizar la influencia de la caseína, su perfil y otros componentes de la leche en el rendimiento del queso Dambo, producido a escala piloto e industrial, con leches provenientes del Litoral Noroeste uruguayo. A escala piloto se utilizaron condiciones de: alta caseína y bajo RCS, alta caseína y alto RCS, baja caseína y bajo RCS y baja caseína y alto RCS. En escala industrial se compararon los quesos de alta caseína con el promedio de planta. Se estudiaron dos estaciones. Se encontró que el queso Dambo elaborado con alta caseína (>2,6g/100g) y bajo RCS (<200.000cel/mil) tuvo un aumento de rendimiento del 10% respecto al de baja caseína (<2,41g/100g) y alto RCS (>500.000cel/mil), ocasionado por mayor recuperación de materia grasa en el queso. A escala industrial se obtuvo un aumento del 9% utilizando alta caseína en leche. Asimismo, existe una influencia positiva de la κ -CN y β -CN en el rendimiento quesero, con una asociación entre α -CN y recuperación de materia grasa.

Palabras clave: Calidad de la leche, rendimiento quesero, textura, recuento de células somáticas, caseína.

Abstract

The yield of cheese affects the competitiveness of the dairy industry, so it is interesting to produce milk of higher value for a better profit. Knowledge of raw materials affects the decisions of producers and industry. The aim of this study was to analyze the influence of casein, its profile and other milk components in Dambo cheese yield, produced at pilot and industrial scale with milk from the Northwest Coast of Uruguay. In pilot-scale milk conditions were: high casein and low SCC, high casein and high SCC, low casein and low SCC and low casein and high SCC. In industrial scale high casein cheeses were compared with the average plant. Two seasons were studied.

We found that Dambo cheese made with high casein (>2,6g/100g) and low SCC (<200.000cel/mil) had a performance increased by 10% compared to low-casein (<2,41g/100g) and high SCC (<500.000cel/mil), caused by an increased fat recovery in cheese.

In industrial scale an increase of 9% with high milk casein was obtained. There is also a positive influence of κ -CN and β -CN in cheese yield, with an association between α -CN and fat recovery.

Keywords: Milk quality, cheese yield, texture, somatic cells count, casein.

Introducción

Uno de los factores más importantes para las industrias productoras de queso y que influye decisivamente en la viabilidad económica es el rendimiento quesero. El rendimiento quesero juega un rol fundamental en la rentabilidad de las industrias lácteas, especialmente en el caso de las industrias

del Litoral Norte uruguayo, donde el queso supone el 80% de sus exportaciones, lo que representó económicamente US\$ 61.374.000 para el año 2011 (Uruguay XXI, 2012). Si bien el rendimiento depende de muchos factores vinculados al proceso industrial, la materia prima utilizada y su conocimiento en profundidad son factores fundamentales en la ecuación financiera de la industria quesera, que generan in-

formación imprescindible para la toma de decisiones. Existen distintas formas de cálculo para el rendimiento quesero, no hay una manera única y correcta de predecirlo, ya que depende directamente de la composición de la leche, el tipo de queso y las condiciones de procesamiento. Algunos autores han discutido fórmulas, y tal vez una de las recopilaciones más completas es el boletín especial que publicó la IDF en el año 1993 (International Dairy Federation, 1993). Varios son los parámetros que impactan en la transformación de leche a queso, y el conocimiento de estos factores permitiría definir potenciales acciones que representen una ventaja competitiva para la industria quesera.

La leche es un fluido acuoso y complejo formado por diversas fases en equilibrio, en las que los factores fisicoquímicos, microbiológicos y enzimáticos afectan directamente la calidad y el rendimiento del producto final. Las caseínas ocupan el 80% de la fracción proteica de la leche y son de gran importancia para la tecnología de productos lácteos. En la transformación de la leche en queso, las caseínas (α_1 , α_2 , β y κ) forman la red proteica conocida como coágulo o gel que será determinante de la calidad y rendimiento del producto final. Se ha demostrado que las interacciones iónicas e hidrofóbicas mantienen la integridad estructural de la micela de caseína, así como la κ -caseína (κ -CN) limita el proceso de asociación proteica, determinando el tamaño final y estabilidad de la micela (Kruif, et al., 2012; Huppertz, et al., 2006). A su vez, juega un rol tecnológico importante en la formación de la cuajada y el rendimiento final en la producción de queso. Tal es así, que leches con alta cantidad de proteínas pero con bajas propiedades para la elaboración de queso afectan el rendimiento (Ikonen, et al., 1999) en virtud del bajo contenido de caseína. Por ende, el rol que juegan las caseínas es fundamental a nivel tecnológico.

Las micelas de caseína están altamente hidratadas y varían en tamaño desde 50 a 300 nm. El tamaño medio de las micelas de caseína nativas está influenciado por el régimen de alimentación del rodeo, sus genotipos de α_1 -CN y κ -CN, el pH (Devold, et al., 2000) y la variación estacional. Glantz y equipo (2010) estudiaron la influencia del tamaño de la caseína en la formación de geles de renina, concluyendo que un menor tamaño de micela de caseína mejora las propiedades de gelificación, lo que podría optimizar el paso inicial en el procesamiento del queso.

Varios autores han evaluado el efecto de la composición de las distintas proteínas en las propiedades coagulantes de la leche, hallando una influencia de la κ -CN y su proporción en relación a la CN total, donde una baja concentración de κ -CN es asociada a una mala coagulación de la leche (Wedholm, et al., 2006), con su consecuente disminución en el rendimiento del queso. Existen estudios que han asociado el alelo B de la κ -CN como determinante para la buena coagulación de la leche, con la obtención de un cuajo más firme, reduciendo tiempos de coagulación de cuajada e incrementando el rendimiento del queso (Ng-Kwai-Hang, 1998; Wedholm, et al., 2006). También se constata un papel importante de la relación α -CN y β -CN como constituyentes básicos de la microestructura del queso (St-Gelais, et al., 2005) El mecanismo de coagulación de las micelas de caseína es un tema complejo y parte de esa complejidad depende de la naturaleza de la leche, su composición, calidad y microestructura.

Asimismo, las leches con un alto contenido de células somáticas se caracterizan por generar una alta concentración de proteasas y una alta actividad enzimática (Santos, et al.,

2003) que va en detrimento de la calidad y rendimiento de los quesos. Si bien existen factores indirectos que son relevantes, los mismos pueden ser detectados y controlados en el tambo y en la industria, entre otros: temperatura y tiempo de enfriamiento de la leche, exceso de agitación y bombeo, corte prematuro de cuajada, defecto de diseño de tina y liras, calibración de instrumentos de medición, tipo de cuajo utilizado, etcétera.

Ozymek y equipo (1993) sugirieron la optimización de la producción, dado que algunas leches son más adaptadas a la producción de queso, mientras que otras pueden ser más rentables económicamente si son utilizadas para el procesamiento de la leche fluida.

Por lo antedicho, es importante el estudio de la composición y calidad de la leche, especialmente la caseína. El conocimiento de los distintos sistemas de producción de leche así como de la variación estacional representa una ventaja para la industria, permitiéndole disponer de fundamentos para la toma de decisiones sobre el destino de la leche en la elaboración de productos lácteos.

Esta investigación se desarrolló en el marco de las acciones llevadas adelante por el Consorcio Regional de Innovación de la Cadena Láctea del Litoral (CRI Lechero del Litoral) en la región Noroeste de Uruguay, mediante el proyecto «Patrones de variación de la caseína en leche en el Litoral Noroeste: su relación con sistemas productivos y producto final», cofinanciado en conjunto con la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). El CRI Lechero del Litoral es una alianza público-privada integrada por: PILI S.A., CLALDY S.A., LATU, INIA y UdelaR, la cual tiene como finalidad efectuar investigación y desarrollos tecnológicos que contribuyan a mejorar la competitividad de la cadena láctea. Este proyecto generó un impacto a nivel de dicha cadena, por medio del conocimiento de la composición de la leche y su relación con la alimentación animal, variaciones climáticas, higiene de establecimiento, sanidad animal, etcétera. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de la caseína, su perfil y otros componentes de la leche en el rendimiento de un queso tipo Dambo, producido a escala piloto e industrial, con leches provenientes de la región Litoral Noroeste de Uruguay.

Materiales y Métodos

Selección de condiciones para el estudio de rendimiento quesero

Para el estudio del rendimiento quesero de la leche se realizaron pruebas experimentales a escala piloto en la planta piloto del LATU y pruebas industriales en dos industrias del Litoral Oeste del Uruguay. En ambos casos se realizaron elaboraciones en dos estaciones del año (invierno y otoño).

Escala piloto

Para la evaluación de rendimiento en escala piloto se conformaron cuatro grupos experimentales, según la composición de caseína y parámetros higiénicos sanitarios, como el recuento de células somáticas (RCS) y el recuento de bacterias totales (RBT). La selección de productores se realizó en base a la evaluación de los distintos parámetros obtenidos

a lo largo de un año sobre la composición de la leche y los parámetros higiénicos sanitarios de 30 establecimientos de leche de las dos industrias de la zona del litoral Oeste. En el año de investigación el 90% de los productores estudiados presentaron valores de RBT menores a 50.000 ufc/mL, por lo que la selección para el estudio fue realizada según la caseína y el recuento de células somáticas. Los productores se seleccionaron para los tratamientos estadísticos según: 1) alta caseína y bajo RCS, 2) alta caseína y alto RCS, 3) baja caseína y bajo RCS, y 4) baja caseína y alto RCS.

Cada condición se realizó por cuatuplicado con leche de 8 productores en las dos estaciones del año que abarca el estudio. Se tomó leche por duplicado de cada uno de los 16 productores para cada elaboración de queso.

Escala industrial

Para las pruebas industriales se utilizó para comparar el rendimiento quesero la composición de caseína de la leche, debido a que es un parámetro que se puede obtener rápidamente en planta si se tiene el equipo adecuado. Se efectuaron comparaciones elaborando quesos con leches de alta caseína contra el promedio de planta (testigo).

Se realizaron cinco repeticiones de cada condición (alta caseína y testigo). Cada industria eligió para la condición experimental de alta caseína un establecimiento con leche de alta caseína seleccionado de los 30 establecimientos analizados. El testigo era el que correspondía a la elaboración del silo de cada planta del día de elaboración.

Elaboración de queso Dambo

Escala piloto

Cada lote de queso fue elaborado a partir de 50 L de leche bovina cruda de cada establecimiento seleccionado. A la llegada de los lotes de leche se midió su temperatura, pH y acidez antes de la elaboración. La leche se estandarizó al 3,0% de materia grasa (MG), en descremadora Westfalia Separator modelo LWA 205-1 (Germany). El proceso de elaboración de los quesos se realizó en una tina quesera doble O con doble camisa y sistema de agitación y corte mecánico controlado, donde a partir de 50 L se pasteurizó inmediatamente a 72 °C por 15 segundos. Los quesos fueron elaborados el mismo día de la recepción de la leche. El proceso aplicado se muestra en la Figura 1.

Todos los quesos fabricados fueron envasados y conservados en la cámara de maduración hasta el momento de su análisis. Se analizaron los quesos a tiempo 0, 30, 60 y 120 días.

Escala industrial

Cada lote de queso en cada industria fue elaborado a partir de tinajas industriales de 12.000 L de leche, midiéndose pH y densidad de la leche antes de la elaboración. Se estandarizó y se siguió el procesamiento habitual de elaboración de queso Dambo de las plantas procesadoras. Todos los quesos fueron envasados y conservados en cámara de maduración a 8 +/- 2 °C hasta el momento de su análisis. La industria tomó el peso y la humedad a tiempo 0 en la planta industrial, y luego se realizaron los análisis en el LATU. La empresa A analizó los quesos a los 30, 60 y 120 días de madurados y la empresa B a los 60 y 120 días de madurados.

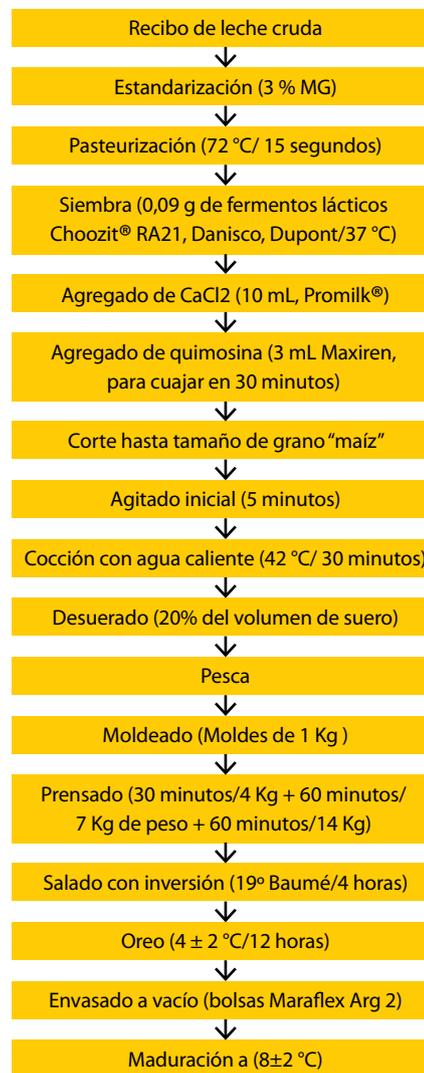


Figura 1. Proceso de elaboración de queso.

Análisis de la leche

Se efectuaron tanto en leche cruda como en leche de tina, con el siguiente detalle: pH, acidez (como control de rutina), RCS, RBT fueron realizados a partir de la leche cruda, mientras que los parámetros de composición, densidad, y perfil de caseína fueron realizados en ambas leches. También se analizó el diámetro de micela de caseína, solo de las leches de tina correspondientes a la segunda elaboración. A continuación se detallan los análisis:

- **pH:** Se midió con pHmetro Mettler Toledo Seven Multi y electrodo combinado de penetración.
- **Acidez titulable:** En grados Dornic según ISO/TS 22113 (IDF/RM 204:2012).
- **Composición de la leche.** Proteínas, materia grasa, sólidos no grasos, urea, caseína total y lactosa: Se realizó utilizando metodología infrarroja mediante el equipo MilkoScan TM FT2 (Foss, Dinamarca), calibrado según métodos de referencia (ISO 8968/IDF 20:2001; ISO 1211/IDF1; ISO 6731/IDF 21).
- **Células somáticas:** Realizado con equipo Foss somatic (Foss, Dinamarca).

- **Análisis de perfil proteico:** Se determinó el contenido de α , β y κ -caseína por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa (fase móvil polar), empleando detector PDA y extracción de cromatograma a $\lambda = 222$ nm, por porcentaje relativo de áreas (Bonizzi, et al., 2009).
- **Distribución del tamaño de micela de caseína:** Se utilizó analizador de tamaño de partículas por tecnología de difracción láser Zetasizer (Malvern Instruments Limited, UK). Se calculó el percentil 50% D(v0,5), que es la mediana de la distribución, es decir, el valor de tamaño de partícula que divide a la población de gotas de la emulsión en dos partes iguales, 50% por encima y 50% por debajo. El valor de D(v0,9) representa el valor del tamaño de las partículas para que la distribución de estas sea exactamente el 90% de las partículas de la muestra (v/v) que presentan un tamaño inferior o igual.

Análisis de los quesos

En cuanto a los quesos, se aplicaron los siguientes análisis para medir rendimiento y textura:

- **Peso:** Se utilizó balanza de precisión Shimadzu BX22KH.
- **pH:** Se midió con pHmetro Mettler Toledo Seven Multi y electrodo combinado de penetración I.
- **Humedad, proteínas, materia grasa:** Se analizaron con Food Scan® Lab type 78800 Foss, Dinamarca, previamente calibrado según las normas ISO 5534/IDF 004:2004, ISO 8968/IDF 20:2001 e ISO 1735/IDF 005:2004, respectivamente.
- **Textura:** Se realizó el análisis de perfil de textura (TPA) con texturómetro TA-XT-Plus Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd., Godalmingel, UK). Se utilizaron muestras cortadas en cilindros de 17 mm de diámetro y 20 mm de largo a 20 ± 2 °C. Las muestras se sometieron a doble ciclo de compresión uniaxial con probeta cilíndrica de aluminio P/36R, velocidad 5 mm/s, compresión 35%, tiempo de pausa 5s. Se determinó la fuerza, elasticidad, cohesividad y masticabilidad y adhesividad. Fueron analizadas seis repeticiones por muestra. Para la adquisición de datos y cálculos se utilizó el software Exponent Stable Micro Systems Version 5.1.1.0.

Cálculos de rendimiento y aprovechamiento de sólidos en queso

Se tomó en cuenta el rendimiento económico y rendimiento práctico/técnico, para los cuales existen distintas ecuaciones según los contenidos de los componentes de la leche, los que determinarían si hubo un aprovechamiento ideal de los constituyentes de la leche que pueden ser transferidos al queso. Además, los cálculos de rendimiento quesero permitirían establecer comparaciones válidas entre diferentes fabricaciones de un mismo tipo de queso, a pesar de que estos presenten composición físico-química diferente.

Rendimiento Práctico/Técnico/Económico (R.E): es el resultado del cociente entre el peso del queso y el peso de la leche. Su ecuación es:

$$\text{Rend. técnico o económico (R.E) \%} = \frac{\text{Peso queso (Kg)}}{\text{Peso leche (Kg)}} \times 100$$

Rendimiento FIL (R.FIL): Rendimiento teórico basado en la composición de la leche cuya fórmula obtenida por Van Slyke y Publow y modificada por la International Dairy Federation (1993) incluye el contenido de materia grasa y caseína de la leche, factor de conversión de la grasa de la leche al queso y el contenido de humedad del queso.

Rendimiento FIL (R. FIL)

$$(\text{R. FIL})\% = \frac{(\text{RMG} * \text{MG (leche)} + 0.94 (0.97 * \text{CN (leche)}) + 0.78) * 100}{100 - \text{Hq (queso)}}$$

Donde:

RMG: recuperación de materia grasa.

MG: % de materia grasa de la leche.

CN: % de caseína de la leche.

Hq: % de humedad en queso.

Rendimiento ajustado: Se utiliza para comparar el rendimiento quesero de quesos con diferentes tenores de humedad. La pregunta a la que responde la siguiente ecuación es: ¿Si los quesos tuviesen el mismo tenor de humedad, el rendimiento sería el mismo? Se tomó como humedad de referencia 46%.

$$\text{Rend. ajustado (R. Aj) \%} = \frac{R (100 - \text{Hq. obtenida})}{(100 - \text{Hq. de referencia})}$$

El aprovechamiento de los sólidos de la leche en el queso se determinó mediante:

Recuperación de materia grasa (RMG)

$$(\text{RMG}) = \frac{\text{Peso del queso} * \text{MGq (queso)}}{\text{Peso de la leche} * \text{MG (leche)}}$$

Recuperación de proteína (RP)

$$(\text{RP}) = \frac{\text{Peso del queso} * \text{Pq (queso)}}{\text{Peso de la leche} * \text{P (leche)}}$$

Recuperación de extracto seco (RES)

$$(\text{RES}) = \frac{\text{Peso del queso} * \text{ESq (queso)}}{\text{Peso de la leche} * \text{ES (leche)}}$$

Donde:

MGq: % de materia grasa del queso.

ESq: % extracto seco del queso.

Pq queso: % de proteína del queso.

P: % de proteína de la leche.

ES: % de extracto seco de la leche.

Análisis de datos

Para el análisis de rendimiento en escala piloto se utilizó un diseño experimental completamente al azar y se realizó un ANOVA de dos factores con interacción (tratamiento según la condición de caseína y células somáticas y estación del año). Para los estudios de las recuperaciones de proteína, materia grasa y extracto seco, así como para el de variación de la textura con el tiempo de maduración, el análisis estadístico se realizó según diseño al azar con parcelas divididas medidas en el tiempo utilizando ANOVA. Para el análisis de otros

componentes de la leche se aplicó análisis multivariado de mínimos cuadrados parciales. Para determinar la diferencia significativa entre muestras se utilizó el test de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando InfoStat Statistical Software versión 2011.

Resultados

Rendimiento

Se realizó una comparación de las tres formulaciones de rendimiento quesero, propuestas en materiales y métodos, de las cuales algunas de ellas son de uso habitual en la industria quesera. En el Gráfico 1 (a y b) se muestran los rendimientos según la formulas FIL, ajustado y económico, de todos los lotes de elaboración.

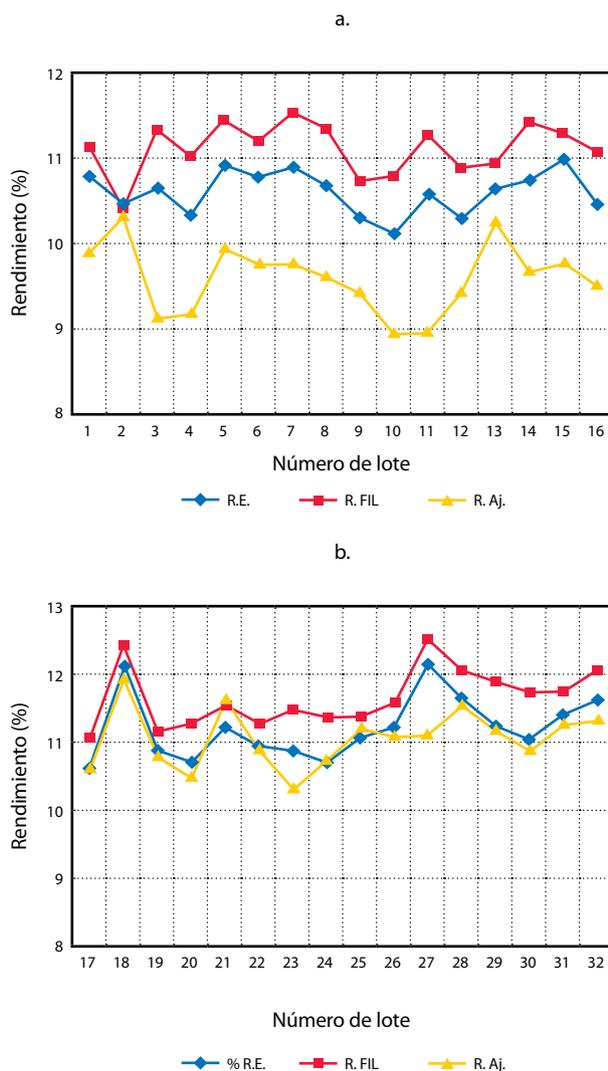


Gráfico 1. Rendimientos de todos los lotes de producción realizados en las elaboraciones de quesos de invierno (a) y otoño (b).

En ambos gráficos se observa una correlación entre la utilización del rendimiento FIL y el económico, no siendo así

para el rendimiento ajustado, para el cual se corroboró una correlación lineal entre el rendimiento FIL y el económico por el método de regresión lineal ($p \leq 0,001$ y $R^2 = 0,91$). El rendimiento FIL presentó correlación con el rendimiento económico, según las siguientes ecuaciones: $R.FIL = 2,14 + 0,85 \cdot R.E$ y $R.FIL = 1,83 + 0,88 \cdot R.E$ en invierno y otoño, respectivamente.

No se verifica correlación del rendimiento ajustado con los otros rendimientos estudiados.

Efecto de la caseína y el RCS en leche sobre el rendimiento quesero

Escala piloto

Se presentan en la Tabla 1 los resultados del rendimiento técnico según fórmula FIL y el rendimiento económico o bruto de los cuatro grupos seleccionados para este estudio según la composición de caseína y el recuento de células somáticas en las dos elaboraciones y la correspondiente estación del año.

Caseína y RCS	Estación	R. FIL (%)	R.E (%)
Alta CN y alto RCS	Otoño	11,97 +/- 0,17 c	11,35 +/- 0,20 c
Alta CN y bajo RCS	Otoño	11,45 +/- 0,17 c	10,88 +/- 0,20 c
Alta CN y alto RCS	Invierno	11,16 +/- 0,17 a b	10,62 +/- 0,20 a b c
Alta CN y bajo RCS	Invierno	11,28 +/- 0,15 a b c	10,73 +/- 0,17 a b c
Baja CN y alto RCS	Invierno	11,05 +/- 0,17 a b	10,40 +/- 0,20 a b
Baja CN y bajo RCS	Invierno	10,94 +/- 0,15 a b	10,46 +/- 0,17 a b
Baja CN y alto RCS	Otoño	10,73 +/- 0,17 a b	9,90 +/- 0,20 a
Baja CN y bajo RCS	Otoño	10,61 +/- 0,15 a	10,10 +/- 0,17 a b

Tabla 1. Rendimientos de los quesos en las elaboraciones realizadas en las dos estaciones estudiadas según contenido de caseína y las células somáticas ($n = 4$). Medias con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Se encontró que existe diferencia significativa en el rendimiento quesero por un efecto de la caseína, independientemente de las células somáticas en el rendimiento FIL ($p = 0,003$) y en el rendimiento económico ($p = 0,009$). En ambos rendimientos hubo interacción con las estaciones estudiadas ($p = 0,0099$ y $p = 0,0239$, respectivamente). En el estudio realizado en otoño las células somáticas presentaron como valores promedios de 443 mil/mL y bajo RCS de 183 mil/mL. En el caso de las caseínas se obtuvieron valores promedios de alta y baja caseína de 2,60% y 2,40%, respecti-

Escala industrial

EMPRESA	CONDICIÓN	ESTACIÓN	R. FIL (%)	R. E (%)
EMPRESA A	ALTA CN	INVIERNO	9,49 +/- 0,09 a	9,46 +/- 0,10 a
	TESTIGO		9,33 +/- 0,09 a	9,28 +/- 0,10 a
	ALTA CN	OTOÑO	10,06 +/- 0,09 b	9,94 +/- 0,09 b
	TESTIGO		9,56 +/- 0,09 a	9,32 +/- 0,09 a
EMPRESA B	ALTA CN	INVIERNO	10,94 +/- 0,08 B	10,76 +/- 0,08 B
	TESTIGO		10,11 +/- 0,08 A	10,03 +/- 0,08 A
	ALTA CN	OTOÑO	12,49 +/- 0,10 B	12,04 +/- 0,10 B
	TESTIGO		10,53 +/- 0,10 A	10,12 +/- 0,10 A

Tabla 2. Rendimientos de los quesos realizados industrialmente en las empresas A y B según cada estación (n = 5). Medias con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes (p > 0,05).

vamente. En la Tabla 1 se observa una diferencia significativa al 5% de confianza entre los rendimientos queseros obtenidos a partir de leches con alta y baja caseína en las elaboraciones de otoño, independientemente del valor de células somáticas, en el rango trabajado.

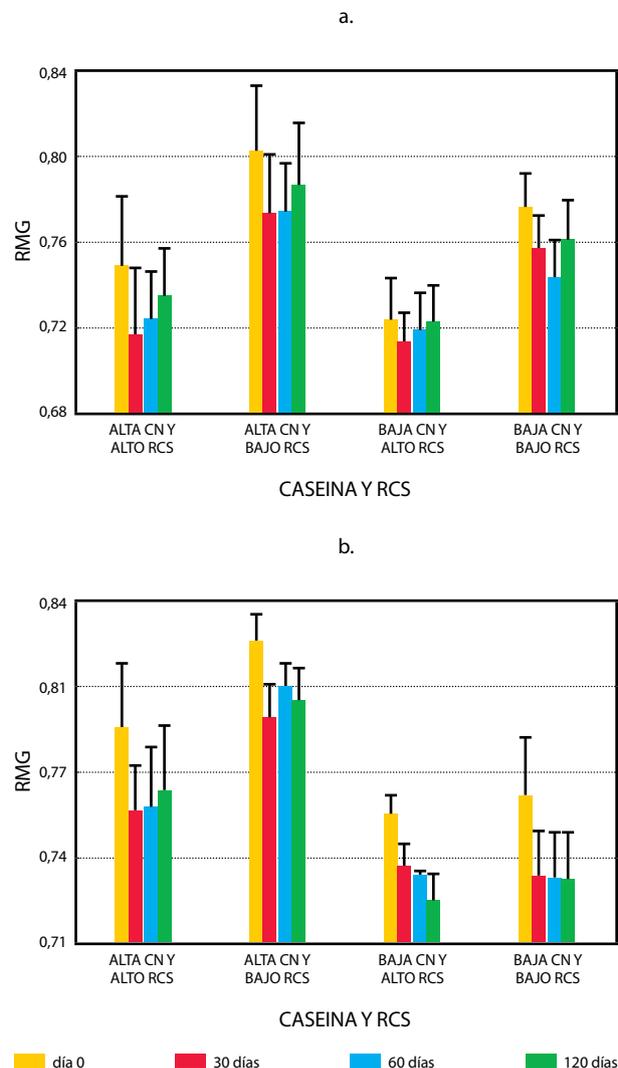
Para los quesos elaborados en invierno el mayor rendimiento se obtuvo con la utilización de leche de alta caseína y bajo RCS. En esta estación las diferencias entre los valores promedios de caseína de las leches que se utilizaron por cada condición fueron menores: alta caseína 2,56% y baja caseína 2,41%. En cuanto al RCS presentaron un promedio de alto RCS 491 mil/mL y bajo RCS 221 mil/mL.

Se expresan en la Tabla 2 los rendimientos obtenidos por las dos empresas en ambas estaciones del año de estudio. En la empresa A se observó un aumento significativo (p ≤ 0,05) en el rendimiento al utilizar alta caseína contra el testigo de planta solo en otoño, que en el caso del rendimiento económico representa un 6,6%. A su vez, los estudios realizados en invierno solo tuvieron en el caso del rendimiento FIL una diferencia significativa al 10% de confianza (p = 0,086) aumentando un 1,9%. En tanto, en la empresa B se obtiene un aumento significativo del rendimiento por el uso de leche con alta caseína contra el testigo de planta en las dos estaciones de estudio, con un aumento del 7% en invierno y del 18% en otoño. Luego de los resultados obtenidos en invierno, la empresa B realizó cambios que permitieron mejorar el aumento del rendimiento en otoño. En ambas empresas y en todos los casos estudiados la caseína del silo promedio de la planta siempre tuvo valores menores de caseína que los silos que se utilizaron para leche con alta caseína.

Aprovechamiento de los sólidos de la leche en el queso

Escala piloto

Se presentan los resultados de aprovechamiento de los sólidos según la recuperación de materia grasa, proteína de la leche en



el queso (Gráficos 2, 3 y 4) y la humedad de los quesos según las elaboraciones realizadas por estación del año.

Gráfico 2. Recuperación de materia grasa de leche en quesos elaborados en invierno (a) y otoño (b) con el tiempo.

En los quesos fabricados en ambas estaciones se observa que las leches con alta caseína y bajo recuento de células somáticas presentaron mayor recuperación de materia grasa que el resto de las leches ($p \leq 0,05$), sin registrarse diferencias en el tiempo.

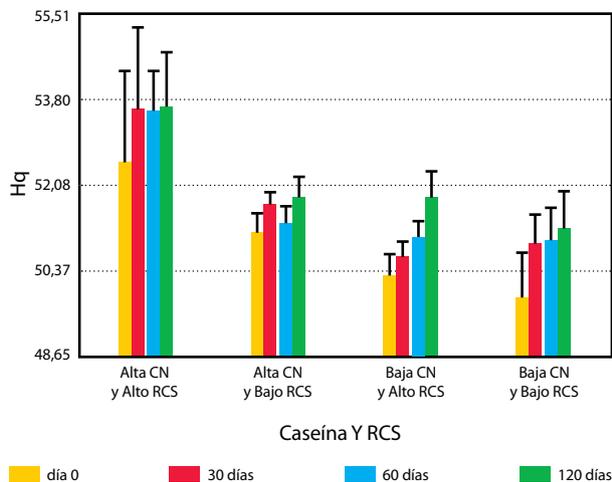


Gráfico 3. Humedad en quesos en función del tiempo de la elaboración realizada en otoño.

En cuanto a la humedad de los quesos, en las elaboraciones de invierno no se encontraron diferencias significativas en la humedad, pero sí hubo diferencias entre los tratamientos estudiados en los quesos elaborados en otoño, como se muestra en el Gráfico 3.

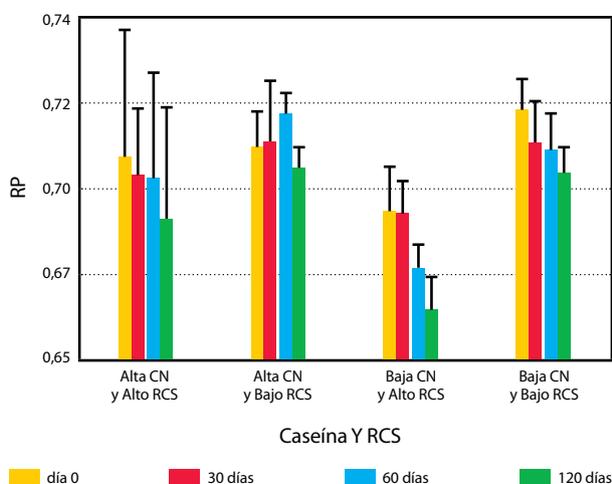


Gráfico 4. Recuperación de proteínas de la leche en quesos con el tiempo de la elaboración realizada en otoño.

En el Gráfico 4 se presenta la recuperación de las proteínas de la leche en el queso en otoño. Se determinó que las leches con baja caseína y alto recuento de células somáticas presentaron menor recuperación de proteína ($p \leq 0,05$). Las

leches con altos recuentos de células somáticas (indicador del estado de salud de la glándula mamaria) estarían indicando un aumento en la actividad de la plasmina, afectando las proteínas.

Escala industrial

En el Gráfico 5 (a y b) se expresan las recuperaciones de materia grasa obtenidas en las elaboraciones industriales de la empresa A, en cada estación del año.

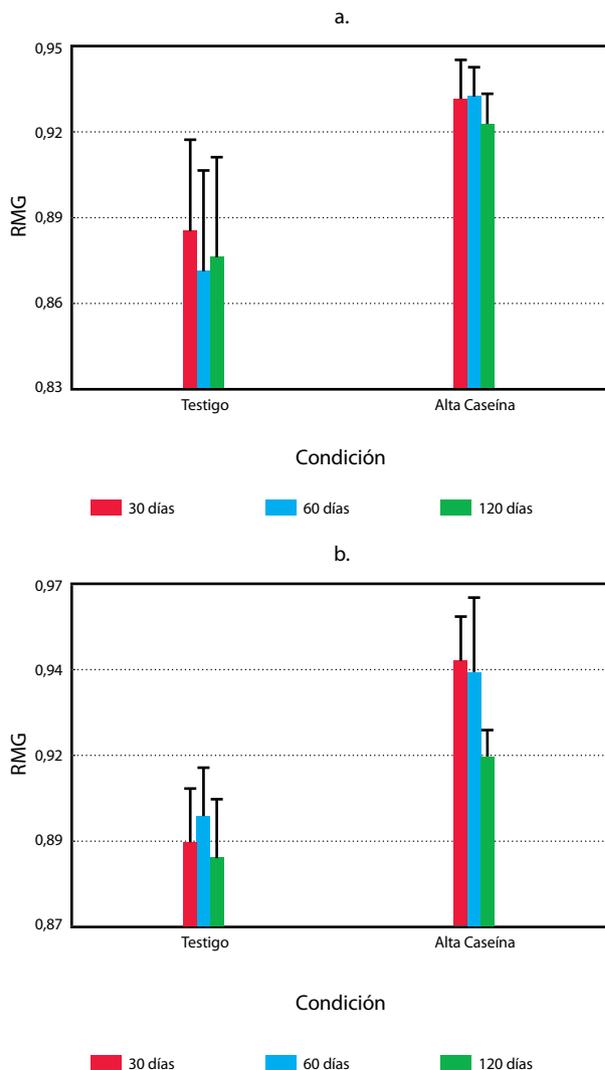


Gráfico 5. Recuperación de materia grasa de la leche en los quesos elaborados en invierno (a) y otoño (b) con el tiempo de la empresa A.

En ambas estaciones se observó que las leches con alta caseína de la empresa A presentaron mayor recuperación de materia grasa que el testigo de planta ($p \leq 0,05$).

A su vez, no se encontraron diferencias significativas en la empresa A en la recuperación de proteínas, ni en la humedad del queso en ambas estaciones entre el testigo y alta caseína.

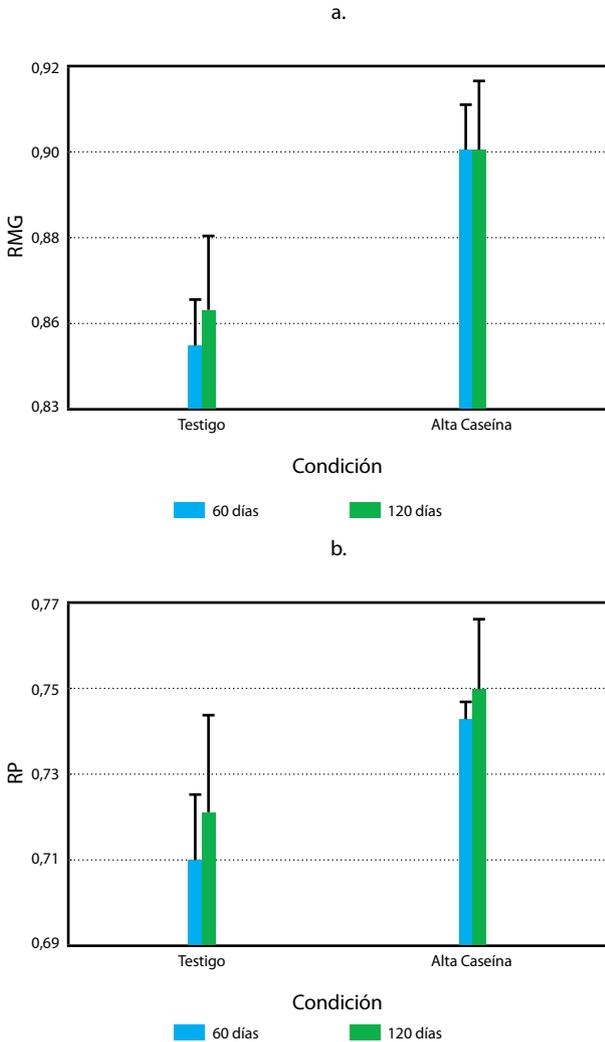


Gráfico 6. Recuperación de materia grasa (a) y de proteína (b) en invierno con el tiempo de la empresa B.

En las elaboraciones de la empresa B se observó que las leches con alta caseína presentaron mayor recuperación de materia grasa y de proteína que el testigo de planta ($p \leq 0,05$), sin diferencias significativas en el tiempo. No se hallaron diferencias por la humedad de los quesos en las elaboraciones entre el testigo y alta caseína, tampoco en el tiempo.

Efecto de distintos componentes de la leche en el rendimiento quesero

Se muestra en el Gráfico 7 (a y b) la influencia de los distintos componentes de la leche, como la proteína, materia grasa, urea, caseína, lactosa, así como también el perfil de caseínas (α -CN, β -CN y κ -CN) y las células somáticas según el rendimiento quesero, humedad del queso y recuperación de materia grasa de las elaboraciones realizadas en invierno y otoño.

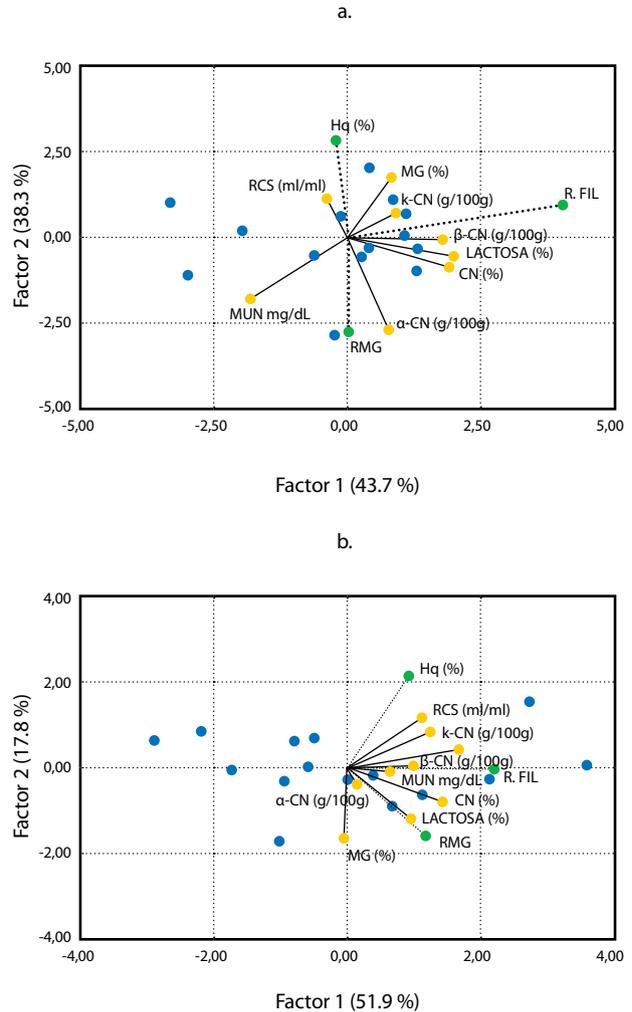


Gráfico 7. Análisis multivariado de mínimos cuadrados parciales de las variables en el Rendimiento FIL, recuperación de materia grasa en queso (RMG) y humedad del queso (Hq [%]), según parámetros de la leche MUN (urea), CN, α -CN, β -CN y κ -CN, RCS, LACTOSA y MG, en invierno (a) y otoño (b).

Por un lado, se observa que en los quesos elaborados en invierno, la β -CN, κ -CN y la lactosa son los componentes de la leche que afectan positivamente el rendimiento quesero. Por otro lado, se aprecia una influencia negativa en el rendimiento del queso por parte de la urea en leche.

Se muestra una asociación entre la α -CN y la recuperación de materia grasa, lo que puede estar asociado a una mejor retención de grasa en la red proteica que forma el queso. No se observó una relación del RCS y el rendimiento quesero en el rango de células somáticas que presentaron las leches utilizadas en estas elaboraciones. Para los quesos elaborados en otoño se incluye además el diámetro de partícula de la caseína, en el que se observa la influencia positiva de la caseína y β -CN en el rendimiento quesero; la κ -CN está más asociada a la humedad y la α -CN a la recuperación de materia grasa, coincidiendo estos resultados en parte con los obtenidos en invierno.

Distribución del tamaño de micela de caseína

No se encontró una correlación entre el D (v0,5) y el D (v0,9) con el rendimiento quesero. El valor medio encontrado de D (v0,5) fue de 334 μm , variable entre un mínimo de 277 μm y un máximo de 412 μm . El valor medio de D (v0,9) fue de 674 μm , variable entre un mínimo de 576 μm y un máximo de 577 μm .

Efecto de la composición de la leche sobre la textura del queso

En el Gráfico 8 se aprecia la dureza del queso para ambas elaboraciones, expresada según la fuerza aplicada. En la elaboración de invierno no se observan diferencias significativas a tiempo 0 entre los tratamientos estudiados. En la elaboración de otoño los quesos que poseían baja caseína independientemente de las células somáticas poseen en el tiempo 0 mayor dureza.

En ambas estaciones se observa la disminución de la dureza a los 60 días de estudio, lo que corresponde a una proteólisis del queso con la maduración del mismo. En la Tabla 3 se muestra que los quesos con menor porcentaje de proteína presentan menor fuerza, lo que podría deberse a una mayor proteólisis.

Según se observa en la Tabla 3, no hubo diferencias significativas con la masticabilidad, cohesividad y la elasticidad de los quesos estudiados. Se observa una mayor masticabilidad en los quesos que contienen alta caseína, lo cual es razonable ya que está relacionada con la dureza.

Discusión

Rendimiento

Los resultados indican que el rendimiento económico es un buen estimativo del rendimiento técnico de la fórmula FIL presentada. El RE es una formulación que requiere medidas

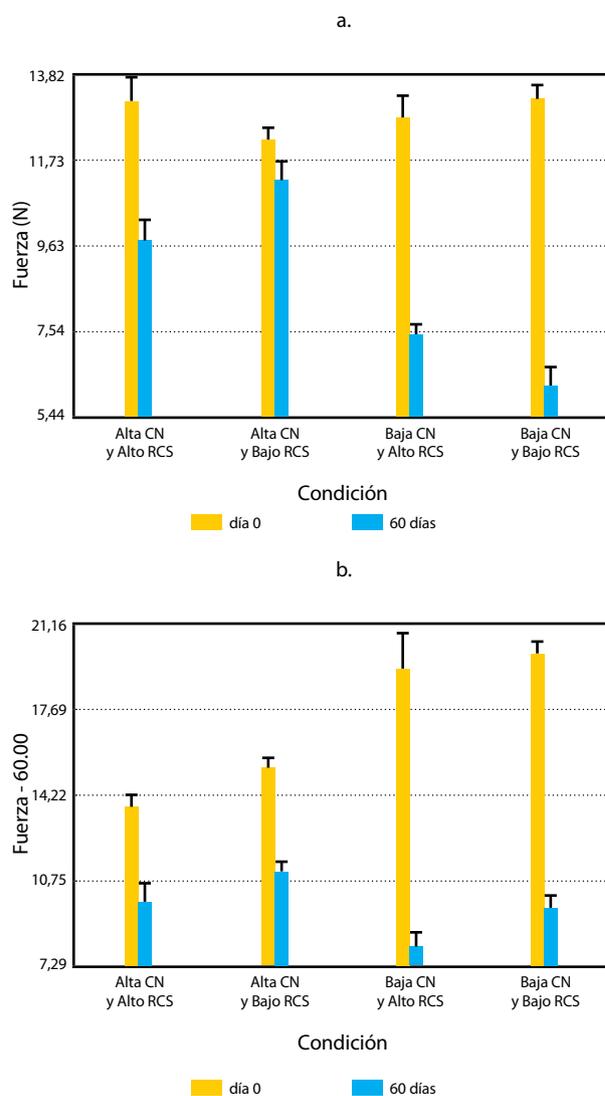


Gráfico 8. Fuerza del queso según condición a tiempo 0 y 60 días de la elaboración de invierno (a) y otoño (b).

CASEÍNA Y RCS	F (N)	Adhesividad (g.sec)	Cohesividad	Elasticidad	Masticabilidad
Alta CN y Alto RCS	9,73 +/- 0,49 ^a	-9,56 +/- 0,88 ^a	0,99 +/- 0,01 ^a	0,96 +/- 0,01 ^a	9,39 +/- 0,38 ^{AB}
Alta CN y Bajo CS	11,20 +/- 0,43 ^a	-11,39 +/- 0,89 ^a	0,97 +/- 0,01 ^a	0,96 +/- 0,01 ^a	10,3 +/- 0,39 ^A
Baja CN y Alto RCS	7,48 +/- 0,49 ^b	-12,90 +/- 1,03 ^a	0,98 +/- 0,01 ^a	0,96 +/- 0,01 ^a	7,06 +/- 0,45 ^B
Baja CN y Bajo RCS	6,22 +/- 0,42 ^b	-11,12 +/- 1,01 ^a	0,99 +/- 0,01 ^a	0,95 +/- 0,01 ^a	5,79 +/- 0,38 ^B

Tabla 3. Parámetros de textura en los quesos en la elaboración de invierno a los 60 días.

Medias con letras minúsculas con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,05$). Medias con letras mayúsculas con una letra común en la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0,0628$).

de peso del queso y la leche, y es comúnmente utilizado por las industrias, no así el FIL, que requiere la realización de técnicas y equipos de más valor para su determinación. El uso del rendimiento ajustado no se correlaciona con el rendimiento FIL ni con el económico. El conocimiento de estas relaciones podría ayudar a las industrias a elegir qué ecuaciones tomar para el cálculo del rendimiento.

Efecto de la caseína y el RCS en leche sobre el rendimiento quesero

En la escala piloto se obtiene en rendimiento económico un 7% de aumento en invierno y un 11% en otoño, lo que confirma la variación estacional. En escala industrial ambas empresas obtuvieron menor aumento de rendimiento en el mes de invierno. Este resultado dado en ambas escalas podría estar relacionado al sistema productivo de cada época del año (considerando como sistema la alimentación y sanidad animal).

El mayor rendimiento (~9%) en escala piloto es obtenido cuando se tiene alta caseína. Si bien se obtuvo a nivel industria un promedio de aumento de rendimiento del (~10%) al elaborar quesos con leches de alta caseína en comparación al promedio de planta, se visualizó que la empresa B posee valores mayores de aumento, lo cual puede deberse a diversos factores, no solo de la leche sino también de prácticas de elaboración a nivel industrial.

Se confirma a escala industrial los resultados obtenidos a escala piloto y se puede afirmar que para quesos Dambo elaborados en estas condiciones y con la leche utilizada el rendimiento fue entre un 9 y 10% mayor al utilizar leches de alto contenido de caseína. Esto concuerda con lo demostrado por varios autores en cuanto a que el contenido de caseína está directamente relacionado con el contenido del queso (Walstra, et al., 2006; McSweeney, et al., 2007; Abd El-Gawad y Ahmed, 2011).

El mayor rendimiento existe según estos estudios al presentar mayor caseína y menor RCS (Tabla 1), y esta es la situación en la que se tiene la mayor recuperación de materia grasa en el queso (Gráfico 2), lo cual se mantiene en el tiempo de estudio. Por esto se podría considerar que el mayor rendimiento obtenido puede deberse a una mayor retención de la materia grasa de la leche en la red proteica del queso.

Las leches con alta caseína y alto recuento de células somáticas fueron las que presentaron mayor humedad en los quesos (Gráfico 3) en otoño. Vianna y equipo (2008) concluyeron en un estudio de queso Prato (queso tipificado como de pasta lavada al igual que el Dambo) que altos niveles de RCS (785.000 células/mL) afectan las bacterias ácido lácticas, los psicótrofos y el recuento de hongos y levaduras, presentando un aumento en la humedad y un menor contenido de grasa, pero una menor aceptación por parte del consumidor.

En escala piloto (Gráfico 4) los quesos con alto RCS y baja CN son los que recuperan menor cantidad de proteínas. Esto coincide con trabajos que demuestran que la leche con alto contenido de células conduce a una mayor pérdida de proteína en la fabricación de queso y, por lo tanto, a un menor rendimiento del queso, y RCS mayores a 500.000 células/mL conducen a una disminución del rendimiento (Abd El-Gawad y Ahmed, 2011).

En escala industrial ambas empresas (Gráficos 5 y 6) también indican un aumento del rendimiento referido a una

mayor retención de materia grasa de la leche en el queso, lo que es concordante con los resultados hallados a escala piloto.

Efecto de distintos componentes de la leche en el rendimiento quesero

Según estudios realizados por otros autores, la κ -CN desempeña un papel muy importante tanto en la micela de caseína como en la elaboración de quesos. A su vez, es la que limita el proceso de asociación proteica dentro de la micela, además de determinar el tamaño final y estabilidad de la misma (Kruijff, et al., 2012; Huppertz, et al., 2006), siendo una de las caseínas que influyen fuertemente en el rendimiento del queso. Abd El-Gawad y Ahmed (2011) determinaron que la κ -CN tiene repercusiones sobre el tamaño de las micelas de caseína y sobre las propiedades de coagulación de la leche, dando una cuajada más firme y capaz de retener una mayor cantidad de sustancias, aumentando así el rendimiento del queso. En este artículo se consignaron resultados similares en cuanto a la influencia de la κ -caseína en el aumento del rendimiento del queso, pero no se hicieron inferencias sobre el tamaño de la partícula. Otros autores han reportado influencia en la coagulación y un aumento en el rendimiento del queso por la κ -CN (Ikonen, et al., 1999; Wedholm, et al., 2006), principalmente por el alelo bb de la κ -CN (Bonfatti, et al., 2011). St-Gelais y otros (2005) reportan a α -CN y β -CN como constituyentes básicas de la microestructura del queso y Bonfatti et al. (2011) sugieren más estudios sobre la β -CN. A su vez, se ha reportado en estudios sobre la influencia del tamaño de micelas de caseína nativas sobre el rendimiento quesero que su tamaño está influenciado por el régimen de alimentación de los rodeos, sus genotipos de α 1-CN y κ -CN, el pH (Devold, et al., 2000) y la variación estacional. Glantz et al. (2010) estudiaron la influencia del tamaño de la caseína en la formación de geles con renina, concluyendo que un menor tamaño de micela de caseína mejora las propiedades de gelificación, lo que podría optimizar el paso inicial en el procesamiento del queso. En este estudio no se verifica su influencia, lo que requiere mayor conocimiento de los rodeos estudiados y sus efectos.

La salud de la ubre es otro de los factores que afectan la calidad de la leche y, por consiguiente, la producción de queso. El alto contenido de RCS redundaba en un mayor tiempo de coagulación de la leche, presentando un coágulo más débil, lo que conduce a una mala sinéresis y a un bajo rendimiento quesero (Marino, et al., 2004). Sin embargo, en el rango de RCS de este estudio realizado en el queso tipo Dambo en la planta piloto no se asocia una relación entre el RCS y el rendimiento quesero en ninguna de las dos elaboraciones realizadas (Gráfico 7). Los rangos de células somáticas de las leches estudiadas fueron desde 100.000 hasta 612.000 células/mL. En los rangos que se consideraron en este estudio la incidencia de los valores de caseína y los tipos de caseína tuvieron mayor incidencia en el rendimiento que los RCS. Se han realizado estudios en queso Prato, similar al Dambo, en los que se elaboraron quesos con bajo RCS (170.000 células/mL) y alto RCA (800.000 células/mL), concluyendo que un alto recuento de células somáticas aumenta el tiempo de coagulación y provoca pérdidas económicas para la industria (Mazal, et al., 2007).

En cuanto a la urea en leche (MUN), en la elaboración de otoño (Gráfico 7 a y b) se identificó un efecto contrario entre las estaciones estudiadas, por lo que habría que enfocar

más estudios en este tema. Podría haber un efecto estación debido a la alimentación ofrecida a los rodeos lecheros en las diferentes estaciones, pero no es posible confirmarlo con los datos obtenidos. Según Moharrery (2004), al aumentar la urea en leche se produce una disociación parcial de la caseína, calcio y fosfato hacia la fase soluble. En particular, altas concentraciones de urea son causa directa o indirecta de problemas como un incremento en el tiempo de coagulación, la formación de una cuajada más débil y menos estructurada, el desarrollo prematuro de fermentaciones irregulares y cambios en la proteólisis de la masa. Si bien no hay muchos reportes sobre los efectos de la urea de la leche en quesos, se encontró que está relacionada con la composición cinética de acidificación y textura en Reblochon cheeses (Martin, 1997), y que en leche de cabra el tiempo necesario para la coagulación y organización de la cuajada fue mayor para la leche de alto tenor de urea (Allocati, 2002).

Textura

Si bien existen varios estudios de reología del gel en quesos, los estudios de textura son más enfocados a cambios en procesos que a la composición de la leche en sí misma. Kamleh y otros (2006) relacionaron una mayor dureza del queso Baladi cuando se tiene una mayor concentración de sólidos totales. Los efectos de textura en los quesos dependen de muchas variables, entre ellas el tamaño de micelas de caseína que al ser modificado cambia la textura de los quesos (Sandra, et al., 2004a; Hnosko, 2007; Escobar, et al., 2011), así como los fermentos y cuajos utilizados. La disminución de la fuerza del queso a los 60 días en ambas estaciones del año puede deberse a que las enzimas proteolíticas presentes en los quesos van actuando y produciendo una proteólisis y disminuyendo así la dureza del queso con la maduración. La masticabilidad es el producto de la fuerza por la cohesividad y por la elasticidad, dado que las dos últimas fueron independientes de las condiciones el cambio de masticabilidad está directamente relacionado con la dureza del queso.

Aunque en este estudio se mantuvieron constantes las condiciones de elaboración, para evaluar solo el efecto de la leche son necesarios más estudios.

Conclusiones

El rendimiento quesero es un factor importante para la industria por lo que representa en la economía, sobre todo en un país exportador. La ecuación de rendimiento económico que es habitualmente utilizada por la industria láctea es un buen estimativo del rendimiento técnico.

Los quesos producidos con leche que contiene alta caseína y bajo RCS presentan mayor rendimiento con una mayor recuperación de materia grasa en el queso. Por un lado, estos factores pueden ayudar a la industria a evaluar el pago de la leche y, por otro lado, pueden guiar al productor a una producción ajustada a los intereses de la industria.

La caseína es el componente de la leche que presenta mayor influencia positiva en el rendimiento quesero en los rangos estudiados, lo cual coincide con la literatura de referencia a nivel mundial. Sin embargo, existen otros resultados que resultan divergentes a lo propuesto por otras investigaciones. Un ejemplo de ello son los resultados encontrados por la influencia de la urea, los cuales según la bibliografía

de referencia requieren una profundización en el estudio de la urea a diferentes niveles.

A su vez, se obtiene una influencia positiva de la κ -caseína y de la β -caseína en el rendimiento quesero, lo que sugiere el estudio de los perfiles proteicos de los rodeos en el país y de su genética que permita buscar una relación con la leche y con el rendimiento del queso.

Se identificaron parámetros de calidad de leche que permiten a la industria guiar al productor hacia la obtención de leche mejorada para la producción de queso, lo cual redundaría en un beneficio para toda la cadena láctea. También se obtuvieron resultados que pueden permitir futuros estudios para la evaluación sobre la logística de recolección de leche y su destino final. Existen otros factores como los tamaños de la micela de caseína y del glóbulo de grasa, el equilibrio mineral, la urea y la genética de los rodeos lecheros que resulta crucial incorporar en otros estudios con el fin de continuar optimizando la producción de la industria láctea nacional.

Reconocimientos

A todo el personal que contribuyó a este proyecto por parte de las distintas instituciones, CLALDY S.A. y PILI S.A., INIA, LATU y UdelaR. Especialmente a: V. Friessen, H. Klanssen, A. González, J. Cabrera E. De Torres, E. Gianneecchini, E. Favre, L. Casas y J. Cea. A los 30 productores de las empresas lácteas y extensionistas de las industrias, así como al personal directivo de las industrias y empresas que apoyaron el proyecto. A visitantes extranjeros: F. Harte de Pennsylvania State University, USA P. Juliano de CSIRO Australia, A. Gauna de Clerici Sacco Group y J. Berterreche.

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación del proyecto de alianzas gracias al cual se desarrolló esta publicación.

Referencias

- Abd El-Gawad, M.A.M, Ahmed, N.S., 2011. Cheese yield as affected by some parameters review. En: *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 10(2), pp.131-153.
- Allocati, P., Gonzales, J.H., Ceballos, M.E., Cassu, M.E. y Danelon, J.L., 2002. Contenido de urea en leche de cabra e Impacto de la calidad en leche de cabra. En: *Revista Argentina de Lactología*. (21), pp.9-22.
- Bonfatti, V., Cecchinato, A., Gallo, I., Blasco, A. y Carnier, P., 2011. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. En: *Journal of Dairy Science*, (94), pp.5183-5193.
- Bonizzi, I.; Buffoni, J.N., y Feligini, M., 2009. Quantification of bovine casein fractions by direct chromatographic analysis of milk. Approaching the application to a real production context. En: *Journal of Chromatography A*, 1216, pp.165-168.
- Devold, T. G., Brovold, M. J., Langsrud, T. y Vegarud, G. E., 2000. Size of native and heated casein micelles, content of protein and minerals in milk from Norwegian Red cattle Effect of milk protein polymorphism and different feeding regimens. En: *International Dairy Journal*, 10, pp.313-323.
- Escobar, D., Clark, S., Ganesan, V., Repiso, L., Waller, J. y Harte, F., 2011. High pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition

- and texture of queso fresco cheese. En: *Journal of Dairy Science*, 94, pp.1201-1210.
- Glantz, M., Devold, T. G., Vegarud, G. E., Lindmark Månsson, H., Stålhammar, H. y Paulsson, M., 2010. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. En: *Journal of Dairy Science*, 93, pp.1444-1451.
- Hnosko, J. M., 2007. *High hydrostatic pressure treatment reduces levels of Listeria innocuain queso fresco*. Washington: WSU.
- Huppertz, T., Fox, P. F., Kruif, K. G., y Kelly, A. L., 2006. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. En: *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, pp.593-598.
- Ikonen, T., Ahlfors, K., Kempe, R., Ojala, M., and Ruottinen, O., 1999. Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of non-coagulating milk in Finnish dairy cows. En: *Journal of Dairy Science*, 82, pp.205-214.
- International Dairy Federation, 1993. *Cheese yield and factors affecting its control*. IDF.
- International Organization for Standardization, 2004. ISO 1735 (IDF 5): *Cheese and processed cheese products - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2004. ISO 5534 (IDF 4): *Cheese and processed cheese - determination of the total solids content (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2010. ISO 1211 (IDF1): *Milk - Determination of fat content - Gravimetric method (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2010. ISO 6731 (IDF 21): *Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content (Reference method)*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization, 2012. ISO/TS 22113 (IDF/RM 204): *Milk and milk products - Determination of the titratable acidity of milk fat*. Ginebra: ISO.
- International Organization for Standardization 2001. ISO 8968 (IDF 20): *Milk - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl method, Part 2: Block-digestion method*. Ginebra: ISO.
- Kamleh, R., Tannous, R. y El Maydaa, E., 2006. Cows milk quality in two regions in Lebanon and its effect on Baladi (local)cheese quality. En: *Journal of Food Agric. & Environment*, 4(2), pp.75-77.
- Kruif, C.F., Huppertz, T., Urban, V.S., y Petukhov, A.V., 2012. Casein micelles and their internal structure. En: *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172, pp.36-52.
- Marino, P., Considine, T., Sevi, A., McSweeney, P.L.H., y Kelly, A.L., 2004. Contribution of proteolytic activity associated with somatic cells in milk to cheese ripening. En: *International Dairy Journal*, 15, pp.1026-1033.
- Martin, B., Coulon, J.B., Chamba, J.F., y Bugaud, C., 1997. Effect of milk urea content on characteristics of matured Reblochon cheeses. En: *Lait*, 77, pp.505-514.
- Mazal, G., Vianna, P. C. B., Santos, M. V., y Gigante, M. L., 2007. Effect of somatic cell count on prato cheese composition. En: *Journal of Dairy Science*, 90, pp.630-636.
- McSweeney, P. L. H., 2007. *Cheese problems solved*. Abington: Woodhead Publishing Limited.
- Moharrery, A., 2004. Investigation of different levels of RDP in the rations of lactating cows and their effects on MUN, BUN and urinary N excretion. En: *Italian Journal of Animal Science*, 3(2), pp.157-165.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., 1998. Genetic polymorphism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. En: *Canadian Journal of Animal Science*, 78, pp.131-147.
- Ozymek, L. y Kennelly, J., 1993. The effect of seasonal and regional variation in milk composition on potential cheese yield. En: International Dairy Federation. *Proceedings of the IDF seminar on cheese yield and factors affecting its control*. Brussels: IDF. (Special Issue No. 9402), pp.95-100.
- Sandra, S., Stanford, M. A., y Goddik, L. M., 2004. The use of highpressure processing in the production of Queso Fresco cheese. En: *Journal of Food Science*, 69, pp.153-158.
- Santos, M.V. y Barbano, D.M., 2003. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. En: *Journal of Dairy Science*, 86, pp.2491-2503.
- St-Gelais, D. y Hache, S., 2005. Effect of b-casein concentration in cheese milk on rennet coagulation properties, cheese composition and cheese ripening. En: *Food Research International*, 38, pp.523-531.
- Uruguay XXI, 2012. *Informe de comercio exterior* [En línea]. Montevideo: Uruguay XXI. [Consulta: abril de 2014]. Disponible en: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/wp-content/uploads/2011/11/Informe-de-Comercio-Exterior-de-Uruguay-FINAL-A%C3%B1o-2012.pdf>.
- Vianna, P. C. B., Mazal, G., Santos M. V., A. Bolini, H. M. y Gigante, M. L., 2008. Microbial and sensory changes throughout the ripening of prato cheese made from milk with different levels of somatic cells. En: *Journal of Dairy Science*, 91, pp.1743-1750.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M. y Geurts, T.J., 2006. *Dairy science and technology*. 2da. ed. New York: Taylor & Francis.
- Wedholm, A., Larsen, L. B., Lindmark-Mansson, H., Karlsson, A. H. and Andrén, A., 2006. Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. En: *Journal of Dairy Science*, 89, pp.3296-3305.

Percepción del consumidor sobre los tipos de carne picada que se comercializan en Montevideo

Consumer's perception of different types of ground meat sold in Montevideo

Raggio, Laura ⁽¹⁾, Gámbaro, Adriana ⁽²⁾, Pagano, Teresa ⁽¹⁾, Montesano, Ana ⁽¹⁾, Garmendia, Juan ⁽¹⁾.

⁽¹⁾Departamento de Alimentos, Escuela de Nutrición, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay

⁽²⁾Sección Evaluación Sensorial, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: agambaro@fq.edu.uy

RECIBIDO: 30/05/2014 – APROBADO: 28/09/2014

Resumen

La técnica de asociación de palabras fue utilizada para realizar un estudio preliminar de la percepción sobre los tipos de carnes picadas comercializadas en Montevideo. 60 consumidores recibieron cinco tarjetas con las palabras: Carne Picada Común, Magra, Premium, de Ternera y Especial y se les solicitó que escribieran las cuatro primeras imágenes, asociaciones, pensamientos o sentimientos que vinieran a su mente al leer cada tarjeta. Posteriormente, evaluaron cuán saludable consideraban que era cada tipo de carne picada. Las respuestas fueron agrupadas en 16 categorías. La Carne Picada Común fue percibida como un alimento con alto contenido de grasa y evaluada como poco saludable. Las carnes picadas Magra y Premium fueron percibidas como productos con bajo contenido graso, nutritivas, saludables y de precio elevado. La tipo Premium fue considerada, además, como un producto de calidad. La carne picada de Ternera fue percibida principalmente como un producto con una textura tierna, suave y blanda, mientras que en la carne picada Especial se encontraron contradicciones en las palabras utilizadas por los consumidores para su descripción (cara-económica, con poca grasa-con mucha grasa). Por medio de esta técnica se identificaron los atributos más relevantes en el proceso de selección y toma de decisiones de compra de este tipo de producto.

Palabras clave: Estudios con consumidores, carne picada, asociación de palabras.

Abstract

The word association technique was used to perform a preliminary study of consumer's perception of ground meat sold in Montevideo. A total of 60 consumers were presented with five cards with the words: Regular Ground Meat, Lean, Premium, Veal and Special and were asked to write the first four images, associations, thoughts or feelings that came to mind with each card. Afterwards, the participants assessed how healthy they considered each type of ground meat to be. The answers were grouped in 16 categories. Regular Ground Meat was perceived as a food product with high fat content, and assessed as not very healthy. Lean and Premium ground meats were perceived as having low fat content, being nutritious, healthy and expensive. The Premium ground meat was also considered a high quality product. Lean ground meat was perceived mainly as tender, soft and mushy, while for the Special ground meat contradictions in the choice of words were found (expensive-inexpensive, low fat-high fat). Through this technique the most relevant attributes in the selection process and decision making process were identified.

Keywords: Consumer studies, ground meat, word association.

Introducción

Para el consumidor, un producto o servicio es más que la suma de sus atributos, implica también un componente emocional y un significado simbólico (McDonagh, et al., 2002). Las técnicas o pruebas proyectivas permiten una condición de libre interpretación y respuesta ante un estímulo ambiguo, buscando entender las motivaciones, sentimientos, creencias, actitudes y las razones profundas para seleccionar alternativas

de respuestas dentro de un tópico específico (Donoghue, 2000; Vidal, et al., 2013). Si bien las técnicas proyectivas se crean y tienen aplicación en el ámbito psicológico, a partir de 1940 se empezaron a utilizar en los estudios de la conducta del consumidor e investigación de mercado. A partir de esta fecha las técnicas proyectivas hacen un aporte complementario a la información cuantitativa y se utilizan para entender el porqué de las percepciones, sentimientos y motivaciones de los consumidores; buscando el acceso a información que

ellos almacenan en niveles más profundos y no conscientes, niveles a los cuales se puede acceder de una forma espontánea e incluso afectiva (Donoghue, 2000; Guerrero, et al., 2010), y permitiendo revelar información inaccesible que no está disponible cuando se trabaja con medios convencionales, directos y explícitos (Greenwald, et al., 1995).

En la literatura, las técnicas proyectivas aparecen clasificadas o subdivididas en cinco categorías (Vidal, et al., 2013; Catterall, 2000; Upadhyaya, 2012): técnicas de completar, técnicas de construcción, técnicas de ordenamiento, técnicas expresivas y técnicas de asociación. Dentro de esta última categoría se encuentra la técnica de asociación de palabras, según la cual se solicita que de una lista de palabras o frases se escriba lo que viene a la mente de la persona entrevistada, ya sean palabras, imágenes o pensamientos (Vidal, et al., 2013; Steinmann, 2009; Donoghue, 2000). De esta manera se asocia el estímulo presentado con la información dada.

Para los productos alimenticios, se considera que las primeras asociaciones que vienen a la mente de los consumidores son las más relevantes en el proceso de selección y la toma de decisiones de la compra de los productos alimenticios (Roininen, et al., 2006). La técnica de asociación de palabras ha sido aplicada recientemente para conocer la percepción de diversos alimentos como yogures (Ares, et al., 2008), alimentos tradicionales (Guerrero, et al., 2010), aceites (Gámbaro, et al., 2011), chocolate (Gámbaro y Ellis, 2012), ensaladas (Vidal, et al., 2013) y queso de cabra (Vieitez, et al., 2014), entre otros.

La carne picada es un producto de consumo popular para la población uruguaya, y se ha convertido en un componente cada vez más utilizado debido a su versatilidad como ingrediente. En Montevideo, el consumo aparente de carne picada común es 5 gramos/persona/día, mientras que el de carne picada especial o magra es de 15 gramos/persona/día. Los hogares de mayores ingresos adquieren la picada especial o magra y los de menores ingresos la carne picada común (Bove y Cerruti, 2008).

En el año 2010, el Instituto Nacional de Carnes (INAC) publicó un estudio sobre las preferencias de cortes en el que se observó que la carne picada pasó del tercer lugar de preferencia en 2005 al primer lugar en 2010 en las cuatro zonas en las que se dividió el país (INAC, 2010). El Decreto del Poder Ejecutivo 215/006 del 3 de julio de 2006 (Uruguay, 2006) reglamentó la composición y elaboración de la carne picada en Uruguay, nombrando tres tipos de carne picada que se pueden comercializar en el ámbito nacional: carnes picadas comunes, magras y extra magras. Solamente está reglamentado el contenido máximo de grasa total que debe tener la carne picada en forma genérica (20%). En caso de que el comercio expendedor ofrezca para la venta carnes picadas magras o extra magras, deberá especificar el porcentaje de grasa total que contiene, no habiendo en la legislación límites superiores para los mismos.

A pesar de esta normativa, se encuentran en los comercios de Montevideo una disparidad de nombres con los que la carne picada se comercializa: Común, Magra, Especial, Super, Premium, Super especial, de Ternera, etcétera. Por ese motivo, el objetivo de este trabajo fue utilizar la técnica de asociación de palabras para realizar un estudio preliminar sobre la percepción de un grupo de consumidores uruguayos frente a los diferentes nombres con los que se comercializa la carne picada en los supermercados y carnicerías de la ciudad de Montevideo.

Materiales y Métodos

Participantes

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Montevideo, utilizando una muestra de conveniencia de 60 consumidores esporádicos y habituales de carne picada, reclutados en diversos lugares públicos (Mercado Agrícola de Montevideo, Facultad de Química y Hospital de Clínicas). La muestra se considera de conveniencia dado que los sujetos de la investigación fueron seleccionados para el estudio en función de la facilidad para el reclutamiento y de su interés en participar y no considerando las características que los hacen representativos de la población.

Procedimiento

Los tipos de carne picada seleccionados para este trabajo fueron los que se encontraron con mayor frecuencia en las principales cadenas de supermercados y carnicerías (Común, Magra, Premium, de Ternera y Especial). No se utilizaron todos los nombres de los tipos de carne picada que se encuentran en el mercado en este estudio por considerar que podía resultar agotador para el encuestado. Para obtener las asociaciones de palabras, se presentaron a los consumidores cinco tarjetas con las palabras: Carne Picada Común, Carne Picada Magra, Carne Picada Premium, Carne Picada de Ternera y Carne Picada Especial.

Las tarjetas fueron presentadas en orden aleatorio, diferente para cada consumidor. Se les solicitó que escribieran las cuatro primeras imágenes, asociaciones, pensamientos o sentimientos que vinieran a su mente al leer cada tarjeta.

Posteriormente, se les solicitó a los participantes evaluar cuán saludable consideraban que era cada tipo de carne picada, utilizando una escala de 9 puntos, con descripciones verbales en los extremos (1 = nada saludable a 9 = muy saludable) (Ares y Gámbaro, 2007). La frecuencia de consumo de carne picada se evaluó con una escala de 9 puntos con descripciones verbales en los extremos (1 = nunca a 9 = todos los días) (Gámbaro, et al., 2013). Al final, los participantes respondieron una pequeña encuesta donde se relevaron sus datos personales, los lugares de compra de carne picada y los tipos de carne picada que habitualmente compran.

Análisis de datos

Sobre los datos de cuán saludable consideraban cada tipo de carne picada se realizó un análisis de varianza y test de Tukey para determinar diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Las palabras asociadas a cada tipo de carne picada fueron analizadas cualitativamente. Se realizó un análisis inicial de los términos recurrentes, agrupando los términos con significado similar en categorías. El procedimiento se basó en la interpretación personal de los investigadores del significado de las palabras. El análisis se llevó a cabo de forma individual por dos de los investigadores y los resultados obtenidos fueron posteriormente discutidos en detalle entre todos los integrantes del equipo de investigación. Las categorías definitivas y su nombre fueron finalmente acordadas por consenso. La frecuencia de mención para cada categoría se determinó contando el número de participantes que utilizaron palabras similares para describir los conceptos incluidos dentro de

cada categoría. Si el participante utilizaba más de una palabra dentro de la misma categoría, se consideraba como una sola mención. Por ejemplo, en la categoría «Alimentos», un mismo consumidor podría llegar a mencionar distintos tipos de alimentos (hamburguesas, tucos, etcétera), pero solo se consideró una mención en la categoría «Alimentos» para el cálculo de la frecuencia de mención. Una vez calculadas las frecuencias de mención, solo se consideraron las categorías mencionadas por más del 10% de los encuestados.

Para detectar diferencias en la percepción de cada tipo de carne picada, se realizó la prueba Q de Cochran para cada una de las categorías consideradas. La prueba Q de Cochran es una prueba estadística no paramétrica utilizada en el análisis de diseños de bloques al azar de dos vías para determinar si los tratamientos tienen efectos idénticos cuando la variable de respuesta es binaria.

Posteriormente se realizó un Análisis de Correspondencia para observar gráficamente la relación entre los tipos de carne picada y las categorías de palabras. El Análisis de Correspondencia es una técnica descriptiva/exploratoria diseñada para analizar tablas de contingencia de dos vías que muestran un cierto grado de correspondencia entre filas y columnas (Greenacre, 2010).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software XL-Stat 2012 (Addinsoft, NY).

Resultados

La muestra estuvo compuesta por un 78% de mujeres y 22% de hombres, y por un 49% de egresados universitarios, 36% de estudiantes de educación terciaria y 15% de individuos con menor nivel de estudios. La edad de los participantes estuvo comprendida entre 25 y 75 años (promedio 43 ± 13 años). Al ser una muestra de conveniencia, mostró un sesgo hacia las mujeres y hacia los individuos con mayor nivel de estudios, ya que son los grupos de consumidores más afines a contestar encuestas.

La frecuencia de consumo promedio de carne picada de la población encuestada fue de 4,0 (en escala de 9 puntos), con un 44,1% de consumo bajo (puntajes 1 a 3), un 47,5% de consumo medio (puntajes 4 a 6) y un 8,5% de consumo alto (puntajes 7 a 9). En cuanto al lugar de compra, el 77% compra la carne picada en los supermercados y el 23% en carnicerías.

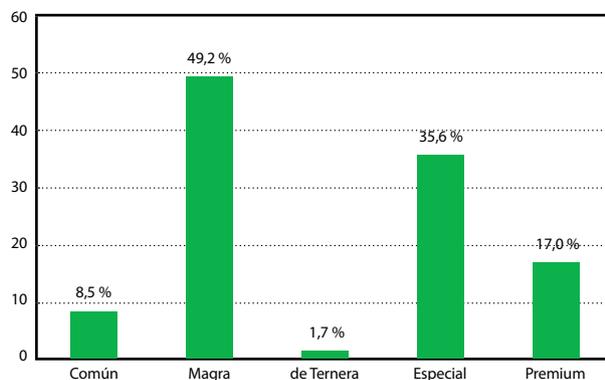


Gráfico 1. Porcentaje de los consumidores encuestados que consumen habitualmente cada tipo de carne picada.

En el Gráfico 1 se muestra el porcentaje de los consumidores encuestados que consumen habitualmente cada tipo de carne picada; la carne picada Magra y la Especial son las más consumidas.

De acuerdo al análisis de varianza realizado, se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0,0001$) en la percepción de cuán saludable es cada tipo de carne picada, como se observa en la Tabla 1. Las carnes picadas Premium y Magra fueron consideradas como las más saludables de todas. En segundo lugar aparecen las carnes picadas de Ternera y Especial, mientras que la Común fue percibida como muy poco saludable.

Tipo de carne picada	Percepción de saludable (escala de 9 puntos)
Premium	7,1 ^a
Magra	6,8 ^a
de Ternera	6,0 ^b
Especial	5,5 ^b
Común	3,8 ^c

Tabla 1. Puntajes promedio de cuán saludable es percibido cada tipo de carne picada. Letras diferentes implican diferencia significativa según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Asociación de palabras

Todos los participantes fueron capaces de proporcionar tres o cuatro asociaciones diferentes para cada tipo de carne picada. Las palabras fueron agrupadas en un número final de las siguientes 20 categorías: alimentos, agrado, apariencia, animal, calidad, cocción, consumo, conocimiento, equipamiento, dieta, desagrado, grasa, lugar de compra, ocasión, origen, olor, precio, sabor, salud y textura. De esas 20 categorías iniciales se eliminaron cuatro (conocimiento, equipamiento, origen y olor) que no alcanzaron un mínimo de un 10% de menciones en por lo menos uno de los tipos de carne picada.

En las Tablas 2 y 3 se observan las categorías resultantes, el porcentaje de menciones dentro de cada categoría y ejemplos de las palabras utilizadas por los participantes.

Según la prueba Q de Cochran, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en 11 de las 16 categorías mencionadas por más del 10% de los participantes. El número mayor de menciones que recibieron los tipos de carne picada fueron relacionadas con los alimentos que la incluyen como ingrediente, con 131 menciones totales, seguida de la categoría grasa, con 105 menciones, y precio, con 93 menciones.

La carne picada Común fue percibida principalmente en relación con los *alimentos* que la incluyen como ingrediente (empanadas, pastel de carne, hamburguesas, tucos). Más de un 30% de los consumidores hicieron mención a un alto contenido de grasa (grasosa, con grasa), mientras que las demás categorías recibieron un número más bajo de menciones.

La carne picada Magra fue percibida por más del 50% de los consumidores como un producto de bajo contenido *graso* (poca grasa, sin grasa) y por más del 47% de los consumidores como un producto nutritivo, saludable y sano. Más del 30%

Categoría	Común	Magra	Premium	De Ternera	Especial	P (Q de Cochran)
Alimentos ***	83,1	37,3	28,8	28,8	44,1	<0,0001
Agrado ns	13,6	22,0	8,5	13,6	6,8	0,094
Apariencia ns	23,7	20,3	27,1	23,7	25,4	0,885
Animal ***	6,8	0,0	3,4	18,6	3,4	0,0002
Calidad ***	11,9	16,9	47,5	13,6	25,4	<0,0001
Cocción *	0,0	10,2	3,4	1,7	3,4	0,027
Consumo *	0,0	8,5	8,5	11,9	10,2	0,029
Dieta ***	0,0	16,9	0,0	0,0	0,0	<0,0001
Desagrado ns	16,9	11,9	10,2	10,2	22,0	0,163
Grasa **	32,2	50,8	37,3	16,9	40,7	0,001
Lugar de compra ns	20,3	13,6	22,0	11,9	16,9	0,335
Ocasión *	11,9	5,1	1,7	1,7	5,1	0,048
Precio ***	13,6	32,5	50,8	18,6	42,4	<0,0001
Sabor ns	6,8	5,1	8,5	11,9	8,5	0,709
Salud ***	0,0	47,5	25,4	11,9	8,5	<0,0001
Textura ***	1,7	3,4	3,4	44,1	5,1	<0,0001

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, ns: Diferencia no significativa ($P > 0,05$) según la prueba Q de Cochran.

Tabla 2. Frecuencia (%) de mención de cada categoría seleccionada.

de los consumidores hicieron mención al precio (cara, muy cara) y a los alimentos que la incluyen como ingrediente (canelones, empanadas, hamburguesas, pastel de carne, zapallitos rellenos).

Cerca del 50% de los consumidores percibieron la carne picada Premium como un producto de calidad (de exportación, excelente) y de precio elevado. Más del 37% de los consumidores hicieron mención al contenido de grasa, percibiéndolo como un producto sin grasa o con menos grasa.

La carne picada de Ternera fue percibida principalmente como un producto con una textura tierna, suave y blanda. Se destaca también un número mayor de menciones en la categoría animal que en el resto de los tipos de carne picada, relacionadas con el propio nombre del producto. La carne picada Especial fue percibida mayormente en relación a su precio y contenido de grasa.

Estas relaciones entre los tipos de carne picada y las categorías obtenidas de la técnica Asociación de Palabras se reflejan en los resultados del Análisis de Correspondencia (Gráfico 2). Las dos primeras dimensiones explicaron el 79,8%

de la variabilidad de los datos experimentales. El factor 1 explicó el 44,5% y el factor 2 el 31,8% de la varianza.

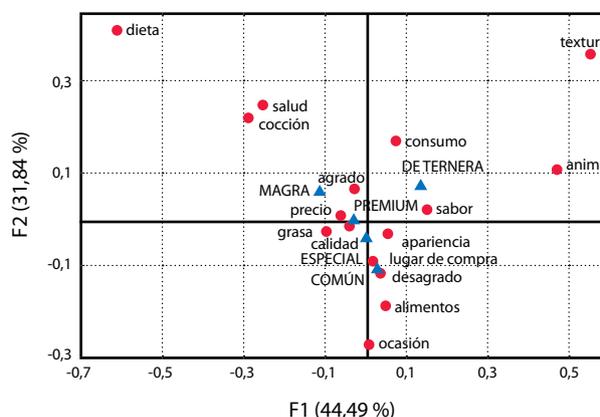


Gráfico 2. Análisis de Correspondencia para visualizar las asociaciones entre las categorías y los distintos tipos de carne picada.

Categoría	Común	Magra	Premium	De Ternera	Especial
Alimentos	Empanadas, pastel de carne, hamburguesas, tucos	Canelones, empanadas, hamburguesas, pastel de carne, zapallitos rellenos	Comidas especiales, empanadas, hamburguesas, pan de carne	Albóndigas, pan de carne, guiso, hamburguesas	Canelones, tuco, empanadas, hamburguesas
Agrado	Rica	Rica, me gusta	Buena, me gusta, la mejor	Rica, apetitosa, me gusta	Rica
Apariencia	Roja	Roja, más roja	Roja, rojo intenso	Roja, rojo claro	Roja, no tan roja
Animal	Vaca	----	Vaca	Vaca joven, ternera	Vaca, novillo
Calidad	Calidad	Calidad, fresca, buen corte, seleccionada	Exportación, calidad, excelente	Calidad, fresca, natural	Calidad, seleccionada
Cocción	----	Se apelocona, se reduce	----	Rinde más	Reduce mucho
Consumo	----	No la consumo, no la compro	No compro, no consumo	No consumo, nunca usé	No consumo, no compro
Dieta	----	Baja en calorías, alimento dietético, engorda menos	----	----	----
Desagrado	Desconfianza, rechazo, no me gusta	No me gusta, no me agrada	Desagrado, invento para dieta, engaño	Engaño, no me gusta	Engaño, no me gusta, comida de animal
Grasa	Grasa, grasosa	Sin grasa, poca grasa, casi sin grasa	Sin grasa, menos grasa	Poca grasa, grasosa, más grasa	Grasa, menos grasa, más grasa
Lugar de compra	Carnicería, supermercado	Carnicería, supermercado	Carnicería, supermercado	Carnicería, supermercado	Carnicería, supermercado
Ocasión	Almuerzo	Reunión, cena, familia	Restaurante	Almuerzo	Familia, reunión
Precio	Barata, económica	Cara, muy cara	Cara, más cara	Cara, costosa	Cara, barata, económica, accesible
Sabor	Sabrosa	Desabrida, sosa	Sabrosa, buen sabor	Sabrosa, gustosa	Sabrosa
Salud	----	Nutritiva, saludable, sana	Saludable, sana	Saludable, nutritiva	Saludable
Textura	Fibrosa	Seca	Tierna	Tierna, suave, blanda	Jugosa, suave

Tabla 3. Ejemplos de asociaciones individuales dentro de cada categoría.

Discusión

Los participantes del estudio mostraron una frecuencia de consumo de carne picada entre media y baja. La carne picada Magra y la Especial son los dos tipos más consumidos habitualmente. El alto consumo de carne picada Magra podría estar vinculado a las características de la población estudiada, con un alto porcentaje de mujeres e individuos con alto nivel

de estudios, quienes podrían tender a consumir productos con menor contenido de grasa, lo cual coincide con lo reportado por Bove y Cerruti (2008). Los resultados sobre cuán saludable se percibe cada tipo de carne picada pueden sugerir que el principal motivo de compra de la carne picada Magra es la salud, mientras que en la carne picada Especial pueden influir otros factores. Si bien la carne picada Premium fue también considerada como muy saludable, no fue de las más

consumidas por la población encuestada; en este tipo de carne picada pueden también influir otros factores que expliquen su frecuencia de consumo, por ejemplo que no se encuentre para la venta en todos los establecimientos comerciales.

Los resultados del análisis de los datos obtenidos con la técnica de asociación de palabras indican que los entrevistados percibieron en forma diferente cada tipo de carne picada. Las categorías alimentos, grasa y precio fueron las que recibieron mayor número de menciones, lo que indica la importancia que le da el consumidor encuestado a estos atributos, y son las asociaciones que vienen a su mente más frecuentemente con los distintos tipos de carne picada. La frecuencia de mención se ha asociado con la importancia con que un concepto en particular se encuentra en la mente de los encuestados (Guerrero, et al., 2010). A su vez, las categorías conocimiento, equipamiento, origen y olor no alcanzaron el mínimo del 10% de menciones en ninguno de los tipos de carne picada estudiados, lo cual además está indicando que estas asociaciones no están presentes en la mente del consumidor a la hora de comprar o consumir este producto.

Que la carne picada Común fuera percibida por más del 30% de los consumidores como un producto con alto contenido de grasa (grasosa, con grasa) puede explicar que haya sido el tipo de carne considerado como el menos saludable. Sin embargo, no recibió menciones dentro de la categoría saludable (ni positivas ni negativas), a diferencia de los demás tipos de carne picada que fueron consideradas saludables, sanas y nutritivas. Esto implica que en la mente del consumidor uruguayo no es relevante la salud a la hora de comprar la carne picada Común, aunque cuando se le pregunta directamente, la considera como poco saludable.

El elevado puntaje asignado respecto a cuán saludable consideran la carne picada Magra (Tabla 1) podría explicarse por el alto número de consumidores que la percibe como un producto de bajo contenido graso (poca grasa, sin grasa) y nutritivo. Aunque también se hizo mención al precio (cara, muy cara), fue la carne picada más consumida (Gráfico 1) por la población encuestada, lo que podría indicar que el concepto de salud prevalece a la hora de comprar este tipo de producto.

En el caso de la carne picada Premium, que un alto número de consumidores la percibieran como un producto sin grasa o con menos grasa, explica que haya sido considerado como muy saludable (Tabla 1). Comparando la percepción de la carne picada Premium con la Magra se observa en la primera un menor número de menciones respecto a su bajo contenido de grasa y un número menor de menciones en la categoría salud; el consumidor la percibe principalmente como un producto caro y de alta calidad. Es decir, en la mente del consumidor uruguayo el concepto de salud relacionado con la carne picada Premium es menos relevante que en el caso de la carne picada Magra, aunque cuando se le pregunta directamente la considera como muy saludable. Esto podría también explicar el menor consumo de este tipo de carne picada entre la población encuestada. Las demás asociaciones realizadas por los consumidores con la carne picada Premium no permiten explicar la percepción de la misma como un producto de alta calidad, por lo que esta percepción podría estar vinculada exclusivamente al nombre que lleva.

La carne picada de Ternera fue percibida principalmente como un producto con una *textura* adecuada, relacionada con el animal que da origen al nombre del producto, pero no aparecen menciones en un número importante en otras categorías. Este tipo de carne fue la menos consumida por la población

encuestada (solamente un 1,7% la consumen habitualmente), lo que podría llevar a que no está presente en la mente del consumidor y por esto recibió un menor número de menciones que el resto de los tipos de carnes picadas del estudio.

En el caso de la carne picada Especial se observan contradicciones en las palabras utilizadas por los consumidores dentro de las dos categorías más mencionadas (precio y contenido de grasa), ya que algunos participantes la consideraron como un producto caro y con poca grasa, mientras que otros la consideraron como un producto económico, accesible y con mucha grasa. Esto demuestra que existe una variabilidad en las carnes picadas comercializadas con el nombre «especial», lo cual lleva a que el consumidor no tenga una percepción definida sobre este producto.

En el Gráfico 2 se puede observar cómo los distintos tipos de carne picada se encuentran relacionados con las distintas categorías de la técnica de asociación de palabras. El factor 1 estuvo positivamente correlacionado con los términos textura y animal y negativamente correlacionado con los términos dieta, salud y cocción, permitiendo la diferenciación principalmente de la carne picada Magra de la de Ternera. El factor 2 correlacionó positivamente con los términos dieta, salud, cocción, textura y consumo, y negativamente con los términos alimentos y ocasión, permitiendo diferenciar las carnes picadas Magras, Premium y de Ternera de la Común.

Conclusiones

Por medio de la técnica de asociación de palabras se evaluó la percepción de los consumidores de diferentes tipos de carnes picadas, lo cual permitió identificar los atributos que son más relevantes en el proceso de selección y la toma de decisiones de la compra. Este trabajo debería ser complementado con un estudio con un mayor número de consumidores y más representativo de la población de Montevideo, y con un análisis del contenido graso y de otros factores de calidad de los distintos tipos de carnes picadas que se comercializan en nuestro mercado que permita investigar cuán real es la percepción que el consumidor tiene sobre estos productos.

Referencias

- Ares, G., Gámbaro, A., 2007. Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. En: *Appetite*, 49(1), pp.148-158.
- Ares, G., Giménez, A., Gámbaro, A., 2008. Understanding consumers' perception of conventional and functional yogurts using word association and hard laddering. En: *Food Quality and Preference*, 19, pp.636-643.
- Bove, I., Cerruti, F., 2008. *Los alimentos y bebidas en los hogares: ¿Un factor de protección o de riesgo para la salud y el bienestar de los uruguayos? Encuesta Nacional de Gasto e Ingresos de los Hogares 2005-2006*. Montevideo: Instituto Nacional de Estadística.
- Catterall, M., Ibbotson, P., 2000. Using projective techniques in education research. En: *British Educational Research Journal*, 26(2), pp.245-256.
- Donoghue, S., 2000. Projective techniques in consumer research. En: *Journal of Family Ecology and Consumer Sciences*, (28), pp.47-53.

- Gámbaro, A., Dauber, C., Ares, G., Ellis, A.C., 2011. Studying Uruguayan consumers' perception of vegetables oils using Word Association. En: *Brazilian Journal of Food Technology*, Special Issue 2011, pp.131-139.
- Gámbaro, A., Ellis, A.C., 2012. *Exploring consumer perceptions about the different types of chocolate*. En: *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(4), pp.317-324.
- Gámbaro, A., Ellis, A.C., Prieto, V., 2013. Influence of subjective knowledge, objective knowledge and health consciousness on olive oil consumption — a case study. En: *Food and Nutrition Science*, (4), pp.445-453.
- Greenacre, M., 2010. Correspondence analysis. En: *International Encyclopedia of Education*. 3ra. ed. New York: Elsevier. ISBN: 978-0-08-044893-0.
- Greenwald, A. G., Banaji, M. R., 1995. Implicit social cognition: Attitudes, self-esteem, and stereotypes. En: *Journal of Personality and Social Psychology*, (102), pp.4-27.
- Guerrero, L., Claret, A., Verbeke, W., Enderli, G., Zakowska-Biemans, S., Vanhonacker, F., Issanchou, S., Sajdakowska, M., Granli, B.S., Scalvedi, L., Contel, M., Hersleth, M., 2010. Perception of traditional food products in six European regions using free word association. En: *Food Quality and Preferences*, (21), pp.225-233.
- INAC, 2010. *Conociendo las preferencias del consumo de carnes en Uruguay* [En línea]. Montevideo: INAC. [Consulta: 05/05/2014]. Disponible en: http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/7365/1/conociendo_las_preferencias_de_consumo.pdf
- McDonagh, D., Bruseberg, A., Haslam, C., 2002. Visual product evaluation: exploring users' emotional relationships with products. En: *Applied Ergonomics*, (33), pp.231-240.
- Roininen, K., Arvola, A., Lähteenmäki, L., 2006. Exploring consumer' perceptions of local food with two different qualitative techniques: Laddering and word association. En: *Food Quality and Preference*, (17), pp.20-30.
- Steinmann, R. B., 2009. Projective techniques in consumer research. En: *International Bulletin of Business Administration*, (5), pp.37-45.
- Upadhyaya, M., 2012. Projective Techniques for Brand Image Dimensionality and using various techniques to Investigate and Improve the Brand Personality. En: *Polish Journal of Management Studies*, 6, pp.89-100.
- Uruguay. Decreto 215/006, del 3 de Julio de 2006. *Diario Oficial*, 7 de julio de 2006, p.20.
- Vidal, L., Gastón, A., Giménez, A., 2013. Projective techniques to uncover consumer perception: Application of three methodologies to ready-to-eat salads. En: *Food Quality and Preferences*, 28, pp.1-7.
- Vieitez, I., Gámbaro, A., Callejas, N., Miraballes, M., Irigaray, B., 2014. Consumer perception about goat cheese using Word Association technique. En: *Journal of Food Science and Engineering*, En prensa.

Potencial tecnológico de harina de plátano verde con cáscara (*Musa AAB*) como sustituto de grasa para geles cárnicos

Technological use of green banana flour with shell (*Musa AAB*) as a fat substitute for meat models

Araya-Quesada, Yorlenny ⁽¹⁾, Morales-Torres, Alejandra ⁽¹⁾, Vargas-Aguilar, Pedro ⁽¹⁾, Wexler, Lea ⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Universidad de Costa Rica, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Escuela de Tecnología de Alimentos, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

Contacto: yorlenny.araya@ucr.ac.cr

RECIBIDO: 27/05/2014 - APROBADO: 31/10/2014

Resumen

Se evaluó harina de plátano verde con cáscara (*Musa AAB* Horn Plantain Cv. Harto) como sustituto de grasa para productos cárnicos. El producto se obtuvo mediante secado con aire a 70 °C y se realizó una molienda para obtener harina con dos tamaños de partícula (HF, HG). A esta se le determinó la composición proximal, capacidad de absorción de agua (WHC), solubilidad (S), hinchamiento (SW) y capacidad de absorción de grasa (FAC). Se elaboraron modelos de emulsiones cárnicas con 2, 4 y 6% de harina a los cuales se les midió el pH, rendimiento de cocción, capacidad de retención de agua, perfil de textura y color. No se encontraron diferencias significativas para proteína, grasa, cenizas, almidón, pH, color, WHC, S, SW y FAC entre las harinas. En los geles se determinaron diferencias significativas en el rendimiento de cocción, capacidad de retención de agua, dureza, gomosidad, masticabilidad y color; pero no en pH, adhesividad, elasticidad y cohesión. Se determinó un descenso en los parámetros de color L*, b* y C* al aumentar el grado de sustitución en las formulaciones. Se recomienda utilizar 4% de harina, lo cual representa un 20% de disminución de grasa.

Palabras clave: Geles cárnicos modelo, capacidad de retención de agua, capacidad de retención de grasa, textura.

Abstract

Green banana flour with shell was evaluated as fat substitute for meat products. Unripe plantains were dried in a hot air dryer (70 °C) and milled by a hammer mill to obtain two flours with different mesh sizes (HF, HG). Proximal composition, water holding capacity (WHC), solubility (S), swelling (SW), and fat absorption capacity (FAC) were determined. 2%, 4% and 6% of HG and HF were added to a meat model emulsion as fat replacement. The effect of adding green banana flour was evaluated on cooking yield, water holding capacity, pH, hardness, gumminess, chewiness, adhesiveness, elasticity, cohesiveness and color. There were not significant differences between both flours for protein, fat, ashes, WHC, S, SW, and FAC. No significant differences were found for adhesiveness, elasticity, and cohesiveness. A drop in L*, b* and C* parameters regarding the control gel was determined with the increase of fat substitution. We recommend a substitution percentage equal or lower than 4%, which represents a 20% of fat reduction.

Keywords: Meat product model, water holding capacity, fat absorption capacity, texture.

Introducción

El plátano pertenece al género *Musa*; a la familia *Musaceae* y al orden de las zingiberáceas. Los biotipos cultivados se basan en los genomas AA para el grupo acuminata y BB para el grupo balbisiana, lo cual se reúne en los triploides AAA, AAB y ABB. Los plátanos AAB pertenecen al grupo paradisíaca, entre los cuales se encuentran el Dominico (French Plantain), el Curraré (Horn Plantain) y el Liberal (Murillo y Pacheco, 1994; Smith y Velásquez, 2004).

Los plátanos son uno de los principales alimentos básicos en África, América Latina, el Caribe y la India

(FAO, 2011). La producción mundial del plátano tiende a aumentar y es un fruto disponible todo el año en las regiones tropicales y subtropicales (Sarawong, et al., 2014). Shaibu et al. (2012) señalan que los bananos y plátanos representan el segundo fruto de mayor cosecha a nivel mundial con 129.906.098 toneladas métricas en 2010, y es el cuarto producto alimenticio en importancia a nivel mundial. En Costa Rica, según la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, SEPSA (2011), en los últimos años se ha dado un aumento en el área de producción del plátano, hasta alcanzar en 2010 un área sembrada de 10.000 hectáreas.

Los frutos verdes y maduros que no se comercializan en fresco pueden ser aprovechados para alimentación humana en la elaboración de chips, cremas, panes, tortas, helados, batidos, mermeladas, purés, productos lácteos como los yogures, bebidas sazonadas y alcohólicas, alimentos infantiles, salsas, producción de harina como fuente de fibra dietética, en la extracción de almidones nativos y la obtención de almidones modificados, y alimentos concentrados para la alimentación animal (González y Pacheco-Delahaye, 2006; González, et al., 2009; Mazzeo, et al., 2010). Además, estas harinas y almidones se utilizan para la elaboración de pastas alimenticias y productos de panificación (Mazzeo, et al., 2010).

El plátano presenta muchos beneficios para la salud debido a su composición de fibra dietética total (FDT), almidón total (AT), almidón disponible (AD) y almidón resistente (AR) y compuestos fenólicos cuando no ha madurado (González y Pacheco-Delahaye, 2006; Islas, et al., 2007; Sarawong, et al., 2014). Además, es rico en vitamina B6, vitamina C, calcio, hierro, magnesio, potasio y fósforo (Hernández, et al., 2009; Molina, 2001). Restrepo (2002) sugiere el uso del plátano como una sustancia de relleno en alimentos, debido a su capacidad retenedora de humedad, lo cual extiende el volumen de las formulaciones, abaratando costos de producción e incorporando propiedades funcionales. A su vez, González y Pacheco-Delahaye (2006) utilizan las propiedades de gelificación de la harina de plátano para elaborar geles de piña a partir de jugos clarificados.

Para determinar la posibilidad de uso de la harina de plátano en productos cárnicos, el uso de modelos resulta conveniente para definir el impacto de condiciones de proceso. Los modelos de emulsiones cárnicas son sistemas que se componen de los principales componentes del producto cárnico, en el que se sustituye una proporción de algún componente por algún ingrediente funcional, generalmente reemplazos de proteínas o grasas (Codex Alimentarius, 1989; Tokusoglu y Kemal, 2003).

El uso de geles modelo permite realizar investigaciones de una forma más económica, ya que se utilizan los componentes principales de la formulación a menor escala. Esta metodología ha sido aplicada por una gran variedad de investigadores para evaluar propiedades tecnológicas de sustancias como la κ -carragenina, la albúmina de huevo y la transglutaminasa (Pietrasik, 2003), y el efecto como ingrediente funcional de materias primas como la fibra de salvado de arroz (Choi, et al., 2011), la fibra de coliflor (Femenia, et al., 1997), la fibra de naranja (Bortoluzzi, et al., 2005) y las algas comestibles (López-López, et al., 2009).

Debido a la relación entre el consumo de grasa y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ha aumentado la necesidad de desarrollar productos con menos contenido de grasa. Para evitar cambios en las características sensoriales y químicas, y en consecuencia el rechazo del producto por parte del consumidor, se ha intentado sustituir la grasa por ingredientes no cárnicos o ligantes (Pinero, et al., 2008). Dado que el plátano y su cáscara son fuentes ricas en polisacáridos, el objetivo de este proyecto es evaluar el potencial tecnológico de dos harinas de plátano verde con cáscara, variedad curaré (*Musa AAB Horn Plantain Cv. Harto*) con diferentes tamaños de partícula, con el fin de determinar la factibilidad de utilizarla como sustituto de grasa en productos cárnicos mediante geles modelo con adición de 2%, 4% y 6% de las harinas.

Materiales y Métodos

Materia prima

Se utilizó plátano verde de 7 semanas de desarrollo fisiológico, proveniente del cantón de Matina en la provincia de Limón, Costa Rica.

Proceso de elaboración de la harina

Los plátanos se lavaron y se desinfectaron por inmersión en una disolución de ácido peracético a 80 mg/kg durante 5 minutos. Luego, se les eliminaron las puntas y seguidamente se trocearon en cubos con un tamaño de 1 cm de arista empleando una cortadora Hobart. Los trozos de plátano se secaron con aire caliente (The National Drying Machine Co., TY2-48397) a 70 °C y una velocidad de aire de 5,4 m/s hasta alcanzar una humedad de 2 - 3% (m/m). El plátano seco se procesó en un molino de martillos (Tainea S.A., TEW 21) con dos mallas de 0,33 y 0,63 pulgadas para obtener distintos tamaños de partícula, harina fina y gruesa, respectivamente. Producto de la molienda realizada el 67,48% de la harina fina HF presenta un tamaño de partícula inferior a 0,0555 mm, y en el caso de la harina gruesa HG el 68,87% presenta un diámetro de partícula superior a 0,0530 mm e inferior a 0,2105 mm. Ambas harinas se empacaron en bolsas de polietileno de alta densidad y se almacenaron a temperatura ambiente. Se hicieron tres repeticiones del proceso de la harina.

Caracterización de la harina de plátano

Composición proximal

La humedad se midió en una muestra de 5 g que se secó a 70 °C en estufa de vacío, adaptando el método 925.09 AOAC (1990c). El contenido de cenizas se determinó mediante la calcinación según el método 923.03 AOAC (1990b). La grasa se determinó con extractor de Soxhlet, siguiendo el método 920.85 de la AOAC (1990a). La cuantificación de proteína se realizó en forma indirecta por medio del contenido de nitrógeno total utilizando el método de Kjeldahl AOAC 920.152 (AOAC, 2005). El almidón se determinó enzimáticamente hidrolizando con amiloglucosidasa y se cuantificó espectrofotométricamente la concentración de glucosa (Mestres, et al., 1993). Se realizaron las mediciones por triplicado de cada una de las tres repeticiones.

Propiedades tecnológicas de la harina

Capacidad de retención de agua (WHC)

Se modificó la metodología descrita por Femenia et al. (1997); 2,5 g de harina se suspendieron en 50 mL de disolución buffer de fosfatos de 1 mol/L a pH 6,3 y se dejó en reposo por 24 horas. Luego se centrifugaron 4,5 minutos a 6000 rpm; los residuos sólidos recuperados por filtración se colocaron en cápsulas de porcelana a masa constante y se secaron en estufa de vacío a 70 °C hasta obtener masa constante. La WHC se calculó con las expresiones (Femenia, et al., 1997):

$$WHC = \frac{(m_{\text{cápsula+muestra}} - m_{\text{cápsula+residuo}})}{(m_{\text{cápsula+residuo}} - k)}$$

Donde, $a = (m_{\text{cápsula+muestra}} - m_{\text{cápsula+residuo}})$,
 $a = 2,8 \times 10^{-2} \text{ g PO}^{-4}/\text{mL}$

Solubilidad (S)

La solubilidad se midió por triplicado en conjunto con la capacidad de retención de agua, y se expresó como porcentaje de pérdida en el peso de la muestra original en seco (corregida por la presencia del buffer de fosfato) después de la recuperación de material insoluble utilizado para determinar la WHC (Femenia, et al., 1997). Se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Solubilidad} = m_{\text{muestra}} - \frac{(m_{\text{residuo}} - k)}{m_{\text{muestra}}}$$

Donde, $k = a (m_{\text{cápsula+muestra}} - m_{\text{cápsula+residuo}})$,
 $a = 2,8 \times 10^{-2} \text{ g PO}^{-4}/\text{mL}$

Hinchamiento (SW)

Se hidrataron, por triplicado, 0,5 g de muestra con 10 mL de buffer de fosfatos en una probeta y se dejó reposar durante 24 h. Se determinó el volumen de harina que se hidrató con el buffer y el resultado se expresa como mL de residuo/g muestra seca (Femenia, et al., 1997).

Capacidad de absorción de grasa (FAC)

Se midió gravimétricamente utilizando el método modificado descrito por Femenia et al. (1997), para lo cual se mezcló por triplicado muestras de 5 g de la harina con 30 mL de aceite de girasol y se dejó en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 3,5 minutos a 6000 rpm, se decantó el líquido sobrenadante y la FAC se expresó como g aceite/g muestra seca.

Propiedades de los geles cárnicos

Proceso de elaboración de los geles modelo

La formulación del gel modelo se obtuvo de modificar lo descrito por Bortoluzz et al., 2005 y Chang y Carpenter, 1997 (Tabla 1). Se elaboraron geles modelo conteniendo 0 (control), 2, 4 y 6% (m/m) de las harinas de plátano, reduciéndose el contenido de grasa (aceite de soya) y aumentando el porcentaje de agua a medida que se incrementó el porcentaje de harina.

Los geles modelo se procesaron según la metodología modificada de Choi et al. (2011), para lo cual la pechuga de pollo sin piel, desgrasada y deshuesada se picó en un procesador de alimentos (Hobart) durante 1 minuto a 4 °C, se mezcló en un procesador de alimentos (Black y Decker, HC300 Handy Chopper Pluss TM) con el resto de los ingredientes durante 1 minuto a 4 °C y se adicionó harina de plátano en caso de que el gel tuviera un grado de sustitución. Posteriormente, la pasta obtenida se transfirió a tubos de centrifuga de 50 mL, se taparon y se centrifugaron a 2500 rpm durante 1 minuto para eliminar las burbujas de aire.

La mezcla se llevó a 20 °C durante 10 minutos en un baño de agua (Digisystem Laboratory Instruments Inc., 1009045) y luego se calentó a 90 °C durante 20 minutos, aumentando el calor a una velocidad de 2 °C/min. Los tubos de centrifuga se sumergieron en un baño de agua con hielo durante 20 minutos y se refrigeraron a 4 °C durante 24 horas.

Evaluación de los geles

pH

Se midió por triplicado siguiendo la metodología sugerida por Choi et al. (2011) con un pHmetro (Metrohm, 827 pH lab).

Rendimiento de cocción

El rendimiento se determinó como la diferencia porcentual entre las masas de los geles crudos y cocidos. Luego de la

Ingrediente	Porcentaje (% m/m)						
	Control	Harina gruesa			Harina fina		
		Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5	Gel 6
Carne de pollo molida	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Aceite de soya	25,0	22,5	20,0	17,4	22,5	20,0	17,4
Agua destilada	22,7	23,2	23,7	24,3	23,2	23,7	24,3
Cloruro de sodio	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Tripolifosfato de sodio	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Harina de plátano	0,0	2,0	4,0	6,0	2,0	4,0	6,0
Reducción aceite de soya	0,0	2,5	5,0	7,6	2,5	5,0	7,6
Aumento agua destilada	0,0	0,5	1,0	1,6	0,5	1,0	1,6
Reducción de grasa	0,0	10,1	20,2	30,3	10,1	20,2	30,3

Tabla 1. Formulación de los geles modelo para evaluar sus propiedades tecnológicas.

cocción a 90 °C durante 20 minutos se procedió a decantar el líquido sobrenadante, se enfrió y se midió la masa.

Capacidad de adsorción de agua (WHC)

Se siguió la metodología de Choi et al. (2011) modificada. Al preparar los geles modelo, luego de que se mantuvo la temperatura a 90 °C durante 20 minutos en el baño de agua (Digisystem Laboratory Instruments Inc., 1009045), se decantó el líquido sobrenadante y se midió su masa. Los geles se almacenaron a 4 °C durante 24 horas y posteriormente se centrifugaron (Labnet, HERMLE Z300) a 6000 rpm durante 1 minuto y se midió la masa de los geles centrifugados y cocidos. Las mediciones se realizaron por triplicado. WHC se calculó mediante la fórmula:

$$WHC = \left(1 - \frac{m_{gel\ centrifugado}}{m_{gel\ cocido}} \right) * 100$$

Análisis del perfil de textura (TPA)

La textura de los geles modelos se midió con un texturómetro (TA.TX Plus, Stable Micro Systems) con celda de carga de 50,0 kg, utilizando muestras cilíndricas de 2,0 cm de altura que se comprimen dos veces al 50% de su altura original con 1,0 mm/s de velocidad de cabezal, 1,0 mm/s de velocidad de pre-prueba, 1,0 mm/s de velocidad de post-prueba, 2 kg de carga máxima, 10,000 mm de distancia; 5,00 s de tiempo y 25,0 g de fuerza. Se obtuvieron los parámetros de: dureza (pico de fuerza en la primera compresión, N), elasticidad (distancia entre la primera compresión y la segunda), cohesión (razón entre el área del segundo pico de fuerza y el primero), adhesividad (área del tercer pico de fuerza), gomosidad (dureza * cohesión) y masticabilidad (dureza * cohesión * elasticidad) (Choi, et al., 2011). Para la determinación se realizaron seis mediciones de cada una de las tres repeticiones.

Color

Se determinó usando un colorímetro (Hunter Lab, Color Flex), calibrado con un plato negro, uno blanco y uno verde ($L^* = 53,11$; $a^* = -26,13$ y $b^* = 12,28$) a una diferencia de $\pm 0,30$. Se midieron los parámetros L^* , a^* y b^* por triplicado. La intensidad de color se calculó como $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ y el ángulo de matiz se calculó $h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$ (Choi, et al. 2011).

Análisis de datos

Para la caracterización de las harinas los resultados se reportaron como el promedio entre los valores obtenidos en las tres repeticiones con su respectiva desviación estándar y se analizaron estadísticamente con una *t*-student. Para la evaluación de los geles se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con siete tratamientos y tres repeticiones. Las variables respuesta se analizaron estadísticamente mediante un ANDEVA y en caso de detectar diferencias significativas al 95% de confianza se aplicó una prueba de comparación de medias Tukey. En los parámetros en los que no se detectaron diferencias significativas se calculó la potencia de la prueba para el análisis estadístico.

Resultados

Se determinaron diferencias significativas entre ambas harinas para los contenidos de humedad, carbohidratos y almidón, mientras que no se hallaron diferencias significativas para los contenidos de cenizas, grasa y proteína (Tabla 2).

Variable	Contenido (% m/m en base seca)		Probabilidad
	Harina gruesa	Harina fina	
Humedad	2,85 ± 0,07 ^a	2,29 ± 0,07 ^b	0,0287
Cenizas	3,41 ± 0,14	3,23 ± 0,14	0,4561
Grasa	1,13 ± 0,16	0,610 ± 0,16	0,1502
Proteína	3,78 ± 0,07	3,48 ± 0,07	0,0881
Carbohidratos	91,7 ± 0,03 ^a	92,7 ± 0,03 ^b	0,0021
Almidón total	68,6 ± 0,53	69,6 ± 0,53	0,0245

Tabla 2. Composición proximal de harinas de plátano (*Musa AAB*) verde con cáscara de diferente tamaño de partícula.

*Letras diferentes entre la fila indican diferencias significativas con un 95% de confianza.

No se determinaron diferencias significativas en ninguna de las cuatro propiedades tecnológicas evaluadas (Tabla 3).

Variable	Valor		Probabilidad
	Harina gruesa	Harina fina	
WHC (g/g)	1,58 ± 0,11	1,54 ± 0,05	0,1675
S (g/g)	1,59 ± 0,02	1,58 ± 0,02	0,8302
SW (mL/g)	3,77 ± 0,17	3,91 ± 0,17	0,6222
FAC (g/g)	0,795 ± 0,02	0,788 ± 0,02	0,8617

Tabla 3. Propiedades tecnológicas evaluadas para las harinas de plátano con diferente tamaño de partícula.

Los valores de pH de la mezcla cárnica se encontraron en un rango entre 6,07-6,10 y no presentaron diferencias significativas ($p = 0,5621$), es decir, ni el grado de sustitución ni el tipo de harina que se utilizó tuvo influencia sobre el pH, por lo que se asegura que los geles no sufrirían cambio de textura producto de variaciones del pH.

En el Gráfico 1 se presentan los resultados del rendimiento de cocción y la capacidad de adsorción de agua de los geles cárnicos elaborados.

Mediante el Análisis de Perfil de Textura (TPA) (Gráfico 2) se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos para las variables de dureza ($p = 0,0128$), gomosidad ($p = 0,0059$) y masticabilidad ($p = 0,0059$). La elasticidad, cohesividad ($p = 0,6566$) y adhesividad ($p = 0,7344$) no mostraron diferencias significativas entre los geles formulados.

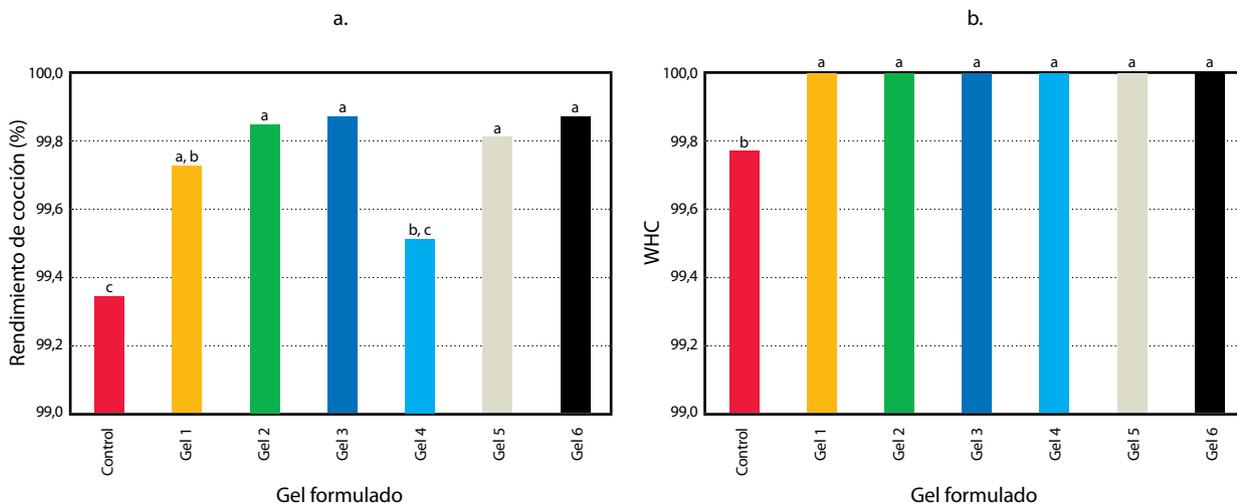
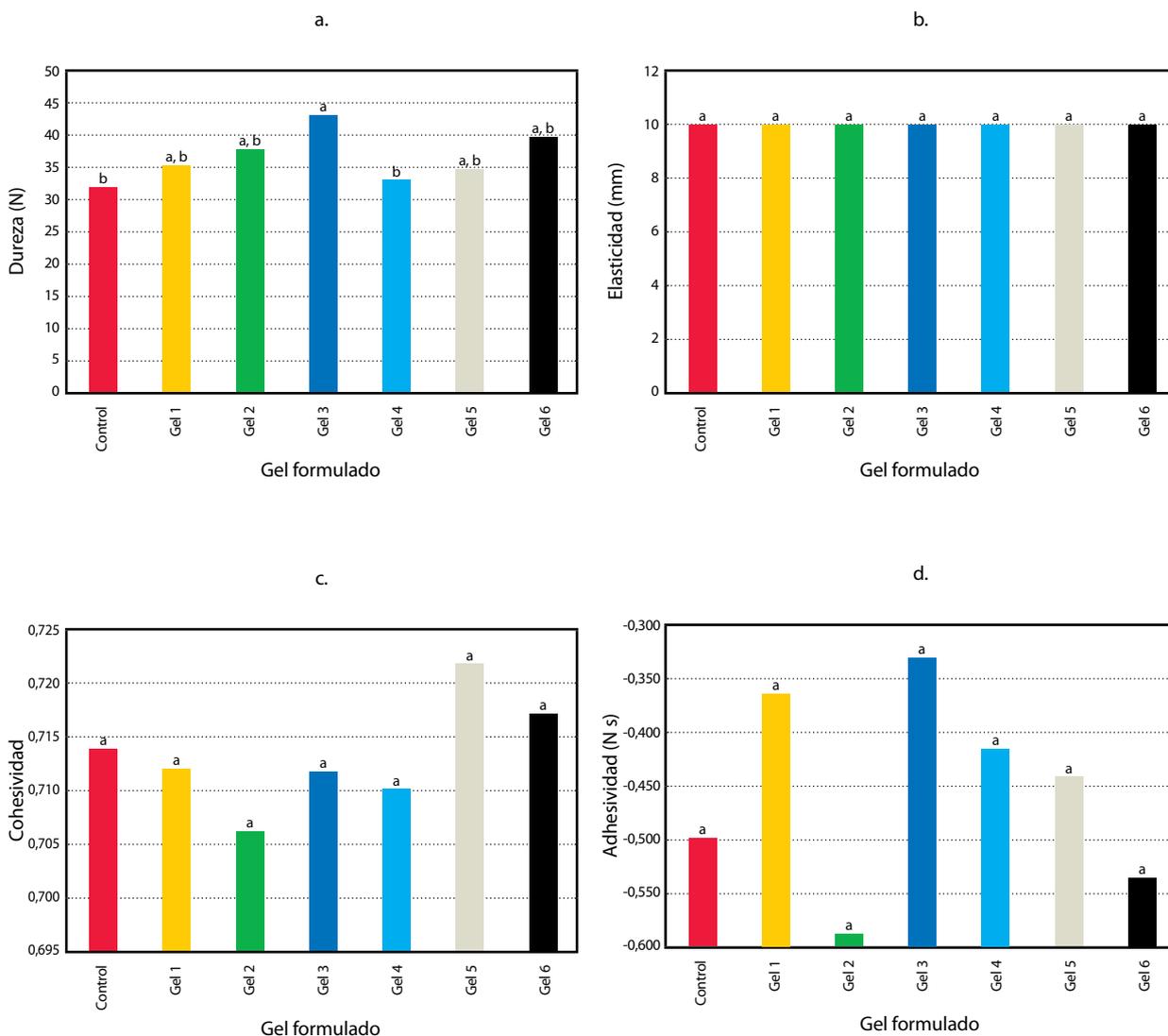


Gráfico 1. Efecto de la adición de harina de plátano con cáscara con diferentes tamaños de partícula y grados de sustitución sobre el rendimiento de cocción (a) y la capacidad de adsorción de agua (b) en geles cárnicos.



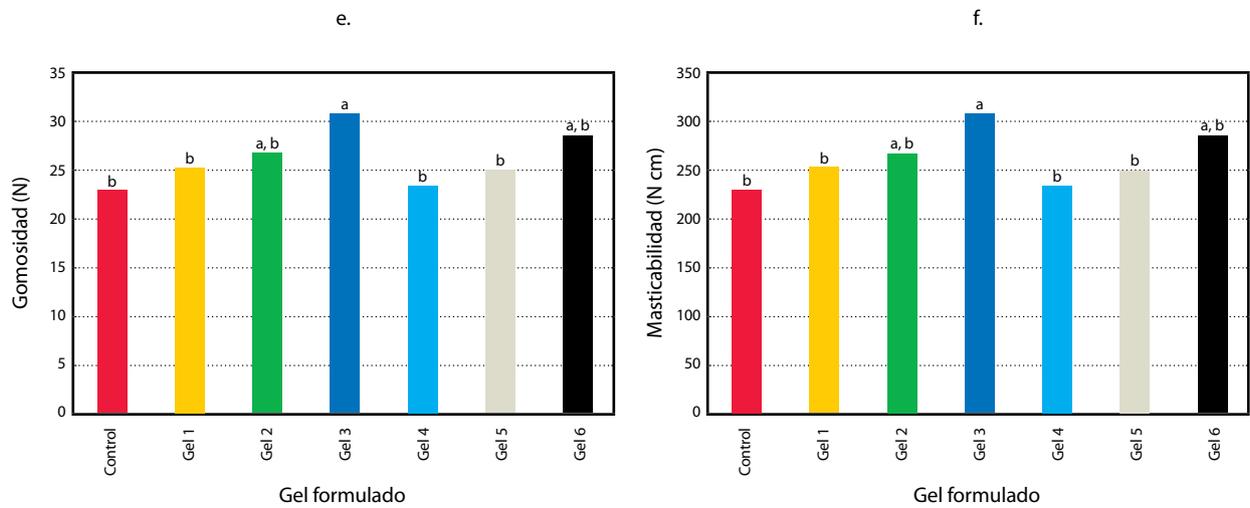
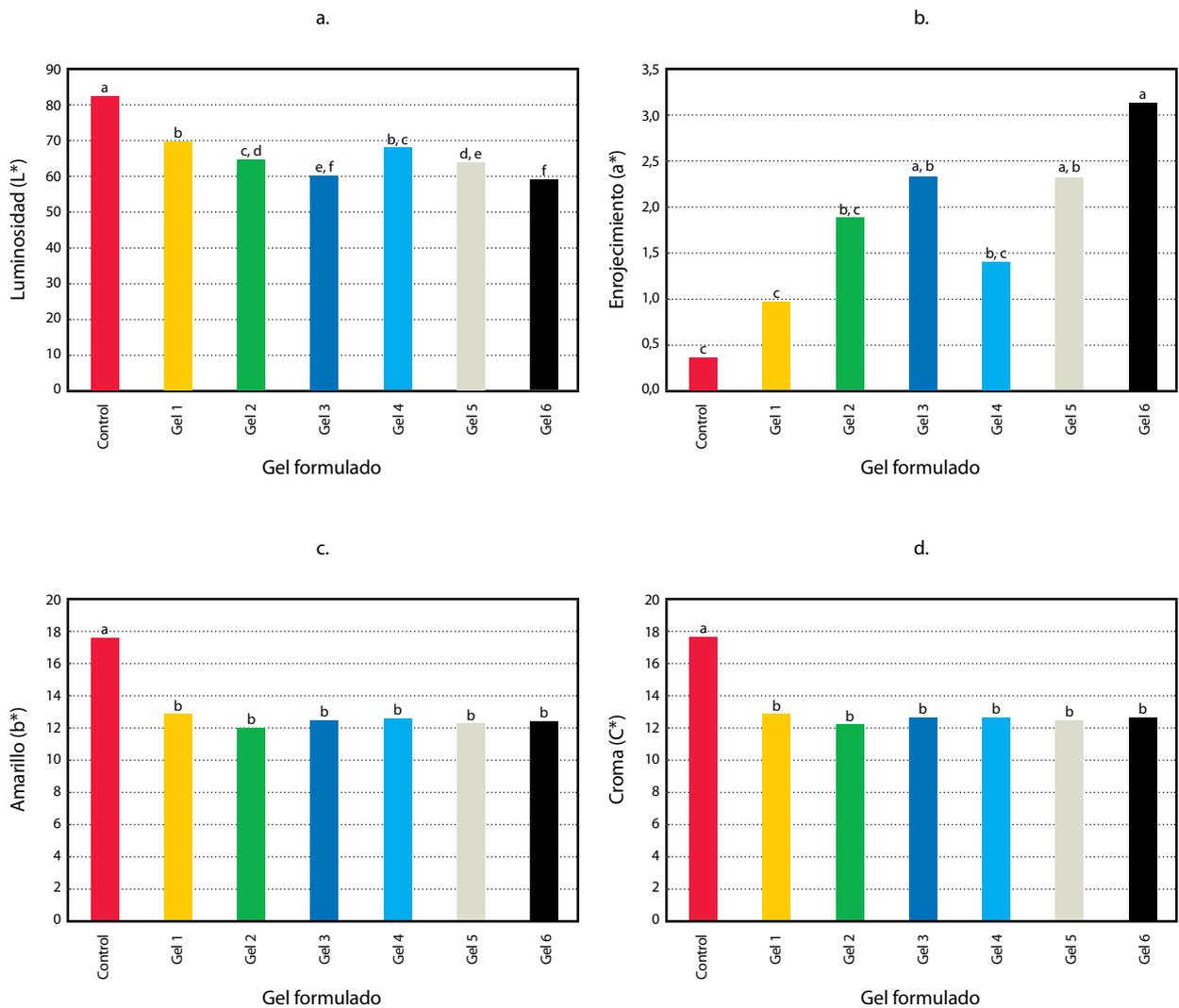


Gráfico 2. Efecto de la adición de harina de plátano con cáscara con diferentes tamaños de partícula y grados de sustitución sobre la dureza (a), elasticidad (b), cohesividad (c), adhesividad (d), gomosisidad (e) y masticabilidad (f) en geles cárnicos.

Se obtuvieron diferencias significativas para los parámetros de luminosidad visual (L^*) ($p < 0,0001$), enrojecimiento (a^*) ($p = 0,0001$), amarillo (b^*) ($p < 0,0001$), croma (C^*) ($p < 0,0001$) y ángulo de matiz (h°) ($p = 0,0001$) para los geles formulados (Gráfico 3).



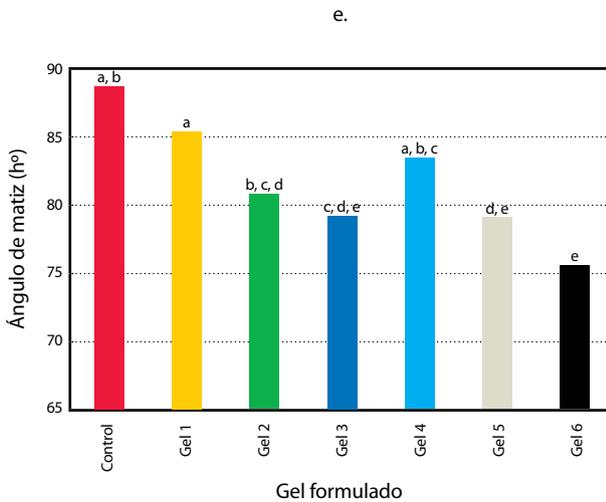


Gráfico 3. Efecto de la adición de harina de plátano con cáscara con diferentes tamaños de partícula y grados de sustitución sobre la luminosidad visual (a), el enrojecimiento (b), el amarillo (c), el croma (d) y el ángulo de matiz (e) en geles cárnicos.

Discusión

Caracterización de la harina de plátano verde con cáscara

Las diferencias del contenido de humedad (Tabla 2) pueden deberse a que durante el proceso de secado por aire caliente no se controló regularmente el descenso de humedad, sino que se fijó un tiempo de secado.

Respecto al contenido de carbohidratos, se determinaron diferencias significativas entre los dos tipos de harina, siendo mayor para la harina fina. Durante el proceso de molienda de la harina fina se observó una gran cantidad de cáscara retenida en comparación con la harina gruesa, lo que pudo ocasionar una variación en la proporción. Las harinas obtenidas tienen altos porcentajes de almidón; González y Pacheco-Delahaye (2006) mencionan que el almidón proveniente del plátano proporciona pastas cortas que en el enfriamiento producen geles de gran fuerza. Tapia (2005) indica que el plátano contiene almidón resistente tipo 2 (AR2), el cual presenta una estructura parcialmente hidratada y gelatinizada tan empaquetada que limita la accesibilidad de las amilasas. Además, cuando estas estructuras se calientan y rehidratan, la amilosa forma una estructura de almidón resistente complejo y estable (almidón resistente tipo 3, AR3), el cual es altamente resistente a las enzimas amilolíticas (Tapia, 2005) que lo convierten en un ingrediente funcional (Soto, 2010).

Evaluación de las propiedades tecnológicas de la harina

En las condiciones del estudio el tamaño de partícula no influye en la capacidad de retención de agua, solubilidad, hinchamiento, ni en la capacidad de adsorción de grasa de las harinas (Tabla 3).

Sangnark y Noomhorm (2003) realizaron un estudio del efecto del tamaño de partícula sobre las propiedades

funcionales de la fibra dietética y determinaron que una disminución en el tamaño de partícula de la fibra se asoció con un aumento en la densidad y una reducción de la WHC y FAC. Sin embargo, Raghavendra et al. (2006) indican que una reducción en el tamaño de partícula de 1127 a 550 μm tiene un efecto significativo en la estructura física de las fibras de coco y que esto se relaciona con un aumento de las propiedades de hidratación —tales como la capacidad de retención de agua, capacidad de adsorción de agua e hinchamiento—, de forma tal que las propiedades de hidratación tienden a disminuir conforme aumenta el tamaño de partícula.

Sangnark y Noomhorm (2003), en su estudio con *Laminaria digitata* (kombu bretón), encontraron que tamaños de partícula menores se asociaron con una adsorción de agua y grasa mayor. Asimismo, parámetros experimentales como la agitación podrían alterar la estructura física de las fibras y dar lugar a grandes cambios en la WHC y FAC.

Estos resultados indican que los tamaños de partícula utilizados en esta investigación no fueron lo suficientemente diferentes para detectar una diferencia, si es que existe una. Por otra parte, si se considera que la composición química en general no mostró diferencias, se podría decir que esta no influyó sobre las propiedades tecnológicas ni tampoco sobre la superficie de contacto, o bien que un contenido mayor de cáscara en la harina de plátano (harina gruesa) no aporta significativamente compuestos o materia que incremente las interacciones de la matriz con el agua o el aceite del medio y, por lo tanto, no se da una mayor ni menor capacidad para retener agua o grasa.

Con respecto a la WHC de la harina de plátano, se puede considerar baja comparada con valores reportados en la literatura, por ejemplo: 2,7 g agua retenida/g de materia seca en salvado de trigo a 42,5 g agua retenida/g de materia seca en fibra dietética insoluble de zanahoria (Elleuch, et al., 2011); 11,4 a 20,3 en subproductos de espárrago (Fuentes-Alventosa, et al., 2009). Abbas et al. (2011) determinaron la WHC a diferentes temperaturas tanto para cáscara como para pulpa de banano (*Musa acuminata L., cv cavendshii*) con valores que oscilaron de 4,91 a 5,88 g de agua/g de muestra seca de cáscara y 5,66 a 6,31 g de agua/g de muestra seca de pulpa. Doporto et al. (2012) determinaron por suspensión de la muestra en agua y centrifugación la WHC de harina y almidones de ñame (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Con ambas materias primas la WHC fue mayor en las harinas que en los respectivos almidones. A pesar de que la metodología empleada es diferente a la empleada con la harina de plátano de este estudio, los resultados son similares, dado que para harina de ñame el rango fue entre 1,32-1,91 g de agua por g de muestra seca, en el caso de la yuca fue de 1,01-1,10 g de agua por g de muestra seca. Mweta et al. (2008) reportan también la WHC de almidones de diferentes variedades de yuca con un rango en 0,86-1,08 g de agua por g de almidón seco.

Este comportamiento se ve reflejado en las otras dos propiedades que incluyen interacciones con la harina y el agua, como lo son la solubilidad y el hinchamiento. En la literatura se reporta que la solubilidad para la coliflor varía entre 21,6-48,1 g solubilizados/g de materia seca (Femenia, et al., 1997), mientras que el hinchamiento varía entre 4,2 mL residuo/g de materia seca para la coliflor (Femenia, et al., 1997) y 62,2 mL residuo/g de materia seca para la fibra dietética insoluble de zanahoria (Chau, et al., 2007).

En promedio, la capacidad de retención de grasa para la harina fue de 0,792, valor similar al reportado para coliflor, 0,9 g aceite / g de materia seca (Femenia, et al., 1997), e inferior a fibras de desechos de naranja, 1,95 g aceite / g de materia seca (Tamayo y Bermúdez, 1998).

Evaluación de las propiedades de la harina en modelos de emulsiones cárnicas

Para todos los geles los rendimientos de cocción fueron superiores a 99%, siendo el valor menor para el gel control. Con respecto a la capacidad de retención de agua del gel, también estuvo por encima de 99,5% (Gráfico 1).

Según Brewer (2012), al reducir el contenido de grasa se puede aumentar la pérdida de líquidos. Además de lo mencionado anteriormente, Kumar y Sharma (2004) indican que los sustitutos de grasa en su mayoría provocan una reducción del rendimiento y una purga excesiva.

Se determinó que para el rendimiento de cocción existe una diferencia significativa ($p = 0,0006$) entre tratamientos (Gráfico 1.a). El gel formulado con harina fina al 2% y el gel control fueron los de menor rendimiento de cocción. Los geles formulados con 2 y 4% de HF y los de 4 y 6% de HG no mostraron diferencia significativa. El rendimiento de cocción fue mayor para los geles que contenían algún grado de sustitución, contrario a lo esperado según la literatura, aunque se puede concluir en general que los rendimientos fueron satisfactorios y que este aspecto deberá evaluarse en experimentos más relacionados a la escala industrial.

El aumento en el porcentaje de rendimiento de cocción pudo deberse a que la harina presentaba un alto contenido de almidón, lo que genera un aumento en la capacidad de retención de agua y por tanto interviene en el peso del producto terminado (Tapia, 2005).

Una propiedad funcional de los geles proteicos es su capacidad para adsorción de agua, la cual se ve favorecida en condiciones adecuadas de temperatura y pH (Brewer, 2012), ya que las proteínas logran formar de una manera más eficiente estructuras de gel que retienen grandes cantidades de agua y otros componentes alimentarios (Kocher y Foegeind, 1993). La determinación de la WHC permite evaluar la capacidad del gel cárnico de adsorber agua y a su vez indica la estabilidad de la emulsión al ser sometida a un esfuerzo mecánico, en este caso a una operación de centrifugación (Choi, et al., 2011; Femenia, et al., 1997).

Se determinaron diferencias ($p < 0,0001$) en la capacidad de adsorción de agua entre los tratamientos, sin importar el grado de sustitución ni el tipo de harina utilizado con respecto al control (Gráfico 1.b). Esto indica que al utilizar la harina de plátano con cáscara como sustituto de grasa se obtiene un incremento en la capacidad de adsorción de agua del gel cárnico, lo cual podría deberse, como se mencionó antes, a que la harina de plátano con cáscara tiene alto contenido de almidón, componente que le brinda una alta capacidad de retención de agua y gelificación al producto (Linden y Lorient, 1996).

En el Gráfico 2.a se observa que el gel 3, el cual corresponde a la adición de 6% harina gruesa, es significativamente más duro que el gel control y el gel 4 (harina fina, 2%). A su vez, las demás sustituciones no presentaron diferencias significativas con respecto al control. Además de que el gel 3 presenta un contenido menor de grasa, lo cual influye en

su dureza, presenta un contenido mayor de harina y, por lo tanto, de almidón de plátano en su formulación. La dureza, de acuerdo a Rosenthal (2001), se define como la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares. Una reducción del contenido graso entre 10 a 25% en productos de carne triturados afecta la dureza (Brewer, 2012), debido a que la grasa promueve la succulencia, sabor, sensación en la boca, cohesión, estabilidad, jugosidad, ternura, saciedad y la emulsión, de forma tal que alimentos con bajo contenido de grasa presentan una dureza mayor (Kaack y Pedersen, 2005).

Según Smith (2001) y Smewing (2001), las características de gelatinización y temperatura de transición vítrea (T_g) afectan la reología y las propiedades mecánicas de los alimentos basados en almidón, debido a que el cambio estructural implica la fusión de biopolímeros de almidón, desnaturalización de proteínas y la formación de complejos entre moléculas como los azúcares y las grasas, lo cual, en este caso, le brinda al producto un leve aumento en la rigidez.

Al igual que con la dureza, se determinaron diferencias significativas tanto para la gomosidad (Gráfico 2.e) como para la masticabilidad (Gráfico 2.f). El gel 3 presentó un mayor valor de gomosidad y masticabilidad con respecto a los geles 1, 4, 5 y control, y 3 no mostró diferencias con respecto a los geles 2 y 6. En estas características interviene directamente el contenido de grasa del alimento, ya que esta mejora la sensación bucal y facilita la masticación de los alimentos (De Bruijne y Bot, 2001; Greaser y Pearson, 2001). Por esto, de acuerdo a los resultados obtenidos, una mayor cantidad de harina y por ende mayor contenido de almidón influyen significativamente en la capacidad de masticación y desintegración de los geles formulados.

Con respecto al color de los geles cárnicos formulados, las diferencias detectadas coinciden con el estudio de Choi et al. (2011), en el cual al incrementar los niveles de sustitución en geles cárnicos de cerdo cocidos y sin cocer con fibra de salvado de arroz se obtuvieron cambios significativos en los parámetros de color L^* , a^* , b^* , C^* y H° .

La luminosidad visual (L^*) se define como la cantidad de luz que el estímulo parece emitir y va de una escala de 0 (negro) a 100 (blanco) (MacDougall, 2002). En el caso del gel control, este fue diferente con respecto a todos los tratamientos. Se observó que, independientemente del tamaño de partícula, L^* disminuye al aumentar el grado de sustitución (Gráfico 3.a). Esto podría deberse a que al sustituir grasa por agua y harina cambia la distribución de la luz al aumentar la cantidad de agua y de pigmentos provenientes de la harina, lo que puede aumentar la retención de la luz en la estructura de los geles y reflejar menos.

Según Kaack y Pedersen (2005), varios experimentos han demostrado que el bajo contenido de grasa en salchichas provoca productos más oscuros, más rojos y menos amarillos comparados contra las salchichas control. El enrojecimiento (a^*) es la coordenada cromática de rojo ($+a^*$) a verde ($-a^*$) (MacDougall, 2002). Para los geles analizados, los valores de a^* se encuentran en el eje positivo, es decir que los geles tienden más al rojo que al verde. Se determinaron diferencias significativas entre el control y los geles 3 (6% de harina gruesa), 5 (4% de harina fina) y 6 (6% de harina fina) (Gráfico 3.b), siendo el control el que presentó menos enrojecimiento. Los geles con mayor grado de sustitución presentaron el mayor enrojecimiento.

El amarillo (b^*) es la coordenada cromática de amarillo ($+b^*$) a azul ($-b^*$) (MacDougall, 2002) y los resultados obtenidos indican que se tiende a más amarillo que a menos

amarillo. Se determinaron diferencias significativas entre el control y los demás geles sustituidos, pero no entre los geles sustituidos (Gráfico 3.c). Este comportamiento puede deberse a que en el gel control existe una mayor cantidad de grasa y, por lo tanto, una mayor concentración de pigmentos como carotenoides. Estos suelen aumentar la intensidad del amarillo en los productos; al reducirse el contenido de aceite en los demás geles se reduce el amarillo en el color del producto. Así lo afirman Kaack y Pedersen (2005), quienes indican que una reducción en el contenido de grasa provoca una disminución significativa del amarillo. Estos resultados son contrarios a los citados por Choi et al. (2011), quienes determinaron un aumento significativo en geles de carne de cerdo crudos y cocidos con niveles crecientes de fibra de salvado de arroz, en emulsiones cárnicas sustituidas con fibra de trigo (Choi, et al., 2011) y en tortas de carne para hamburguesas con la adición de película de avellana (Turhan, et al., 2005).

El croma (C^*) representa la distancia vectorial desde el centro del color espacial hasta el color medido (MacDougall, 2002). Según los valores obtenidos, se determinaron diferencias significativas entre el control y los demás geles cárnicos, siendo el gel control el que presenta un croma mayor, mientras que entre los geles sustituidos no se observaron diferencias significativas entre sí (Gráfico 3.d).

Los resultados en cuanto a las diferencias de croma son muy variables. Por un lado, Choi et al. (2011) afirman que las diferencias C^* de geles crudos y cocidos aumentaron con los niveles crecientes de fibra de salvado de arroz, al igual que al adicionar cáscara de tomate seco a embutidos secos (Calvo, et al., 2008) o al agregar un concentrado de fibra dietética a partir de melocotón en salchichas (Griguelmo-Miguel, et al., 1999). Por otro lado, Mansour y Khalil (1999) no hallaron cambios de color en tortas para hamburguesas con fibra de trigo bajas en grasa, y Dzudie et al. (2002) indicaron que las diferencias de croma no fueron significativas en embutidos de carne sustituidos con harina de frijol. Estos últimos concuerdan más con lo que se determinó para los geles cárnicos sustituidos con harina de plátano con cáscara.

Además de la luminosidad visual y el croma, el ángulo de matiz (h°) es el tercer parámetro más importante en la explicación del comportamiento de los colores en el tiempo y se da como un ángulo entre 0 y 360° (MacDougall, 2002). Se determinaron diferencias significativas para los geles 3, 5 y 6 con respecto al gel control que tenía mayor h° (Gráfico 3.e).

En el caso del plátano, el ángulo de matiz para los geles sustituidos se determinó entre 79,2° (gel 6) a 85,4° (gel 1). El control presentó un ángulo de 88,7°. Esta tendencia decreciente del ángulo de matiz se vio más acentuada al utilizar la harina fina, debido a que se dispersa mejor en el gel cárnico gracias a su menor tamaño de partícula, y al aumentar el grado de sustitución se logra disminuir la tonalidad del gel modelo, tendiendo a tonos más amarillos.

Conclusiones

Con respecto a la composición química de las harinas evaluadas, solo se observaron diferencias significativas en la humedad y carbohidratos. No se observaron diferencias significativas en los dos tipos de harinas estudiados en lo que respecta a su capacidad de absorción de agua (WHC), que en promedio fue de 1,56 g de agua/g harina, la solubilidad (S), cuyo promedio fue de 1,58 g harina/g agua, el hinchamiento

(SW), en promedio 3,84 mL/g, y capacidad de absorción de grasa (FAC), que fue de 0,792 g aceite/g harina.

La harina de plátano verde con cáscara representa una fuente de almidón en la formulación de un producto cárnico y es una opción para sustituir grasa, principalmente por su composición química y características tecnofuncionales.

Bajo las condiciones analizadas en esta investigación, el factor más importante a considerar en el desarrollo de un producto cárnico es el porcentaje de sustitución, el uso de igual o menor a un 4% de harina fina, que representa un 20% de disminución de grasa y es el recomendado a fin de disminuir el impacto sobre el color y la textura. Sin embargo, deberá evaluarse el contenido final de carbohidratos para cumplir con la legislación respecto a la composición proximal del producto.

Referencias

- Abbas F.M., Alkarkhi, Saifullah, Bin Ramli, Yeoh, Shin Yong y Azhar, Mat Easa, 2011. Comparing physicochemical properties of banana pulp and peel flours prepared from green and ripe fruits. En: *Food Chemistry*, 129, pp.312-318.
- AOAC International, 1990a. *Official methods of analysis of AOAC international*. 15a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 920.85.
- AOAC International, 1990b. *Official methods of analysis of AOAC international*. 15a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 923.03.
- AOAC International, 1990c. *Official methods of analysis of AOAC international*. 15a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 925.09.
- AOAC International, 2005. *Official methods of analysis of AOAC international*. 18a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 920.152.
- Bortoluzzi, R., Shimokomaki, M. y Marangoni, C., 2005. Avaliação das características funcionais da fibra de laranja para aplicação em emulsões de carne de frango. En: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. Carne & Saúde*, 6, pp.1-3.
- Brewer, S., 2012. Reducing the fat content in ground beef without sacrificing quality: a review. En: *Meat Science*, 91, pp.385-395.
- Calvo, M., García, M. y Selgas, M., 2008. Dry fermented sausages enriched with lycopene from tomato peel. En: *Meat Science*, 80(2), pp.167-172.
- Chau, C., Wang, Y. y Wen, Y., 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. En: *Food Chemistry*, 100, pp.1402-1408.
- Chang, H. y Carpenter, J., 1997. Optimizing quality of frankfurters containing oat bran and added water. En: *Journal of Food Science*, 62, pp.194-202.
- Choi, Y., Choi, J., Han, D., Kim, H., Lee, M., Kim, H., Jeong, J. y Kim, C., 2011. Effects of rice bran fiber on heat-induced gel prepared with pork salt-soluble meat proteins in model system. En: *Meat Science*, 88, pp.59-66.
- Codex Alimentarius, 1989. Directrices generales del Codex para la utilización de productos proteínicos vegetales en los alimentos [En línea]. Roma: Codex. [Consulta: 02 de noviembre del 2011]. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/324/CXS_174s.pdf;jsessionid=9EBEDC7270F1A10B58B5C19D8D28C80A.
- De Bruijne, D. y Bot, A., 2001. Alimentos elaborados basados en grasa. En: Rosenthal, A. J. *Textura de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.

- Doporto, M.C., Dini, C., Mugridge, A., Viña, S. y García, M. A., 2012. Physicochemical, thermal and sorption properties of nutritionally differentiated flours and starches. En: *Journal of Food Engineering*, 113, pp.569-576.
- Dzudie, T., Scher, J. y Hardy, J., 2002. Common bean flour as an extender in beef sausage. En: *Journal of Food Engineering*, 52(2), pp.143-147.
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S. y Blecker, C., 2011. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterization, technological functionality and commercial applications: A review. En: *Food Chemistry*, 124, pp.411-421.
- FAO, 2011. *Examen de la viabilidad técnica del seguimiento y análisis de la importancia económica de variedades de banana distintas de la Cavendish: esbozo de una estrategia* [En línea]. Yaoundé: FAO. [Consulta 24 de setiembre de 2012]. Disponible en: www.fao.org/docrep/meeting/022/ma590s.pdf.
- Femenia, A., Lefebvre, A., Theabaudin, J., Robertson, J. y Bourgeois, C., 1997. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. En: *Journal of Food Science*, 62(4), pp.635-639.
- Fuentes-Alventosa, J., Rodríguez-Gutiérrez, G., Jaramillo-Carmona, S., Espejo-Calvo, S., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén-Bejarano, R. y Jiménez-Araujo, A., 2009. Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fiber powders obtained from asparagus by-products. En: *Food Chemistry*, 113, pp.665-671.
- González, C., Aristizábal, J. y Aristizábal, M., 2009. Evaluación biológica del manejo de picudos y nematodos fitopatogénicos en plátano (*Musa AAB*). En: *Acta Agronómica, Colombia*, 58(4), pp.259-269.
- González, O. y Pacheco-Delahaye, E., 2006. Propiedades físicas y reológicas de la harina de banana verde (*Musa AAA*) en la elaboración de geles de piña (*Ananas comosus* L. Merr.). En: *Revista de la Facultad de Agronomía, Maracay*, 3, pp.27-40.
- Greaser, M. y Pearson, A., 2001. Alimentos de carne y sus análogos. En: Rosenthal, A. J. *Textura de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Grigelmo-Miguel, N., Gorinstein, S. y Martín-Belloso, O., 1999. Characterization of peach dietary fiber concentrate as a food ingredient. En: *Food Chemistry*, 65, pp.175-181.
- Hernández, J., Cañizares, A., Blanco, G., Arrieche, I., Pérez, A., Salazar, C. y González, M., 2009. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en harinas de clones de musáceas comestibles (*Musa* spp.). En: *UDO Agrícola, Venezuela*, 9(2), pp.449-457.
- Islas, J., Rodríguez, S., Agama, E., Pacheco, G. y Bello, L., 2007. *Evaluación de algunas propiedades químicas de un polvo rico en fibra preparado a partir de harina integral de plátano* [En línea]. ICA: México. [Consulta abril de 2012]. Disponible en: <https://www.google.com.uy/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CB0QJfAA&url=http%3A%2F%2Fwww.respyn.uanl.mx%2Fespeciales%2F2007%2Ffee-12-2007%2Fdocumentos%2FCNCA-2007-17.pdf&ei=8OIQVNSmDsKhNuEgJAM&usq=AFQjCNGpbDVJkeMRA0UUh8Y4vhaZdRB7Qlg&sig2=Ivt5O81Hsp6pKaHOxO2iaQ&bvm=bv.78597519,d.eXY&cad=rjt>.
- Kaack, K. y Pedersen, L., 2005. Application of by-products from industrial processing of potato flour and yellow peas as ingredients in low-fat high-fiber sausages. En: *European Food Research and Technology*, 221, pp.313-319.
- Kocher, P. y Foegeding, E., 1993. Microcentrifuge-based method for measuring water-holding of protein gels. En: *Journal of Food Science*, 58(5), pp.1040-1046.
- Kumar, M. y Sharma, B., 2004. The storage stability and textural, physico-chemical and sensory quality of low-fat ground pork patties with Carrageenan as fat replacer. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 39, pp.31-42.
- Linden, G. y Lorient, D., 1996. *Bioquímica agroindustrial. Revalorización alimentaria de la producción agrícola*. Zaragoza: Acribia. ISBN: 978-84-200-0805-9.
- López-López, I., Bastida, S., Ruiz-Capillas, C., Bravo, L., Larrea, M., Sánchez-Muniz, F., Cofrades, S. y Jiménez-Colmenero, F., 2009. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. En: *Meat Science*, 83(3), pp.492-498.
- MacDougall, D., 2002. *Colour in food*. Boston: Woodhead Publishing Limited; CRC Press.
- Mansour, E., Khalil, A., 1999. Characteristics of low-fat beef burgers as influenced by various types of wheat fibers. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(4), pp.493-498.
- Mazzeo, M., León, L., Mejía, L., Enith, L. y Botero, J., 2010. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de Caldas. En: *Educación en Ingeniería*, 9, pp.128-139.
- Mestres, C., Colonna, P., Alexandre, M.C., Matencio, F., 1993. Comparison of various processes for making maize pasta. En: *Journal of Cereal Science*, 17, pp.277-290.
- Molina, G., 2001. *Bananos: alimentos y riqueza* [En línea]. Montpellier: INIBAP. [Consulta: 07 de setiembre de 2011]. Disponible en: <http://bananas.biversityinternational.org/>.
- Murillo, F. y Pacheco, C., 1994. *Atlas agropecuario de Costa Rica*. San José: UNED.
- Mweta, D.E., Labuschagne, M.T., Koen, E., Benesi, I. y Saka, J., 2008. Some properties of starches from cocoyam (*Colocasia esculenta*) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) grown in Malawi. En: *African Journal of Food Science*, 2, pp.102-111.
- Pietrasik, Z., 2003. Binding and textural properties of beef gels processed with κ -carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. En: *Meat Science*, 63(3), pp.317-324.
- Pinero, M., Ferrer, M., Arenas, L., Huerta-Leidenz, N., Parra, K. y Araujo, S., 2008. Atributos sensoriales y químicos de un producto cárnico ligero formulado con fibra soluble de avena. En: *Mundo lácteo y cárnico*, set./oct., pp.19-23.
- Raghavendra, S., Ramachandra, S., Rastogi, N., Raghavarao, K., Kumar, S. y Tharanathan, R., 2006. Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: a source of dietary fiber. En: *Journal of Food Engineering*, 72, pp.281-286.
- Restrepo, D., 2002. *Alternativas de industrialización del plátano. Una propuesta* [En línea]. Cartagena de Indias: Acorbat. [Consulta 24 de setiembre de 2012]. Disponible en: http://sena.blackboard.com/bbcswebdav/institution/73311576_1_VIRTUAL/Pdf/Documentos%20de%20apoyo/Doc%20de%20apoyo%204.pdf.
- Rosenthal, A., 2001. Relación entre medidas instrumentales y sensoriales de la textura de alimentos. En: Rosenthal, A. J. *Textura de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.

- Sangnark, A., y Noomhorm, A., 2003. Effect of particle sizes on functional properties of dietary fiber prepared from sugarcane bagasse. En: *Food Chemistry*, 80, pp.221-229.
- Sarawong, Ch., Rodríguez-Gutiérrez, Z., Berghofe, E. y Schoenlecher, R., 2014. Effect of green plantain flour addition to gluten-free bread on functional bread properties and resistant starch content. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 49, pp.1825-1833.
- SEPSA, 2011. *Boletín estadístico agropecuario número 21* [En línea]. San José: SEPSA. [Consulta 24 de setiembre de 2012]. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00292.pdf>.
- Shaibu, A.A., Mji, E.A. y Ogburia, M.N., 2012. Yield evaluation of plantain and banana landraces and hybrids in humid agro ecological zone of Nigeria. En: *Journal of Agricultural Research and Development*, 2(3), pp.074-079.
- Smewing, J., 2001. Hidrocoloides. En: Rosenthal, A. J. *Textura de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Smith, A., 2001. Alimentos basados en almidón. En: Rosenthal, A. J. *Textura de los alimentos*. Zaragoza: Acribia.
- Smith, E. y Velázquez, M., 2004. *Opciones tecnológicas para la producción del plátano (Musa AAB) para exportación en la región Atlántica de Costa Rica* [En línea]. San José de Costa Rica: MAG. [Consulta: 07 de setiembre de 2011]. Disponible en: http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_platano_creditos.pdf.
- Soto, V., 2010. Cuantificación de almidón total y de almidón resistente en harina de plátano verde (*Musa Cavendishii*) y banana verde (*Musa paradisiaca*). En: *Revista Boliviana de Química*, 27(2), pp.94-99.
- Tamayo, Y. y Bermúdez, A., 1998. Los residuos vegetales de la industria de jugo de naranja como fuente de fibra dietética. En: Lajolo, F. M., Menezes, E.W. ed. *Temas en tecnología de alimentos*. Vol. 2. México: CYTED.
- Tapia, M., 2005. *Estructura, clasificación y función fisiológica del almidón resistente*. Morelia: Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. (Tesis de Grado).
- Tokusoglu, Ö. y Kemal, M., 2003. Fat replacers in meat products. En: *Journal of Nutrition*, 2(3), pp.196-203.
- Turhan, S., Sagir, I., y Ustun, N., 2005. Utilization of hazelnut pellicle in low-fat beef burgers. En: *Meat Science*, 71(2), pp.312-316.

Elaboración de pan multigrano con harinas precocidas por extrusión

Multigrain bread processing with extruded flours

Crosa, María José ⁽¹⁾, Tihista, Hugo ⁽³⁾, Próspero, María Inés ⁽³⁾, Cadenazzi, Mónica ⁽⁴⁾, Souto, Laura ⁽¹⁾, Curuchet, Ana ⁽¹⁾, Ferreyra, Verónica ⁽²⁾, Suburú, Gabriela ⁽¹⁾, Escudero, Jorge ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽²⁾ Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Centro Cereales y Oleaginosas, 9 de Julio, Buenos Aires, Argentina – ⁽³⁾ Centro de Panaderos del Uruguay – ⁽⁴⁾ Cooperativa Agraria Nacional Uruguay – ⁽⁴⁾ Consultor independiente, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: mjcrossa.b@gmail.com

RECIBIDO: 16/5/2014 - APROBADO: 31/10/2014

Resumen

Se estudió el efecto en la calidad del pan según el proceso de elaboración y del nivel de sustitución (20%, 36%) de una harina precocida por extrusión preparada en base a combinación de avena, soja y salvado de trigo en la calidad del pan. Se caracterizó la harina compuesta según sus propiedades funcionales (Índice de Absorción de Agua), granulometría y propiedades nutricionales (proteína, fibra total, fibra soluble, cenizas, materia grasa). Se realizó seguimiento del volumen, índice de blancura, medidas reológicas (dureza, cohesividad, elasticidad y masticabilidad) de los panes. Las condiciones del proceso de elaboración fue lo que generó mayor impacto en la calidad del pan. Los cambios operativos realizados provocaron un incremento del 37% en el volumen, 6% de elasticidad y 15% de cohesividad, y una disminución del 44% de dureza y 34% de masticabilidad. Esta tendencia se mantuvo en los cuatro días siguientes al día de elaboración. El nivel de sustitución de harina compuesta no provocó cambios significativos en la dureza, elasticidad y masticabilidad del pan, pero se observaron cambios en la cohesividad y volumen. El pan con 36% de sustitución resultó un 7% menos cohesivo y con un 27% menos de volumen que el de 20% de sustitución.

Palabras clave: Calidad pan multigrano, panificación, harinas compuestas.

Abstract

The effect in bread quality of a new bread making process and two replacement levels (20%, 36%) of refined wheat flour by extrusion precooked prepared based on combination of oats, soybeans and wheat bran was studied. Composite flour was characterized according to its functional properties (water absorption index), grain size and nutritional properties (protein, total fiber, soluble fiber, ash, fat). The volume, whiteness index, rheological measurements (hardness, cohesiveness, springiness and chewiness) of the bread were monitored. No significant changes were recorded in hardness, elasticity and chewiness of bread according to the level of substitution of composite flour; bread with 36% substitution was 7% less cohesive, with 27% less volume bread with 20% substitution. The process conditions caused greatest impact on the quality of bread. The new process resulted in a 37% increase in volume, 6% elasticity, 15% of cohesiveness and 44% decrease in hardness and 34% in chewiness, compared to the traditional process. This trend continued the four days following the date of processing. The substitution level of composite flour did not cause significant changes in hardness, elasticity and chewiness of bread, but changes were observed in cohesiveness and volume. Bread with 36% substitution was 7% less cohesive, with 27% less volume than the 20% substitution.

Keywords: Quality multigrain bread, bread process, composite flours.

Introducción

Es conocido a nivel mundial el beneficio del consumo de fibra en la dieta. En los últimos años, esta premisa fue difundida con mayor intensidad y diversos estudios fueron desarrollados para aumentar su integración en la dieta. El comité asesor de las Guías Alimentarias de Estados Unidos (U.S. Department of Agriculture, 2010) ha concluido que existe evidencia científica de que el consumo del grano entero reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, obesidad

y ganancia de peso. El Instituto de Medicina de Washington DC (OIM, 2011) también concluyó que el incremento del consumo de fibra dietética en niños provoca la extensión de vida del adulto mayor.

En Uruguay, según los datos aportados por la última Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos del Instituto Nacional de Estadística (2005), la ingesta de fibra en los hogares urbanos se encuentra entre 8 gramos por día en la población con mayores ingresos y 3 gramos por día en la población con menores ingresos. Este bajo consumo es

una situación que se extiende a nivel mundial. A pesar de los esfuerzos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) para estimular el consumo de 48 gramos por día de grano entero en los ciudadanos de Estados Unidos, las Guías Alimentarias (U.S. Department of Agriculture, 2010) informaron que el consumo medio del adulto es de 8 gramos por día. Menos del 1% de los ciudadanos de Estados Unidos consumen la cantidad recomendada, el 20% no consume grano entero (Marquart, et al., 2013). Los británicos consumen 14 a 16 gramos por día, mientras que la población adulta de Suecia consume 42 gramos por día de grano entero y los daneses consumen 36 gramos por día (Thane, et al., 2007; Kyro, et al., 2012).

Entre las barreras para aumentar el consumo del grano entero se encuentran las preferencias sensoriales de los consumidores, la falta de información en la identificación de los alimentos de grano entero, la accesibilidad, el precio de las harinas de grano entero y el tiempo de preparación de los alimentos de grano entero (Kuznesof, et al., 2012; Ellis, et al., 2005; Lafferty, et al., 2006; Burgess-Champoux, et al., 2006).

El desarrollo de tecnologías para el procesamiento del grano entero que logre un alimento «palatable» y preserve sus propiedades nutricionales es un aspecto fundamental también para favorecer su consumo (Marquart, et al., 2013). Su desarrollo comercial ha sido acotado por la vida útil más corta comparada con las harinas refinadas. El grano entero posee un contenido natural de grasas, aceites y de enzimas lipolíticas que dificultan su incorporación en los alimentos. Crosa et al. (2013), Hansen y Rose (1996), Pomeranz et al. (1992) y Tait et al. (1988) estudiaron la disminución de la calidad del pan debido al enranciamiento de las harinas.

La extrusión fue clasificada como una tecnología de cocción HTST (alta temperatura, corto tiempo) que provoca cambios químicos y físicos deseables en el alimento: destruye o inactiva componentes antinutricionales o tóxicos (inhibidores de tripsina, hemaglutininas, etcétera), enzimas indeseables como la lipoxigenasa, peroxidasa y los microorganismos. A nivel nutricional, el proceso minimiza la degradación de los nutrientes por calor y mejora la digestibilidad por gelatinización del almidón y desnaturalización de la proteína, comparado con los procesos térmicos tradicionales (Crosa, et al., 2013; Robin, et al. 2012; Sosa-Moguel, et al., 2009; Athar, et al., 2006; Brennan, et al., 2011; Killeit, 1994; Turgeon, et al., 2011; Rose, 2008; Sing, et al., 2007; Vetrmani, 1990). El proceso de cocción durante la extrusión provoca cambios en la estructura granular del almidón que afectan las propiedades de hidratación. Según el grado de cocción, ocurre un incremento de la proporción de sólidos dispersables y de restos de gránulos hinchados que determinarán las características reológicas de la dispersión de la harina precocida (Pérez, et al., 2008). La mayor absorción de agua de las harinas extrudidas en relación a las no extrudidas es un aspecto a considerar para su uso en la elaboración del pan.

El pan es un producto «pronto para el consumo» de consumo masivo en la población uruguaya. De acuerdo a la Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos del Instituto Nacional de Estadística (2005), el consumo es de 150 gramos promedio por día de pan elaborado con harina de trigo refinada, siendo despreciable el consumo de pan integral o en base a otros cereales. La sustitución parcial de harina refinada por harina multigrano aporta al pan una mejora nutricional por el aumento de aminoácidos esenciales, fi-

bra, minerales y vitaminas. La soja posee proteínas de alta calidad (41%) particularmente rica en lisina, 27% de fibra total correspondiente a la fracción insoluble, la avena con un 16% de proteínas, 21,3% de fibra total, del cual 3,3% corresponde a fibra soluble. Esta fracción soluble se destaca por su contenido de betaglucanos con importantes beneficios nutricionales: aumentar el contenido gastrointestinal, interferir en la formación de micelas y absorción de lípidos, aumentar la excreción de esteroides y ácidos biliares e inhibir la síntesis de colesterol hepático debido a la absorción del ácido propiónico formado en la fermentación (Matos-Chamorro, 2010). El salvado presenta un alto contenido de fibra total (43,4%), correspondiente a la fracción insoluble.

La inclusión de harinas multigrano en la masa del pan puede provocar una pérdida de su calidad sensorial si no se estudian adecuadamente las condiciones operativas del proceso de panificación. Durante el amasado e hidratación de las proteínas del trigo gluteninas y gliadinas se da lugar a la formación de una red tridimensional, lograda por la polimerización de los enlaces disulfuro entre restos del aminoácido cisteína y otros enlaces que colaboran en la formación de la estructura. En esta etapa el agua se encuentra fuertemente retenida por esta estructura y pasa a formar parte de la misma. La formación de esta red requiere que el trabajo mecánico de amasado prosiga hasta lograr el máximo de enlaces posibles. Esta condición es sustancial para conseguir la mayor retención de los gases formados durante la fermentación dentro de la masa y la que permitirá su esponjamiento.

Cuando en la composición de la masa hay presencia de elementos integrales como granos enteros o parcialmente molidos desde el inicio del amasado, la formación de la red se dificulta, quedando interrumpida en partes, y la masa se debilita provocando defectos en el producto final, como la disminución del volumen y el aumento de la dureza de la miga del pan multigrano (Indrani, et al., 2010 y 2011; Gómez, et al., 2011; Feillet, et al., 1996).

En este trabajo se proponen cambios en la cantidad y el momento de agregado del agua respecto a la receta habitual, tomando en cuenta los cambios en las propiedades funcionales de la harina compuesta precocida por extrusión. El objetivo de este artículo es estudiar el efecto en la calidad del pan elaborado según el nuevo proceso.

Materiales y Métodos

A continuación se describen los análisis fisicoquímicos utilizados para caracterizar la harina compuesta, las medidas de calidad del pan resultante, la caracterización de los procesos de elaboración de harinas y de los panes. Se detallan también los procedimientos experimentales utilizados.

Análisis fisicoquímicos de las harinas

Fueron realizados siete tipos de análisis fisicoquímicos en la harina compuesta.

- **Granulometría**, tamizado en equipo Retsch, con Tamices ASTM #18, #60 y base, en amplitud 60 durante 10 minutos. Medida por triplicado.
- **Proteínas**, expresada en gramos de proteína en 100 g de harina según AACC 46-30, método de combustión en equipo Leco FP-528. Medida por duplicado.

- **Fibra total e insoluble**, expresada en gramos de fibra en 100 g de harina según: Método AOAC 985.29 (AOAC, 2010). Medida por duplicado.
- **Cenizas**, según ISO 2171 (International Organization for Standardization, 2010). Medida por duplicado.
- **Humedad (%H)**, expresada en gramos de agua en 100 g de harina. En la harina de soja se siguió el protocolo de análisis basado en AOCS Bc 2-49. En el resto de las harinas la determinación de humedad fue en base a la técnica AAC 44-40. Medida por duplicado.
- **Materia grasa (%MG)**, expresada en gramos de materia grasa en 100 g de materia seca de la harina. En equipo Soxtec de Tecator, solvente éter de petróleo ppa., se expresa en g/100 g de muestra de harina, luego de determinar el tiempo óptimo de extracción de materia grasa para cada harina. Basado en AOCS Bc 3-49. Medida por duplicado.
- **Medida del índice de absorción de agua (IAA)** según Anderson et al. (1969). Se pesa 2,5 g de muestra en tubos de centrifuga de 50 mL y se le agregan 30 mL de agua destilada, se termostatiza en baño de agua a 30 °C durante 30 minutos, agitándolos cada 5 minutos en un vortex durante 15 segundos. Luego se centrifuga a temperatura ambiente, a 5000 rpm por 30 minutos. Se separa el sobrenadante y se pesa el gel. El IAA se registra como el peso del gel (g) / peso de muestra (g). La medida se realiza por triplicado.

Medidas de calidad del pan

Se analizaron cuatro variables para medir la calidad del pan: color, volumen, textura de la miga por ensayo de TPA y escaneado de la imagen del pan resultante. La medida se realiza por triplicado.

- **Medida del color.** Se realizó en colorímetro HUNTER-LAB PLUS XE. Las medidas de color fueron expresadas por los valores especiales obtenidos por el sistema CIE-L* a* b*; el parámetro L* describe la luminosidad en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco puro), el parámetro a* es matiz del color (+ rojo - verde), y el parámetro b* es matiz del color (+ amarillo - azul). Se determinó el índice de blancura (WI), acorde a Hsu et al. (2003). La medida se realiza por triplicado.

$$WI = 100 - \text{RAIZ}((100-L) \cdot (100-L) + a^*a + b^*b)$$

- **Medida del volumen.** Se realizó por método de desplazamiento de semillas de canola. Se llena totalmente un recipiente plástico de 2,0 L, con semillas de canola, se enrasa y se registra el peso de las semillas. Se coloca el pan en el recipiente, se completa con semillas y se vuelve a enrasar. Se mide el volumen de las semillas que quedaron en la probeta y se registra ese volumen como el volumen del pan. La medida se realiza por triplicado.
- **Ensayo de TPA (Texture Analysis Profile).** Ensayo con texturómetro TA.XT2 usando un cilindro de 36 mm con bordes redondeados, en las siguientes condiciones de medida: Test speed: 1 mm/sec, 40% deformación en 2,43 ± 0,02 cm (dos rodajas) y 5 segundos de relajación. Se realizaron seis repeticiones en cada ensayo. Las muestras se cortaron en rebanadas de 2,5 cm de

Nivel de sustitución	N1: 20%		N2: 36%	
	%	Gramos	%	Gramos
Harina de trigo panadera (000)	80	1200	64	960
Harina compuesta	20	300	36	540
Aceite	3	45	3	45
Agua masa blanca	48	720	38,4	576
Agua prehidratación	20	300	36	540
Sal	1,5	22,5	1,5	22,5
Levadura seca instantánea (Lesaffre Group)	1,4	21	1,4	21
Gluten vital	4	60	4	60
Sp+ (mejorador de pan Nutrigold: Super pan plus)	0,8	12	0,8	12

Tabla 1. Formulación del pan en los dos niveles de sustitución de harina precocida por extrusión.

altura, la medida se realizó en el centro de la rebanada. El valor de la fuerza máxima del ensayo se interpretó como la dureza de la miga de pan; la recuperación de la altura de las rodajas luego de ser comprimidas una vez se asoció con la elasticidad; la relación entre las dos áreas (a2/a1) con la cohesividad, y la masticabilidad del pan se interpretó como el resultado del producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad (Bourne, 2002).

- **Imagen escaneada.** Se escanea una rodaja de 1,5 cm de espesor de pan. La medida se realiza por triplicado.

Proceso de elaboración de las harinas

Las harinas fueron elaboradas en la planta semi-industrial del Centro Cereales y Oleaginosas del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (9 de Julio, Buenos Aires, Argentina). Los granos de avena, sorgo y soja fueron clasificados, limpios y molidos en molino de martillo hasta un tamaño de partícula inferior a 4 mm. El germen y salvado no se molieron previo a la extrusión. Fueron procesados en una extrusora de tornillo simple de tres secciones con las siguientes especificaciones: longitud del barril 200 mm; diámetro del barril 105 mm; velocidad de tornillo de 60 rpm. La velocidad de alimentación de la extrusora fue en promedio 550 kg/h y el tiempo de residencia promedio del producto en la misma fue de tres segundos. En el procesamiento de la soja y el germen, la torta obtenida luego de la extrusión se desgrasó parcialmente mediante prensa-tornillo. En la siguiente etapa se procedió al enfriado y secado de las harinas mediante una corriente de aire que es forzada a pasar a través de la columna de secado. Por último, se llevó a cabo la molienda final en molino de martillo hasta la granulometría deseada para cada harina. Todos los productos finales fueron envasados en bolsas de papel Kraft (doble lámina) con lámina interna de polietileno.

Proceso de elaboración de pan

Los ingredientes del pan fueron: 1500 g en total de harina (mezcla de harina refinada-harina precocida por extrusión), aceite (45 g), sal (1,5 g), levadura seca instantánea (1,4 g), gluten vital (4 g), mejorador de pan (0,8 g).

Se elaboró pan con dos niveles de sustitución de harina precocida por extrusión por harina refinada, N1: 20% y N2: 36%. El volumen de agua agregado en cada receta varió según la relación harina refinada y compuesta. Se mantuvo la misma relación de peso de agua y peso de harina refinada (0.6:1) y la misma relación del agua con harina compuesta (1:1). En la Tabla 1 se describe la receta del pan según el nivel de sustitución de la harina refinada por la harina precocida por extrusión o harina compuesta.

Ensayo de panificación

Las diferencias entre los procesos de elaboración de pan consistieron en la forma en que se combina el agua con los ingredientes y en el momento en que se agregó la harina compuesta durante la panificación. A continuación se describen:

- Descripción procedimiento P1:** Se mezclaron los ingredientes secos, incluyendo la harina compuesta, menos la levadura. Se agregó el 80% del agua total y se amasó en velocidad lenta (123 rev/min de batidor y 12 rev/min del tacho), una vez hidratados los ingredientes se agregó el aceite y el resto del agua amasando en velocidad lenta hasta completar los 5 minutos. Se continuó amasando en velocidad rápida (185 rev/min de batidor y 17 rev/min del tacho) y pasados 2 minutos se agregó la levadura. Una vez que la masa quedó elástica se interrumpió el amasado y se dejó descansar por 30 minutos (F1) el amasado. Pasado este tiempo, se pesaron bollos de 198 g, se dejaron descansar por 15 minutos (FI), se armaron y se estibaron. Se realizó la fermentación final en cámara (35 °C y 80% HR) durante 75 minutos. Luego se cocinaron en horno a 200 °C por 25 minutos, se desmoldaron una vez sacado del horno y se dejaron enfriar por 2 horas.
- Descripción procedimiento P2:** La elaboración de pan mediante este procedimiento presentó dos etapas. En una primera instancia se elaboró una masa blanca, homogénea y elástica y posteriormente se agregaron las harinas compuestas, prehidratadas como se detalla a continuación. En ambos procesos se incorpora la misma cantidad de agua en total que en el procedimiento P1. Se prehidrató la harina compuesta en proporción Harina: Agua de 1:1 con el inicio del proceso de elaboración. Se mezclaron los ingredientes secos menos la levadura y la harina compuesta, se agregaron el 80% del agua para la masa blanca y se amasaron a velocidad lenta. Una vez hidratados, se agregó el aceite, el resto del agua y se continuó amasando hasta completar los 5 minutos. Luego se amasó a velocidad rápida y pasados 2 minutos se incorporó la levadura. Una vez formado el gluten y al haber obtenido una masa elástica se interrumpió el amasado y se dejó descansar el amasado por 30 minutos. Cumplido el descanso de la masa blanca, se unieron las harinas prehidratadas amasando un minuto en velocidad lenta y dos minutos en velocidad rápida. Pasado

este tiempo se dejó descansar el amasado en bloque por 15 minutos, para luego pesar bollos de 198 g y se dejó descansar por 15 minutos más. Se armaron, se estibaron y luego se realizó la fermentación final en cámara (35 °C y 80%HR) durante 75 minutos. Por último se cocinó en horno a 200 °C durante 25 minutos, se desmoldó y se dejó enfriar por dos horas.

Diseño estadístico

- Comparación del procedimiento de elaboración y nivel de sustitución.** Se realizó un diseño completamente aleatorizado (DCA). Los tratamientos consistieron en un factorial de 2 niveles en proceso de elaboración (P1 y P2) y 2 niveles en sustitución de harina precocida por extrusión (20% y 36%). Cada tratamiento se realizó por duplicado y consistió en un amasado (unidad experimental) del cual se obtuvieron 8 panes de 198 g. Se realizaron análisis de varianza para el modelo completo y las diferencias de medias fueron testeadas por el test «t» o diferencia mínima significativa (LSD). Las variables del ensayo fueron volumen, color, textura (ensayo TPA).
- Seguimiento de textura durante el almacenamiento.** Se realizó el ensayo de textura TPA en unidades de pan provenientes de cada tratamiento durante 4 días consecutivos. Para cada tratamiento se calculó la media e intervalo de confianza en cada día. Los datos fueron analizados según un diseño completamente aleatorizado de 4 tratamientos, tomándose los días como repeticiones, considerando las medidas repetidas en el tiempo y ajustando una matriz de correlación temporal AR(1) (autoregresiva de orden 1) y CS (simétrica compuesta).

Resultados

Caracterización fisicoquímica de la harina compuesta

La harina compuesta fue formulada en base a avena, salvado y soja, dando lugar a una composición porcentual: 4,4% de cenizas, 9% humedad, 1,1% fibra soluble, 29,5% fibra insoluble, 5% materia grasa, 24,5% proteína.

El tamaño de grano de la harina se compone de las siguientes partes: 17% fue retenido por malla 1 mm (tamiz 18), 35,8% fue retenido por malla 0,42 mm (tamiz 40), 14% fue retenido por malla 0,25 mm (tamiz 60), 15,8% fue retenido por malla 0,177 mm (tamiz 80) y el 17,5% quedó en la base.

La harina compuesta extrudida presentó un índice de absorción de agua de $5,8 \pm 0,2$ g agua/g harina y $4,07 \pm 0,2$ g en la harina sin extrusión de la misma granulometría a la extrudida.

Comparación de los procesos en el pan recién elaborado

Se presentan en la Figura 1 las imágenes obtenidas por escaneo y en la Tabla 2 los resultados de las medidas de textura, volumen y color del pan según los 4 tratamientos con un día de almacenamiento.

Factor		Textura								Volumen		Color					
		Dureza		Elasticidad		Cohesividad		Masticabilidad				L		A		B	
		Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS	Medias	P-valor DMS
Proceso	P1	1117 a	0,0133 324	0,90 a	0,0133 0,022	0,57 a	0,0025 0,0339	6629 a	0,0202 1686	418 a	0,0080 88	58,57 a	0,0003 0,30	5,22 a	0,0582 0,14	15,25 a	0,1231 0,41
	P2	622 b		0,94 b		0,66 b		4362 b		573 b		59,85 b		5,09 a		14,96 a	
%sustitución	20	760 a	0,1349 324	0,92 a	0,3390 0,022	0,64 a	0,0213 0,0339	5004 a	0,1808 1686	575 a	0,0074 88	62,23 a	<0,0001 0,30	4,62 a	<0,0001 0,14	15,02 a	0,3116 0,41
	36	979 a		0,92 a		0,59 b		5987 a		416 b		56,19 b		5,69 b		15,19 a	
Interacción: Proceso %sustitución		0,9447		0,2444		0,9473		0,9329		0,0874		0,0309 0,4288		0,0342 0,1978		0,1546	

Tabla 2. Medidas de volumen y color según los 4 tratamientos en pan con un día de elaboración. Los parámetros de textura informados en la tabla corresponden a la interpretación de la curva durante la compresión del pan hasta un 40%. Dureza corresponde a la fuerza máxima, elasticidad a la recuperación de la altura de las rodajas luego de ser comprimidas una vez, cohesividad a la relación entre las dos áreas (a2/a1) y masticabilidad se calculó como el producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad. Se presentan las medias, Pvalor y DMS de cada variable analizada. Letras iguales entre valores indican que no existen diferencias significativas entre efectos con un 95% de confianza.

Interacción proceso* nivel de sustitución								
Variable estudio: L			Variable estudio: a			Variable estudio: WI		
Proceso	%sustitución	Medias	Proceso	%sustitución	Medias	Proceso	%sustitución	Medias
P1	36	55,73 a	P2	20	4,47 a	P1	36	52,85 a
P2	36	56,65 b	P1	20	4,77 b	P2	36	53,72 b
P1	20	61,41 c	P1	36	5,67 c	P1	20	58,21 c
P2	20	63,05 d	P2	36	5,70 c	P2	20	59,96 d

Tabla 3. Estudio del efecto de la interacción entre «proceso» con «nivel de sustitución» con 95% de confianza.

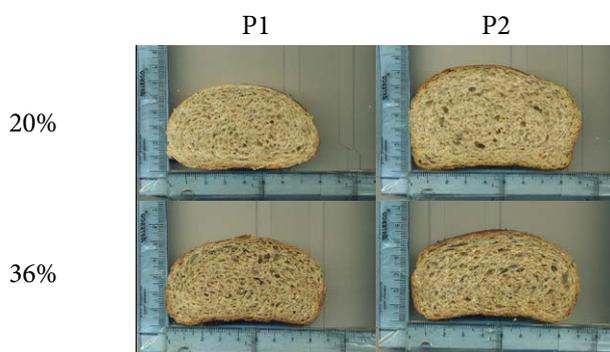


Figura 1. Imagen escaneada de una rodaja de pan en los 4 tratamientos. En las columnas se ubican los panes elaborados según el proceso P1 y P2. En las filas se ubican los panes elaborados con 20% y 36% de sustitución.

Seguimiento de textura durante almacenamiento

A continuación se presenta en forma gráfica la variación durante 4 días consecutivos de las medidas de compresión del pan. Cada medida se interpreta con un parámetro de textura: fuerza máxima (dureza), recuperación de la altura luego de la primera compresión (elasticidad), relación entre dos áreas (cohesividad) y masticabilidad como el producto de las tres mediciones. Se informan las medias y los intervalos de confianza (95%) de estos parámetros por día en cada tratamiento (Gráficos 1, 2, 3 y 4).

En la Tabla 5 se presenta el ANOVA tomando el día de medida y considerando las repeticiones independientes para cada tratamiento.

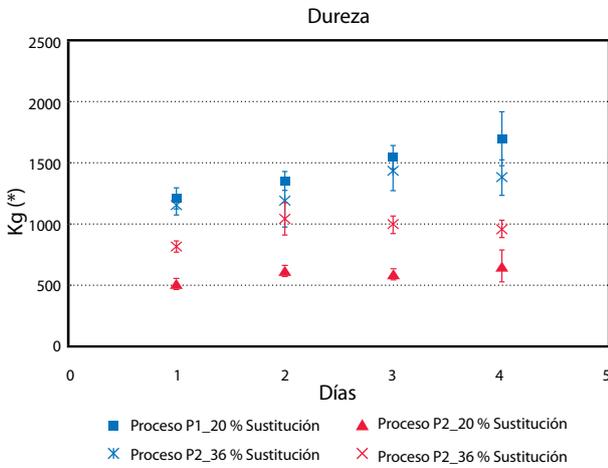


Gráfico 1. Medida de la fuerza máxima en el ensayo de compresión (TPA), interpretada como la dureza de la miga de pan, según el nivel sustitución de harina compuesta (20%, 36%) y el proceso de elaboración (P1 y P2). Se presentan la media y el intervalo de confianza (95%)

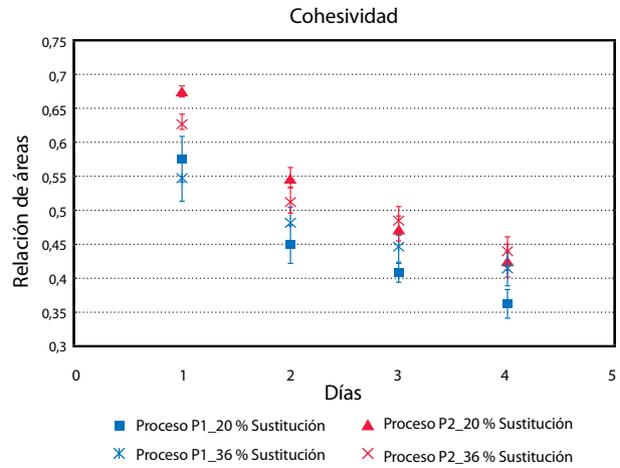


Gráfico 3. Relación de las áreas del ensayo de TPA, interpretado como un parámetro de cohesividad de la miga de pan elaborado con dos niveles de sustitución de harina compuesta (20%, 36%) y dos procedimientos (P1 y P2). Se presenta la media y el intervalo de confianza (95%)

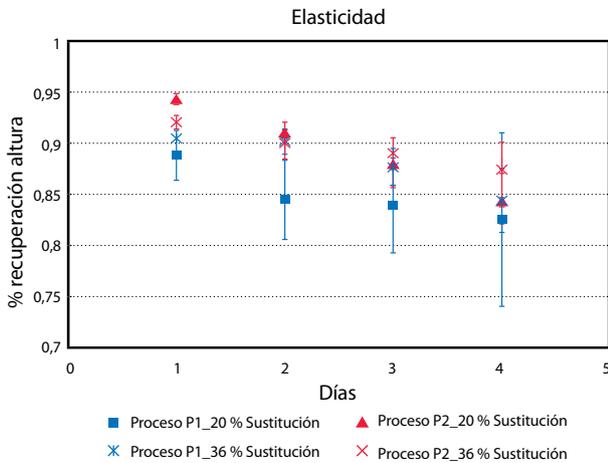


Gráfico 2. Medida del grado de recuperación de su altura luego de la primera compresión, asociada con la elasticidad de la miga del pan elaborado según el nivel sustitución de harina compuesta (20%, 36%) y el proceso de elaboración (P1 y P2). Se presenta la media y el intervalo de confianza (95%)

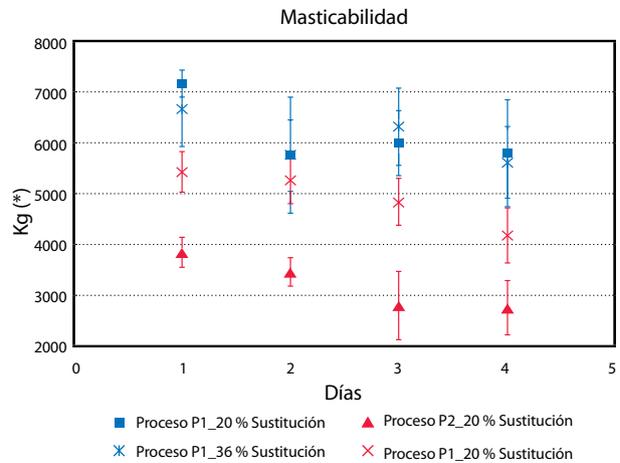


Gráfico 4. Cálculo de masticabilidad de la miga de pan, con dos niveles de sustitución de harina compuesta (20%, 36%) y dos procedimientos (P1 y P2). Se presenta la media y el intervalo de confianza (95%)

Factor		Textura							
		Dureza		Elasticidad		Cohesividad		Masticabilidad	
		medias	P-valor Error std	medias	P-valor Error std	medias	P-valor Error std	medias	P-valor Error std
Proceso	P1	1367 a	<0,0001	0,8653 a	0,0738	0,4599 a	0,1734	6128 a	<0,0001
	P2	775 b		0,8950 a		0,5224 a		4066 b	
Nivel de sustitución	20	1022 a	0,1851	0,8718 a	0,927	0,4891 a	0,9277	4690 b	0,0139
	36	1120 a		0,885 a		0,4931 a		5504 a	
Proceso* Nivel sustitución		0,0031		0,3201		0,6718		0,0080	

Tabla 4. Resumen de análisis de varianza, promedios de los efectos principales y la interacción en el seguimiento de la textura del pan. Letras iguales entre valores en columna indican diferencias no significativas entre los procesos o los porcentajes de incorporación para un nivel de significancia del 5%.

Efecto interacción proceso – Nivel de sustitución					
Variable estudio: Dureza			Variable estudio: Masticabilidad		
Proceso	Nivel de Sustitución	Medias	Proceso	Nivel de Sustitución	Medias
P1	20	1446 a	P1	20	6170 a
P1	36	1288 a	P1	36	6086 a b
P2	36	952 b	P2	36	4921 b
P2	20	598 c	P2	20	3211 c

Tabla 5. Estudio del efecto de la interacción entre «proceso» con «% sustitución» significativas (5%).

Discusión

En la Figura 1 se presentan las imágenes obtenidas por scaneo del pan y se observa a simple vista el mayor desarrollo de los panes mediante el procedimiento P2 en relación al P1.

Según se aprecia en la Tabla 2, en las variables de textura y volumen el efecto de la interacción entre «proceso» y «nivel de sustitución» resultó no significativa, por lo cual en este caso se suma el impacto de los efectos (modelo aditivo). El estudio del efecto «proceso» presentó diferencias significativas en las variables que describen la textura del pan y en el volumen. El proceso P1 da panes significativamente más duros, menos elásticos, menos cohesivos, de mayor masticabilidad y menor volumen. Según el efecto «nivel de sustitución», en las variables dureza, elasticidad y masticabilidad no se observaron diferencias significativas. La cohesividad y el volumen del pan resultaron significativamente menores en el pan con 36% de sustitución para cualquier proceso de elaboración.

En cuanto al color, se observó efecto significativo de la interacción en las variables: luminosidad de los panes (L), (a) e índice de (WI). En L y WI todos los tratamientos resultaron estadísticamente significativos y con el mismo orden de medias, de mayor a menor: P1-36, P2-36, P1-20, P2-20. El orden de las medias responde al nivel de sustitución, siendo 36% el de menor luminosidad y WI, y los procesos siguen el orden P1 con menor luminosidad que P2. Respecto al 20% de sustitución de harina compuesta, la variable a presentó diferencias significativas en los panes con 36%, con un matiz de color más cercano al rojo. En el porcentaje de sustitución del 20% se observó un efecto del proceso, por lo que el proceso P1 resultó con matices más rojos que P2 (Tabla 3).

En el seguimiento de la textura del pan durante el almacenamiento los Gráficos 1, 2, 3 y 4 expresan las tendencias de los resultados obtenidos. En el Gráfico 1 se observa que el pan elaborado según el proceso P1 presentó un aumento más marcado de la dureza durante los cuatro días de seguimiento en relación al P2. En cuanto a los parámetros de elasticidad y cohesividad, se observó para ambos tipos de pan una disminución de los valores con el tiempo. Ocurrió una leve disminución de la masticabilidad en todos los tratamientos, con diferencias significativas entre el proceso y porcentaje de sustitución.

Si bien en los gráficos se observan tendencias de respuesta de los tratamientos en el tiempo, los datos no se ajustaron a un modelo de regresión lineal y se investigó otra forma de análisis de datos. Para ello se midió la posible autocorrelación de los datos experimentales a través del tiempo de estudio, ajustándose un modelo de medidas repetidas en el tiempo bajo tres condiciones de autocorrelación: autorregresiva de primer

orden (AR1), Simétrica Compuesta (CS) y de Independencia. Estas tres condiciones fueron comparadas mediante los índices de Akaike Corregido (AICC) y el Índice Bayesiano corregido (BIC). Los resultados indicaron un mejor comportamiento del modelo de independencia entre observaciones, siendo los valores de AICC y BIC menores (160,4 y 160,5, respectivamente) frente a las condiciones de AR1 y CS (163,4 y 163,6, respectivamente, e iguales para los dos modelos).

Considerando los días de medida como repeticiones independientes, el pan elaborado según el procedimiento P1 fue significativamente más duro y de mayor masticabilidad. En las medidas de elasticidad y cohesividad no se observaron diferencias significativas según el proceso. De acuerdo al porcentaje de sustitución, se observaron diferencias significativas entre los niveles en masticabilidad y en el resto de las variables no se observaron diferencias significativas (Tabla 5).

En la Tabla 5 se presenta el estudio de la interacción entre los factores. Los valores de dureza de la miga de pan cuando se aplica el proceso P1 no se diferenciaron entre sí según el nivel de sustitución y fueron significativamente mayores a los panes elaborados según el proceso P2. Sin embargo, la dureza del pan elaborado según el proceso P2 se diferenció según el nivel de sustitución, aumentando con este.

Conclusiones

El proceso recomendado (P2) para la elaboración de pan con harinas compuestas mejora significativamente la calidad del pan y estas mejoras se mantienen en el tiempo. El proceso genera panes significativamente menos duros, más elásticos, más cohesivos, de menor masticabilidad y mayor volumen. El proceso P2 también afecta el índice de blancura del pan, siendo los panes elaborados según el proceso habitual (P1) más oscuros que los elaborados según el proceso P2.

El nivel de sustitución de harina precocida por extrusión afecta significativamente el volumen y el color del pan. Se observó una notoria disminución del volumen de pan con el 36% de sustitución, resultados concordantes con la bibliografía de referencia (Indrani, et al., 2010 y 2011; Gómez, et al., 2011). El pan con mayor nivel de sustitución (36%) es más oscuro y menos luminoso.

Reconocimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por apoyar la investigación con un 60% de subsidio.

Referencias

- AACC International, 1999. *Approved methods of analysis*. 10a ed. St. Paul: AACC Internacional. Method 44-40.
- AACC International, 1999. *Approved methods of analysis*. 10a ed. St. Paul: AACC Internacional. Method 46-30.01.
- American Oil Chemist's Society, 2009. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. ed. Urbana: AOCS. Official Method Bc 2-49.
- American Oil Chemist's Society, 2009. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. Ed. Urbana: AOCS. Official Method Bc 3-49.
- Anderson, R. A., Conway, H. F, Pfeifer, V. F y Griffin E. L., Jr., 1969. Roll and extrusion cooking of grain sorghum grits. En: *Cereal Science Today*, 14, pp.372-375.
- AOAC International, 2010. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18a. ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 985.29.
- Athar, N., Hardacre, A., Taylor, G., Clark, S., Harding, R. y McLaughlin, J., 2006. Vitamin retention in extruded food products. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, pp.379-383.
- Brennan, Ch., Brennan, M., Derbyshire, E., Tiwari, B.K., 2011. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. En: *Trends in Food Science Technology*, 22(10), pp.1-6.
- Burgess- Champoux, T., Marquart, L., Vickers, Z. y Reicks, M., 2006. Perceptions of children, parents, and teachers regarding whole-grain foods, and implications for school-based intervention. En: *J. Nutr. Educ. Behav*, 38, pp.230-237.
- Bourne, Malcolm C., 2002. *Food texture and viscosity: concept and measurement*. Melbourne: Academic Press. (Food Science and Technology. International Series).
- Crosa, M. J., Curia, A., Curutchet, A., Cadenazzi, M., Dotta, G., Ferreyra, V., Maidana, F, Souto, L. y Escudero, J., 2013. Estudio comparativo de la estabilidad lipídica de harinas de soja, sorgo, avena, salvado y germen de trigo con y sin extrusión. En: *INNOTEC*, (8), pp.30-38.
- Ellis, J., Johnson, M.A., Fischer, J.G. y Hargrove, J. L., 2005. Nutrition and health education intervention for whole grain foods in the Georgia older Americans nutrition programs. En: *J. Nutr. Elder*, 24, pp.67-83.
- Feillet, P., Guinet, R., Morel, M. H., Rouau, X., 1996. La masa, formación y desarrollo. En: Godon, Bernard, Guinet, Roland. *La panificación aspectos socioeconómicos, materias primas, agentes de fermentación, tecnología, calidad*. Barcelona: Montagud. pp.245-295.
- Gómez, M., González, J., Oliete, B., 2011. Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. En: *Food Science and Technology*, 44, pp.2231-2237.
- Hansen, L., y Rose, M. S., 1996. Sensory acceptability is inversely related to development of fat rancidity in bread made from stored flour. En: *J. Am Diet. Assoc.*, 96, pp.792-793.
- HSU, C. L., Chen, W., Weng, Y. M. y Tseng, C. Y., 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. En: *Food Chemistry*, 83, pp.85-92.
- Indrani, D., Soumya, C., Rajiv, J. y Venkateswara Rao, G., 2010. Multigrain Bread- Its dough rheology, microstructure, quality and nutritional characteristics. En: *Journal of texture studies*, 41, pp.302-319.
- Indrani, D., Swetha, P., Soumya, C., Rajiv, J. Venkateswara Rao, G., 2011. Effect of multigrains on rheological, microstructural and quality characteristics of north Indian parotta-An indian flat bread. *LWT. En: Food Science and Technology*, 44, pp.719-724.
- Instituto Nacional de Estadística, 2005. *Los alimentos y las bebidas en los hogares. Encuesta Nacional de Gastos e Ingresos de los Hogares 2005-2006*. Montevideo: INE.
- International Organization For Standardization (Suiza), 2010. ISO 2171: *Cereales, legumbres y subproductos. Determinación del rendimiento de cenizas por incineración*. Ginebra: ISO.
- Killeit, U., 1994. Vitamin retention in extrusion cooking. En: *Food Chemistry*, 49, pp.149-155.
- Kuznesof, S., Brownlee, L.A., Moore, C., et al., 2012. Whole heart study participant acceptance of whole grain foods. En: *Appetite*, 59, pp.187-193.
- Kyro, C., Skeie, G., Dragted, L.O., et al., 2012. Intake of whole grain in Scandinavia: intake, sources and compliance with new national recommendations. En: *Scand. J. Public Health*, 40, pp.76-84.
- Lafferty, A., Marquart, L. y Reicks, M., 2006. Hunting for whole grains: a supermarket tour. En: *J. Nutr. Educ. Behav*, 38, pp.197-198.
- Marquart, L., Jonnalagadda, S.S., Van Klinken, B. J-W., Clemens, R., Jensen, G., Arndt, E. y Webb, D., 2013. En: *Food Technology*, 07(13), pp.52-62.
- Matos-Chamorro, A. y Chambilla-Mamani, E., 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. En: *Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), pp.4-17.
- OIM (Institute of Medicine), 2011. *Leveraging food technology for obesity prevention and reduction efforts - workshop summary*. Washington: National Academies Press.
- Pérez, A., Drago, S. R., Carrara, C.R., De Greef, D., Torres, R. y González, R. J., 2008. Extrusion cooking of a maize/soybean mixture: factors affecting expanded product characteristics and flour dispersion viscosity. En: *Journal of Food Engineering*, 87, pp.333-340.
- Pomeranz, Y., 1992. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. En: Sauer, D. B., ed. *Storage of cereal grains and their products*. 4a ed. Florida: AACC International. pp.55-141.
- Robin, F., Schuchmann, H. P., Palzer S. y Stefan, 2012. Dietary fiber in extruded cereals: limitations and opportunities. En: *Trends in Food Science & Technology*, 28, pp.23-32.
- Rose, D. J., Ogdan, L., Dunn, M.L. y Pike, O.A., 2008. Enhanced lipid stability in whole wheat flour by lipase inactivation and antioxidant retention. En: *Cereal Chemistry*, 2, pp.218-223.
- Sing, S., Gamlath, S. y Wakeling, L., 2007. Nutritional aspects of food extrusion: a review. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 42, pp.916-929.
- Sosa Moguel, O., Ruiz-Ruiz, J., Martínez-Ayala, A., Gonzalez, R., Drago, S., Betancur-Ancona, D. y Chel-Guerrero, L. 2009. Effect of extrusion conditions and lipxygenase inactivation treatment on physical and nutritional properties of corn/cowpea (*Vigna unguiculata*) blends. En: *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60(S7), pp.341-354.

- Tait, S.P. y Galliard, T., 1988. Effect of baking quality of changes in lipid composition during wholemeal storage. En: *Journal of Cereal Science*, 8, pp.125-137.
- Thane, C.W., Jones, A.R., Stephen, A.M., Seal, C. J. y Jebb, S.A., 2007. Comparative whole –grain intake of British adults in 1986-7 and 2000 – 1. En: *Br. J. Nutr.*, 97, pp.987-992.
- Turgeon, S., Rioux, L., 2011. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. En: *Food Hydrocolloids*, 25, pp.1915-1924.
- U.S. Department of Agriculture y U.S. Department of Health and Human Services. Dietary guidelines for americans, 2010. 7a ed. Washington: U.S. Government Printing Office. pp. 29-30.
- Vetrimani, R., Haridas, R., 1990. Studies on stabilization of wheat bran. En: *Journal of Food Science and Technology*, 27, pp.332-335.

Chips de papa, la fritura en vacío y beneficios para la salud

Potatoes chips, vacuum frying and health profits

Crosa, María José ⁽¹⁾, Elichalt, Marta ⁽⁶⁾, Skerl, Verónica ⁽¹⁾, Cadenazzi, Mónica ⁽⁵⁾, Olazábal, Laura ⁽³⁾, Silva, Roberto ⁽²⁾, Suburú, Gabriela ⁽²⁾, Torres, Marina ⁽³⁾, Vilaró, Francisco ⁽⁴⁾, Estellano, Gabriel ⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Gerencia de Proyectos Alimentarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽²⁾ Laboratorio de Cereales y Oleaginosos, Gerencia de Análisis y Ensayos, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽³⁾ Desarrollo de métodos analíticos, LATU –

⁽⁴⁾ Programa Nacional de Investigación Hortícola, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIA –

⁽⁵⁾ Consultor Estadístico – ⁽⁶⁾ Escuela de Nutrición, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay – ⁽⁷⁾ DETRICAR S.A.

Contacto: mjcrossa.b@gmail.com

RECIBIDO: 29/05/2014 - APROBADO: 20/10/2014

Resumen

Existe una tendencia del mercado al consumo de alimentos más saludables que ha motivado a la industria alimentaria a innovar en tecnologías. La fritura en vacío es una tecnología alternativa a la fritura tradicional que preserva las propiedades sensoriales del snack frito y mejora la calidad nutricional.

El objetivo del trabajo fue estudiar los beneficios nutricionales y para la salud y las características organolépticas de chips de papa elaborados por fritura en vacío en relación a los elaborados por fritura tradicional y diferenciarlos de los actualmente presentes en el mercado uruguayo.

Los chips elaborados por fritura en vacío presentaron en promedio un 50% menos de materia grasa y un 90% menos de acrilamida que los chips elaborados por fritura tradicional. Sensorialmente fueron muy bien evaluados en todos los atributos menos en la percepción de intensidad de sabor salado.

Palabras clave: Acrilamida, lípidos, aceptabilidad sensorial.

Abstract

The new tendency of the consumers to eat healthier foods which has impacted the market has motivated the food industry to innovate in technologies. Vacuum frying is an alternative to traditional frying that preserves the sensory properties of fried snacks and improves its nutritional quality.

The objective of this work is to study the nutritional and health benefits as well as the organoleptic characteristics of potato chips prepared by vacuum frying in relation to those made by traditional frying, and differentiate them from those that are currently present in the Uruguayan market.

The chips produced by vacuum frying showed an average of 50% less fat content and 90% less acrylamide than chips made by traditional frying. In sensory evaluation of chips, consumers gave both chips with good acceptance in all attributes but the perception of salt taste intensity.

Keywords: Acrylamide, color, sensory acceptability.

Introducción

La alimentación es un factor importante para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Está bien establecida su función como factor contribuyente de determinadas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) y eso la convierte en componente fundamental de las actividades de prevención (OMS, 2002b). En la Región de las Américas las ECNT son las principales causas de muerte y discapacidad. Uruguay no es ajeno a esta realidad, ya que las ECNT constituyen las principales causas de morbimortalidad, el origen de la mayor parte de las discapacidades que presentan los individuos y son responsables de más del 60% de las defunciones. Estas enfermedades generan, además, una enorme carga para los sistemas de salud, los servicios sociales y los individuos, determinando en nuestro país el 60% del total de

los costos de atención médica (Ministerio de Salud Pública, 2014; Nutrición 21, 2004; OMS, 2003).

Investigaciones realizadas en Uruguay (Marians, et al., 2011) revelan la información nutricional de chips de papa declarada en el etiquetado de 49 productos. En el estudio se incluyeron productos de imitación preparados a partir de papa deshidratada como fécula o almidones nativos o modificados, gluten de trigo y aceites comestibles, disponibles en las cadenas de supermercados de Montevideo. Los resultados muestran que la cantidad de lípidos declarados es en promedio de 31,9%, con un rango entre 25,6% a 37,2%.

En este artículo se presenta una tecnología de fritura alternativa a la fritura tradicional que mejora las propiedades nutricionales de los chips, manteniendo su sabor y textura.

Existen estudios científicos acerca de los beneficios nutricionales y sensoriales del proceso de la fritura en vacío en compa-

ración con la fritura tradicional. Sus beneficios están asociados con la menor temperatura de fritura y la menor exposición con el oxígeno. En este proceso el alimento se sumerge en aceite en condiciones de presión sub-atmosférica en un sistema cerrado. La presión de trabajo disminuye la temperatura de ebullición del agua contenida en el alimento, permitiendo la disminución de la temperatura del aceite durante la fritura sin afectar negativamente la textura característica del alimento frito (Dueik, et al., 2009; Da Silva, et al., 2008).

Estudios del deterioro del aceite de fritura realizados en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (Crosa, et al., 2014) confirmaron la importancia de la fritura en vacío en la disminución de las reacciones de degradación del aceite. Se estudiaron los cambios de acidez, índice de p-Anisidina, compuestos polares y estabilidad oxidativa del aceite durante la fritura en vacío y fritura tradicional de chips de papa. La calidad del aceite refinado de girasol con 85% de alto oleico luego de 40 horas de fritura en vacío fue: acidez g oleico/g aceite (0,099), índice de p-Anisidina (33), % compuestos polares (6,4), estabilidad oxidativa (2,67). Mientras que la calidad del aceite luego de 40 horas de fritura tradicional presentó alteraciones severas que se detallan a continuación: acidez en g oleico/g aceite (0,327), índice de p-Anisidina (82), % compuestos polares (21,9) y estabilidad oxidativa (0,65). La ingesta de aceite con este grado de deterioro afecta negativamente la salud debido a que los compuestos polares son sustancias muy reactivas al oxígeno a nivel plasmático. Estos compuestos han sido relacionados en animales de experimentación con retraso del crecimiento, hipertrofia e hiperplasia hepática, hígado graso, úlceras gástricas y lesiones en corazón y riñón (Suaterna, 2009).

Un estudio realizado en la Facultad de Química de la Universidad de la República (Grompone, 2009) advierte que un alto número de chips comercializados aun con vida útil vigente tienen severas alteraciones con alto contenido en compuestos polares. La legislación uruguaya admite en el aceite de fritura un máximo del 25% m/m de compuestos polares (Uruguay, 2012).

A su vez, Granada, Moreira y Tichy (2004) compararon la formación de acrilamida en chips de papa procesados por fritura en vacío y tradicional. Resultados de sus estudios indicaron una disminución del 94% de acrilamida en los chips procesados por fritura en vacío. OMS y FAO (2002a) reconocieron la importancia de la presencia de la acrilamida en los alimentos para los humanos, por su incidencia en el bajo peso en los recién nacidos e inducción de cáncer y mutaciones hereditarias en animales de experimentación. Adicionalmente, la exposición a bajos niveles causa daño en el sistema nervioso (Valenzuela, 2007). La OMS no indica un valor umbral para el riesgo de acrilamida, por lo que no es posible identificar un nivel seguro de exposición. Recomienda minimizar cualquier riesgo existente, incluyendo, entre otros, optimizar la formulación, el procesamiento y las condiciones de cocción para minimizar y posiblemente eliminar los niveles de acrilamida en los alimentos preparados en la industria y en el hogar.

El Codex Alimentarius (2009) elaboró un informe técnico de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos. La OMS indica que la ingesta de acrilamida es muy variable y la estima entre 0,3 a 0,8 μg por kilo de peso corporal por día ($\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$). Se anticipa que la ingesta en niños puede ser mayor a dos o tres veces la de un adulto cuando se expresa sobre la base del peso corporal (OMS y FAO, 2002a).

En cuanto al ingreso de aceite en los chips procesados por fritura en vacío existen reportes científicos contradictorios. Resultados de las investigaciones de Troncoso et al. (2009)

indicaron un aumento del contenido de aceite en los chips de papa procesados por fritura en vacío. Según sus investigaciones, ocurre un importante ingreso de aceite en el momento que finaliza la fritura y se recompone la presión atmosférica. El aceite adherido a la superficie del chip ingresa a presión al alimento hasta recuperar la igualdad de presiones. Sin embargo, otros grupos de autores obtuvieron resultados diferentes. Dueik et al. (2009) informaron una reducción del 50% en el contenido de aceite en chips de zanahoria debido a la fritura en vacío respecto a la fritura tradicional. Mariscal et al. (2008) reportaron que el contenido de aceite en los chips de boniato y de mango procesados por fritura en vacío fue significativamente menor al de los chips procesados por fritura tradicional. No obstante, en los chips de mango no se observaron diferencias significativas en el contenido de aceite según el proceso de fritura. Este grupo de científicos concluyó que las variables que rigen el proceso de impregnación del aceite en el alimento son: el escurrido del aceite de la superficie del chip y la succión que ocurre en el poro del chip debido a la disminución del volumen del vapor de agua cuando el chip se enfría. Los autores concluyeron que es necesario escurrir el aceite de la superficie antes de recomponer la presión del sistema para controlar y disminuir la impregnación del aceite en el alimento.

Por otra parte, un cambio en el contenido de aceite del chip puede afectar el grado de aceptación de los consumidores. La calidad sensorial de un chip de vegetal está relacionada con su textura crujiente, color dorado uniforme y brillante, el sabor y aroma característicos por la incidencia del propio aceite y por nuevas sustancias producidas durante el proceso (Morales, 2008). Los estudios a consumidores permiten conocer si los cambios en formulación y/o proceso afectan la aceptabilidad sensorial de los nuevos productos desarrollados (Morten, 2006).

El color del chip influye en la aceptabilidad sensorial del alimento, pero también es un parámetro de control del proceso de fritura. Los cambios de los parámetros L, a, b del sistema CIE-L* a* b*, se asocian con reacciones de pardeamiento, degradación o pérdida de pigmentos respecto al vegetal fresco. Shyu y Hwang (2001) estudiaron la preservación del color y sabor en los alimentos elaborados por fritura en vacío. Dueik et al. (2009) correlacionaron la disminución del valor de los parámetros a* y b* del chip de zanahoria con la degradación de los carotenoides según la condición de fritura. Resultados de sus ensayos en fritura en vacío asociaron la preservación del 90% del trans α -caroteno y del 86% trans β -caroteno con la preservación de los parámetros a* y b* en fritura en vacío. Segnini et al. (1999), Scanlon et al. (1994) y Sahin (2000) investigaron acerca de la importancia del seguimiento del parámetro L* en los vegetales fritos. Una disminución de L* indica un oscurecimiento del vegetal durante la fritura, lo que se asocia con las reacciones de pardeamiento no enzimático.

En la papa las reacciones de pardeamiento durante la fritura dependen de la variedad, las condiciones de crecimiento del cultivo y almacenamiento del producto, de la temperatura y del tiempo de fritura. Se originan con la combinación de los aminoácidos con los azúcares reductores acumulados durante el almacenamiento (Masson, et al., 2007; Márquez, 1986). El aminoácido dominante de la papa es la asparragina —40% del total de aminoácidos— (Martin, et al., 2004). Las reacciones de Maillard en presencia de este aminoácido producen la acrilamida (Rosen, et al., 2002; Tareke, et al., 2002). Numerosos investigadores han reportado la alta correlación del color de los chips con la concentración de acrilamida (Mottram, et al., 2002; Pedreschi, et al., 2007; Rosen, et al., 2002; Stadler, et al., 2002).

El objetivo de este trabajo es informar acerca de los beneficios nutricionales y para la salud, así como las características organolépticas de los chips de papa elaborados con fritura en vacío, y diferenciarlos de los actualmente presentes en el mercado uruguayo.

Materiales y Métodos

Comparación entre procesos de fritura en vacío y fritura tradicional de chips de papa

Se realizaron ensayos de fritura en vacío y fritura tradicional en papa. Se determinó la materia grasa, humedad, cambio de color, acrilamida y evaluación sensorial. Se tomaron muestras de chips de papa del mercado para incluirlos en los estudios de evaluación sensorial y para evaluar el nivel de acrilamida.

Materiales

Papa variedad Atlantic. Aceite refinado de girasol con 86,6% de ácido oleico.

Proceso de elaboración

Preparación de muestra

Los vegetales se lavaron y cortaron en fetas de 2 mm de espesor. Se enjuagaron con abundante agua. Se centrifugaron hasta peso constante de manera de asegurar la remoción de la película de agua adherida a la superficie del vegetal.

Proceso de fritura

Lotes de 300 g de muestra se sumergieron durante 5 minutos en aceite de fritura a 130 °C y presión del sistema de 40 mmHg, con posterior centrifugación a 30 Hz. durante 30 segundos y recomposición de la presión atmosférica.

En fritura tradicional, se sumergieron lotes de 300 g de muestra en aceite a 180 °C durante 2 minutos, luego se escurrieron en canasto agitado fuertemente en forma manual durante 30 segundos.

La relación papa/aceite fue de al menos de 30 gramos/litro aceite en ambos casos. Se adicionó sal al 1,0% (peso/peso).

Los chips fueron envasados hasta su posterior análisis en film laminado de polipropileno biorientado natural y poli-propileno biorientado metalizado en 17 micrones cada capa.

Medidas de calidad en chips

Humedad (%H, g /100 g): por AACC 44-40.

Materia grasa (% MG, g materia grasa/100 g): por AACC 02-01A.

Color: fue determinado en colorímetro HUNTERLAB PLUS XE. Las medidas de color fueron expresadas por los valores especiales obtenidos por el sistema CIE- $L^* a^* b^*$; el parámetro L^* describe la luminosidad en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco puro), el parámetro a^* es matiz del color (+ rojo - verde) y el parámetro b^* es matiz del color (+ amarillo - azul).

Cambio de color (Hunter lab PLUS XE, CIELAB system (L, a, b)): medida del cambio de color según Pedreschi et al. (2007): $\Delta E = ((L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2)^{1/2}$, donde L_0, a_0 y b_0 son los valores para la papa fresca y L, a y b los valores de chips fritos.

Acrilamida: determinación basada en Mastovska y Lehotay (2006), con modificaciones.

Evaluación sensorial: 100 consumidores de entre 19 y 58 años evaluaron los atributos color, sabor y agrado general de las muestras, utilizando una escala hedónica estructurada de nueve puntos (1- me disgusta mucho, 5- me es indiferente, 9- me gusta mucho). Evaluación sensorial: intensidad de sabor salado, crocantez e intención de compra en una escala «lo justo» estructurada de siete puntos (1- Poco salado/crocante, 4- Lo justo, 7- Muy salado/muy crocante).

Diseño experimental

Para el estudio del efecto del proceso en la calidad de los chips de papa, se realizó un DCA con dos tratamientos: fritura en vacío y fritura tradicional. Para cada tratamiento se realizaron 5 días de experimentación y en cada día de ensayo se procesaron 8 batches de 300 g de vegetal fresco. La unidad experimental correspondió a la muestra compuesta por los 8 batches de un día de fritura. La comparación de los tratamientos se realizó por LSD (5%). Se utilizó el software libre InfoStat/L 2009.

Para el estudio de acrilamida en los chips del mercado se tomaron cuatro muestras de diferentes números de lote de tres marcas seleccionadas aleatoriamente. Los valores aportados en este artículo son de carácter exploratorio.

Para el estudio de evaluación sensorial de los chips de papa se incluyó una sola muestra comercial.

Resultados

Se presentan los atributos fisicoquímicos de chips de papa elaborados por fritura en vacío y fritura tradicional en la Tabla 1. En la Tabla 2 se presentan la media y límites superior e inferior del contenido de acrilamida de chips del mercado uruguayo.

Atributos fisicoquímicos	Proceso fritura		Pvalor DMS
	Vacío	Tradicional	
Humedad (g/100 g)	1,9 a	2,0 a	0,419 0,33
Materia grasa (g/100 g)	16,5 a	42,8 b	<0,0001 2,2
Cambio de color (ΔE)	12,1 a	25,5 b	<0,0001 2,2
Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	42 a	332 b	<0,0001 66

Tabla 1. Composición fisicoquímica de chips de papa según el proceso de fritura. Se presentan las medias, P-valor y Diferencia Mínima Significativa (DMS) de cada variable analizada. Letras iguales entre valores en la misma fila indican que no existen diferencias significativas entre efectos para un nivel de significancia del 5%.

Chips del mercado	ACRILAMIDA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	Media	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
	1020	593	1447

Tabla 2. Contenido de acrilamida de chips de papa muestreados del mercado. Se presenta la media, límites superior e inferior para un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla 3 se expresan las medias del puntaje asignado por los consumidores en la evaluación sensorial de los chips de papa elaborados por fritura en vacío y chips del mercado.

Atributos	Chips de papa Fritura en vacío	Chips de papa Mercado
Intención de compra	5,0	6,0
Sabor	6,8	7,5
Agrado general	6,6	7,4
Crocantez	4,4	5,5
Intensidad de sabor salado	3,4	5,2

Tabla 3. Promedios de la evaluación sensorial de chips elaborados por fritura en vacío y chips del mercado. Los atributos de sabor y agrado general se evaluaron según escala hedónica de 9 puntos. Los atributos de intención de compra, intensidad del sabor salado y crocantez según escala hedónica de 7 puntos.

Discusión

Se observa que los chips de papa elaborados por fritura en vacío presentaron una reducción del 61% de materia grasa respecto de los chips elaborados con fritura tradicional (Tabla 1). Esta reducción de la materia grasa en la fritura en vacío se atribuyó al escurrido por centrifugación previo a la recomposición de la presión atmosférica (Dueik, et al., 2009; Mariscal, et al., 2008).

Al ser el contenido de materia grasa un parámetro de importancia para la salud, se compararon los resultados obtenidos con los provenientes del estudio de rotulación nutricional de chips comercializados en Montevideo (Marians, et al., 2011), verificándose una reducción del valor energético de entre 36% y el 55%, según el rango de materia grasa de los chips comercializados (26% mín. y 37% máx.). A su vez, los chips obtenidos mediante fritura en vacío presentaron en promedio una reducción del 50% de lípidos en relación al valor promedio de los chips de papa comerciales, por lo tanto pueden considerarse un alimento reducido en grasa según el Reglamento Técnico de Mercosur (RTM).

En cuanto al contenido de acrilamida se constató una reducción del 87% en comparación con los chips elaborados por fritura tradicional (Tabla 1). Si estos datos se confrontan con las determinaciones de acrilamida realizadas en chips del mercado, los niveles de acrilamida son altamente superiores incluso a las determinaciones realizadas en los productos

elaborados con fritura tradicional. El valor de 332 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) en los chips ensayados con fritura tradicional asciende a una media de 1000 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) en los chips comercializados en plaza (Tabla 2). En contraste, en la fritura en vacío se alcanzó un valor de 42 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), como se muestra en la Tabla 1.

El color de los chips cambia significativamente según el proceso aplicado. La fritura en vacío preserva mejor el color del vegetal fresco, favoreciendo el aspecto del chip desde lo sensorial y nutricional. Este impacto del proceso en el color del vegetal es coincidente con los valores de concentración de acrilamida en el chip según el proceso de fritura. Resultados que se suman a las investigaciones realizadas por otros grupos de científicos entre los cuales se destacan Mottram et al. (2002), Pedreschi et al. (2007), Rosen et al. (2002) y Stadler et al. (2002).

Los chips de papa procesados según fritura en vacío fueron evaluados en los atributos de sabor y agrado general por encima del nivel de aceptabilidad, a pesar de su menor contenido de materia grasa. Los atributos crocantez e intención de compra también fueron evaluados por encima de «lo justo», pero en la valoración de intensidad de sabor salado los consumidores evaluaron por debajo de «lo justo», encontrando los chips de papa procesados por fritura en vacío poco salados. Los consumidores acostumbran consumir chips de papa con un porcentaje de aceite y sal mayor al de los chips elaborados por fritura en vacío. El menor contenido de materia grasa de los chips de papa procesados por fritura en vacío también disminuye la cantidad de sal adherida a la superficie del vegetal, siendo esta la causa de la leve disminución de la aceptabilidad sensorial en relación a los del mercado (Tabla 3).

Conclusiones

En relación a la fritura tradicional, la fritura en vacío se destaca entre los procesos tecnológicos que logran la mejora de la calidad nutricional de los alimentos fritos y la disminución de la cantidad de lípidos, así como también la disminución de la producción de compuestos perjudiciales para la salud. Desde el punto de vista nutricional y de beneficios para la salud, los chips elaborados por fritura en vacío presentaron un 50 % menos de materia grasa y 90% menos de acrilamida que los chips elaborados por fritura tradicional.

Los chips de papa fueron sensorialmente muy bien evaluados en todos los atributos menos en la percepción de intensidad de sabor salado.

Reconocimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar la investigación.

A las instituciones Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) e Instituto de Investigación Agropecuaria (INIA) por apoyar la investigación.

Referencias

- Codex Alimentarius, 2009. *Código de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos*. Roma: FAO. (CAC/RCP 67-2009).
- Crosa, M.J., Skerl, V., Cadenazzi, M., Olazábal, L., Silva, R., Suburú, G. y Torres, M., 2014. Changes produced in oils

- during vacuum and traditional frying of potato chips. En: *Food Chemistry*, 146, pp.603-607.
- Da Silva, P., Moreira, R., 2008. Vacuum frying of high quality fruit and vegetable based snacks. En: *LWT-Food Science Technology*, 41(10), pp.1758-1767.
- Dueik, V., Robert, P., Bouchon, P., 2009. Vacuum Frying reduces oil uptake and improves the quality parameter of carrots crisps. En: *Food Chemistry*, 119, pp.1143-1149.
- Granada, C., Moreira, R.G., Tichy, S.E., 2004. Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. En: *Journal of Food Science*, 69(8), pp.E405-E411.
- Grompone, M.A., 2009. Sombras de la alimentación uruguaya: los alimentos fritos y los alimentos con grasas trans. [En línea]. En: *4to Congreso INNOVA* (Montevideo 2-4 de octubre de 2009. Montevideo: LATU. [Consulta: enero de 2014]. Disponible en: <http://www.innova-uy.info/docs/presentaciones/20091002/10-MariaGrompone.pdf>
- Marians, M., et al., 2011. *Calidad nutricional de los productos de copetín fritos tipo chips*. Montevideo: Universidad de la República. Escuela de Nutrición. (Trabajo Final de Grado).
- Mariscal, M., Bouchon, P., 2008. Comparison between atmospheric and vacuum frying of apple slices. En: *Food Chemistry*, 107, pp.1561-1569.
- Márquez, C., y Añon, M.C., 1986. Influence of reducing sugars and amino acids in the color development of fried potatoes. En: *Journal Food Science*, 51, pp.57-60.
- Martin-Polvillo, M., Marquez-Ruiz, G., y Dobarganes, M.C., 2004. Oxidative stability of sunflower oils differing in unsaturation degree during long-term storage at room temperature. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(6), pp.577-583.
- Masson, L., Muñoz, R., Romero, N., Camilo, C., Encina, C., Hernández, L., Castro, J., Robert, P., 2007. Acrilamida en patatas fritas: revisión actualizada. En: *Grasas y Aceites*, 58(2), pp.185-193.
- Mastovska, K., Lehotay, S.J., 2006. Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), pp.7001-7008.
- Morales, C., 2008. *Clasificación de calidad sensorial de papas fritas tipo chips mediante visión computacional* [En línea]. Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. (Tesis de Maestría). [Consulta: abril de 2014] Disponible en: http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2008/qf-morales_ca/html/index-frames.html
- Morten, C., Meilgaard, B., Carr, Thomas, Vance Cville, Gail, 2006. *Sensory evaluation techniques*. 4ta. ed. Boca Ratón: CRC Press.
- Mottram, D. S. y Wedzicha, B. L., 2002. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. En: *Nature*, 419, pp.448-449.
- Ministerio de Salud Pública, 2014. *Lineamientos para la venta y publicidad de alimentos en centros de enseñanza primaria y secundaria públicos y privados del país. Documento técnico* [En línea]. Montevideo: MSP. [Consulta: abril de 2014]. Disponible en: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Lineamientos%20nutricionales%20para%20la%20venta%20de%20alimentos%20en%20centros%20educativos.pdf
- Chile debe seguir la tendencia mundial. Producir alimentos saludables, 2004. En: *Nutrición* 21, (11), pp.12-13.
- OMS y FAO, 2002a. *Consecuencias para la salud de acrilamida en los alimentos: informe de la consulta conjunta de FAO/OMS, sede central de la OMS, Ginebra, Suiza 25-27 de junio de 2002*. Ginebra: OMS.
- OMS, 2002b. *Informe sobre salud en el mundo 2002: reducir los riesgos y promover una vida sana*. Ginebra: OMS.
- OMS, 2003. *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. Informe de una consulta mixta FAO/OMS*. Ginebra: OMS. (Serie de Informes Técnicos 916.2003).
- Pedreschi, F., Bustos, O., Mery, D., Moyano, P., Kaack, K., Granby, K., 2007. Color kinetics and acrylamide formation in NaCl soaked potato chips. En: *Journal of Food Engineering*, 79, pp.989-997.
- Rosen, J. y Hellenäs, K. E., 2002. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. En: *Analyst*, 127, pp.880-882.
- Sahin, S., 2000. Effects of frying parameters on the color development of fried potatoes. En: *European Food Research and Technology*, 211, pp.165-168.
- Scanlon, M.G., Roller, R., Mazza, G., y Pritchard, M.K., 1994. Computerized video image analysis to quantify colour of potato chips. En: *American Potato Journal*, 71, pp.717-733.
- Segnini, S., Dejmek, P., y Oste, R., 1999. A low cost video technique for color measurement of potato chips. En: *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32, pp.216-222.
- Shyu, S., y Hwang, L., 2001. Effects of processing conditions on the quality of vacuum fried apple chips. En: *Food Research International*, 34, pp.133-142.
- Suaterna Hurtado, A. C., 2009. La fritura de los alimentos: el aceite de fritura. En: *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1), pp.39-53.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, A., et al., 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. En: *Nature*, 419, pp.449-450.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp.4998-5006.
- Troncoso, E., Pedreschi, F., Zúñiga, R.N., 2009. Comparative study of physical and sensory properties of pre-treated potato slices during vacuum and atmospheric frying. En: *LWT-Food Sci Technol*, 42, pp.187-195.
- Uruguay. Decreto 291/012, de 30 de agosto de 2012. *Diario Oficial*, 05 de setiembre de 2012, p.736
- Valenzuela, R., Ronco, A., 2007. Acrilamida en los alimentos. En: *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1), pp.8-16.

Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX® System Q7, DuPont) utilizando «WET POOLS»

Validation of the detection of STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157) in raw burgers using real-time PCR (BAX® System Q7, DuPont) in «WET POOLS»

Mussio, Paula ⁽¹⁾, Martínez, Inés ⁽²⁾, Soumastre, Martina ⁽²⁾, Maquieira, Ana Ma. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽²⁾ Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: imartin@latu.org.uy

RECIBIDO: 30/05/2014 – APROBADO: 20/10/2014

Resumen

Las *Escherichia coli* productoras de Toxinas Shiga (STEC) O157:H7 y no-O157 son patógenos alimentarios emergentes, responsables de numerosos brotes a nivel mundial. Muchos alimentos han sido vinculados a estos brotes, principalmente las hamburguesas de carne bovina insuficientemente cocidas. Dada la creciente producción y consumo de hamburguesas en nuestro país, es importante disponer de técnicas rápidas para el screening e identificación de estas cepas en alimentos.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad y especificidad para detectar las siete cepas STEC: O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 en hamburguesas congeladas crudas, utilizando los kits «STEC Screening stx/eae» para la búsqueda de los genes stx/eae y los kits «STEC Panel 1 E. coli O26, O111, O121», «STEC Panel 2 E. coli O45, O103, O145» y «E. coli O157:H7 MP» (DuPont) para los diferentes serogrupos. Se validó la utilización de muestras compuestas (wet pools), evaluando la recuperación de los positivos en medios selectivos luego de la inmunocentración específica de cada cepa y la detección de los genes de virulencia stx y eae en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final. Se validó una técnica que permite la detección de las cepas STEC mencionadas utilizando wet pools, con límites de detección de 1-5 UFC en 65 gramos de hamburguesas congeladas crudas.

Palabras clave: Patógenos alimentarios emergentes, *Escherichia coli* shiga-toxigénicas, factores de virulencia, muestras compuestas, carne bovina.

Abstract

Shiga toxins-producing *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 and no-O157:H7 have been identified as emerging foodborne pathogens responsible for an increasing number of outbreaks worldwide. Many foods have been associated to these outbreaks, mainly undercooked beef burgers. Due to the increasing production and consumption of burgers in our country, it is important to have a rapid technique to identify and isolate the most important STEC strains in foods matrices.

The objective of these investigation was to assess the sensitivity, specificity and limit detection for the screening of the most prevalent STEC in frozen raw beef burgers, using the «STEC Screening stx/eae» kit to detect the stx/eae genes and the «Panel 1 STEC E. coli O26, O111, O121» and «Panel 2 STEC E. coli O45, O103, O145» and «E. coli O157: H7 MP» (DuPont) kits for the detection of the different serogroups. The use of composed samples (wet pools), the recovery of each strain from the positives samples on selective media after specified immunocentration and the detection of stx/eae virulence genes in isolates by PCR were also evaluated. A technique that allows the detection of the mentioned STEC strains with limits of detection between 1-5 CFU in 65 grams of raw frozen hamburgers using wet pools, was validated.

Keywords: Emerging food pathogens, *Escherichia coli* Shiga toxigenic, virulence factors, composed samples, raw beef.

Introducción

Las *Escherichia coli* productoras de Toxinas Shiga (STEC) han sido identificadas como importantes patógenos transmitidos por alimentos. Los serogrupos de STEC O157:H7 y los no-O157, dentro de ellos *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145, referidos en la literatura como «Big Six STEC», constituyen un problema creciente para la salud pública a nivel mundial (Brooks, et al., 2005). Las STEC son responsables de enfermedades gastrointestinales e infecciones graves tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (HC) (D'Aoust, et al., 2007; Varela, et al., 2008).

La patogenicidad de las STEC depende mayoritariamente de la producción de factores de virulencia tales como las toxinas Shiga. Estas proteínas son codificadas por diferentes genes (*stx1* y *stx2*) con actividades biológicas similares (Hussein, 2007). Uno de los efectos de estas toxinas es el daño en las células endoteliales del intestino y riñón del huésped. Las cepas STEC patógenas también producen otros factores de virulencia que pueden aumentar la severidad de las enfermedades que provocan, por ejemplo, intimina y enterohemolisina, involucradas en la adherencia íntima a la superficie intestinal y posterior daño a los enterocitos (Hussein, 2007). La intimina y la enterohemolisina codificadas por los genes *eae* y *ehxA*, respectivamente, se encuentran en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 (Neill, 1997) y en la mayoría de las cepas STEC no-O157. Por definición, una STEC contiene uno o ambos genes involucrados en la producción de la toxina Shiga (*stx1* y/o *stx2*) y el gen *eae* (Paton y Paton, 2000; Hussein, 2007), por lo que los mismos suelen utilizarse como marcadores para la detección de estos microorganismos mediante técnicas moleculares.

En los brotes alimentarios ocasionados por cepas STEC se ha señalado al ganado vacuno como su principal reservorio y a la carne picada insuficientemente cocida como su vehículo más frecuente (Marzocca, et al., 2006; Hussein, 2007; Masana, et al., 2011). Esto se debe a que es probable que la carne se contamine durante el proceso de sacrificio y faenado de los bovinos. Asimismo, el procesamiento del picado y su manipulación suponen un riesgo extra en lo que a inocuidad respecta (Signorini, et al., 2009).

Según datos aportados por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos, del total de los casos de enfermedades humanas provocadas por STEC en el año 2006, 36% se debieron a cepas de *E. coli* O157 y 64% a cepas no-O157. De estas últimas, entre un 70 a un 83% fueron ocasionadas por alguno de los seis serogrupos STEC anteriormente mencionados (CDC, 2011).

Por otra parte, en Europa las infecciones ocasionadas por STECs no-O157 son más frecuentes que las producidas por O157:H7 (Pradel, et al., 2000; Varela, et al., 2008). En los últimos tres años, los casos de infecciones por no-O157 aumentaron vertiginosamente debido al brote ocurrido en Alemania en el año 2011 (EFSA y ECDC, 2013).

En América del Sur, desde fines de los años noventa en Chile y en Argentina se han reportado casos de diarrea y SUH vinculados tanto a *Escherichia coli* O157:H7 como a serogrupos no-O157 (Rios, et al., 1999; Rivas, et al., 2008). En Uruguay, el primer caso de diarrea sanguinolenta vinculada a *E. coli* O157:H7 se informó en una niña de 16 meses en el año 2002 (Gadea, et al., 2004).

Debido entre otros al último brote ocurrido en Europa en el año 2011, muchos países han aumentado significativamente el número de controles oficiales destinados a la detección

de la presencia de STEC en alimentos, tanto en aquellos que se importan como en los que se exportan (USDA, 2011; EFSA y ECDC, 2013).

Pese al creciente interés por la detección de las STEC no-O157 a nivel mundial, las técnicas de búsqueda e identificación de estas cepas en alimentos se encuentran aún en pleno desarrollo. Tanto en Europa como en Estados Unidos la detección de estos patógenos está remitida a unos pocos laboratorios especializados, ya que no resultan sencillas la detección y diferenciación de los diversos serogrupos en los medios de cultivo disponibles. Al mismo tiempo, no es fácil acceder a los insumos necesarios para su detección con la celeridad correspondiente (CDC, 2005; USDA, 2011).

En este trabajo se presenta una metodología que permite la detección rápida de los siete serogrupos de STEC más prevalentes a nivel mundial (O26, O45, O103, O111, O145, O121 y O157) en una matriz alimentaria compleja (hamburguesas congeladas crudas) mediante el uso de insumos accesibles en el mercado. La misma sigue los lineamientos de la técnica desarrollada y utilizada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para estos patógenos (USDA, 2013), que permite tanto la detección como el aislamiento e identificación de las cepas en las muestras positivas. Aplicando esta metodología es posible detectar mediante PCR a tiempo real las siete cepas STEC anteriormente mencionadas con límites de detección muy bajos, utilizando muestras compuestas (wet pools). Se evaluó además la recuperación de las muestras positivas en medios selectivos luego de la inmunocentración (IMS) específica de cada cepa y la detección de los factores de virulencia *stx/eae* en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final.

Materiales y Métodos

Cepas de referencia

Se utilizaron seis cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) no-O157, adquiridas del Instituto Statens Serum (Copenhague, Denmark): O26, O45, O103, O111, O121 y O145 y la cepa *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) perteneciente a la colección del Departamento de Microbiología del LATU. En la Tabla 1 se muestran los perfiles de virulencia característicos de las cepas según información del proveedor, los cuales fueron confirmados mediante PCR multiplex en el laboratorio.

Cepa de STEC	Genes de virulencia
O26	<i>stx1/eae</i>
O45	<i>stx1/stx2/eae</i>
O103	<i>stx1/eae</i>
O111	<i>stx1/stx2/eae</i>
O121	<i>stx2/eae</i>
O145	<i>stx2/eae</i>
O157:H7	<i>stx1/stx2/eae</i>

Tabla 1. Perfiles de virulencia de las siete cepas de STEC de referencia utilizadas.

Preparación del inóculo

Las siete cepas STEC de referencia se sembraron individualmente en el medio Nutrient Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) y se incubaron overnight a (37.0 ± 1.0) °C con agitación de 120 rpm. Cumplido el tiempo de incubación se realizaron diluciones sucesivas a partir de dicho caldo (concentración estimada mediante curva de recuentos del laboratorio $\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL) hasta obtener una concentración final aproximada de 100 UFC/mL. Se inocularon las muestras con 50 μ L de esa suspensión (carga estimada: 0 a 5 UFC) y se realizaron recuentos por quintuplicado en Petrifilm™ AC (3M, USA) del mismo volumen inoculado.

Determinación de la sensibilidad y límite de detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax® System Real-Time PCR (DuPont)

Inoculación de las muestras

Se inocularon 65 g de hamburguesa 100% carne vacuna (perteneciente al establecimiento de mayor producción de hamburguesas de Uruguay) con 0 a 5 UFC de cada una de las siete cepas de STEC individualmente. Las muestras fueron homogeneizadas de forma manual y rápidamente llevadas a refrigeración (3.0 ± 2.0) °C con el fin de generar un estrés en el inóculo. Luego de 4 horas, las muestras se hidrataron con 195 mL de caldo Tryptic Soy Broth, Modified w/8mg/L Novobiocin & Acid Digest of Casein - mTSB (Acumedia, Michigan, USA) de modo de mantener una relación 1:4 (muestra: caldo de cultivo) y se incubaron en estufa a (41.5 ± 1.0) °C durante 18 a 22 horas.

Paralelamente, se realizó una muestra control (blanco) que consistió en 325 g de hamburguesa 100% carne vacuna sin inocular. El blanco se hidrató con 975 mL de mTSB y se incubó en las mismas condiciones que las muestras inoculadas.

Extracción de ADN

Cumplido el tiempo de incubación, se realizó la extracción de ADN genómico de todas las muestras. La lisis fue realizada siguiendo el protocolo establecido por el proveedor, utilizando Bax® System Lysis Buffer adicionado con Bax® System Proteasa (DuPont, USA).

Bax® System Real-Time PCR

Se realizó el screening de presencia de STEC en la muestra blanco utilizando el kit «STEC Screening *stx/eah*» (DuPont) en el equipo Bax® System Q7 (DuPont). Una vez confirmada la ausencia en la muestra blanco, se procedió al screening de las muestras inoculadas. Para ello se generaron wet pools mezclando una parte de la lisis de la muestra inoculada con cuatro partes de la lisis de la muestra blanco. Luego de someterlos al screening, los wet pools fueron evaluados frente a los kits «STEC Panel 1 *E. coli* O26, O111, O121», «STEC Panel 2 *E. coli* O45, O103, O145» y «*E. coli* O157:H7 MP» (DuPont). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Recuperación y confirmación de las siete cepas STEC inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Inmunoconcentración específica de los serogrupos y siembra a medios selectivos

Una vez realizado el screening de los serogrupos empleando wet pools, se realizó la inmunoconcentración de los caldos inoculados empleando perlas específicas para cada serogrupo: RapidCheck® CONFIRM O26 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O45 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O103 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O111 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O121 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O145 Magnetic Particles (Sdix, Delaware, USA) y Dynabeads® Magnet Beads for *E. coli* O157:H7 (Life Technologies, USA). De manera de verificar la especificidad y la sensibilidad de la IMS para cada serogrupo, se realizó un pool de todos los caldos inoculados. Del mismo se tomaron siete alícuotas de 1 mL cada una y se sometieron a la separación magnética de cada serogrupo con las perlas correspondientes, según las instrucciones brindadas por el fabricante. El inmunoconcentrado correspondiente a cada cepa se sembró en diferentes medios selectivos y diferenciales. Para los productos de la separación inmunomagnética de las STEC no-O157 se usó Agar Sangre lavada con Mitomicina – MWBA (Sugiyama, et al., 2001) y Rainbow Agar – RA (Biolog, USA) suplementado con 0,8 mg/L de telurito de potasio y 10 mg/L de novobiocina. La descripción de las morfologías esperadas descritas por el fabricante para cada serogrupo en Rainbow Agar se muestra en la Tabla 2. Para las inmunoconcentradas con perlas de *E. coli* O157:H7 se utilizó el medio «CHROMagar™O157» (CHROMagar™, París, Francia) suplementado con telurito de potasio (2.5 mg/L) y novobiocina (5mg/L).

Serogrupo	Descripción de colonias en Rainbow Agar
O26	Colonias violeta con borde blanco
O45	Colonias violeta, violeta-grisáceas, magenta claro. Borde blanco
O103	Colonias gris, violeta, violeta-azuladas. Borde blanco
O111	Colonias gris, gris-azuladas
O121	Colonias violeta, magenta. Borde violáceo difuso
O145	Colonias violeta-grisáceas, violeta-azuladas. Borde violáceo difuso

Tabla 2. Descripción de morfologías esperadas de STEC en Rainbow agar.

Confirmación de colonias sospechosas de STEC: PCR y serología

Con el propósito de realizar la confirmación, se repicaron todas las colonias que presentaban fenotipo sospechoso en los diferentes medios selectivos a Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, Basingstoke, UK). Se seleccionó un aislamiento por fenotipo y por medio de cultivo selectivo empleado, de acuerdo a las características descritas en la bibliografía de referencia. A las mismas se les realizó la búsqueda de los genes que codifican los factores de virulencia: toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*) e Intimina (*eae*) mediante PCR multiplex a tiempo final, utilizando el kit comercial «*E. coli* DEC PCR» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). La mezcla de reacción así como el ciclo de amplificación utilizado fueron los descritos por el fabricante del kit empleado. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™ (Biotium, USA). En la Tabla 3 se muestran los tamaños de los amplicones esperados para cada gen de virulencia. Luego de la confirmación de la presencia de los genes de virulencia por PCR en cada aislado, se prosiguió a la identificación serológica.

Para las pruebas serológicas se seleccionó una sola colonia por cada serogrupo que previamente hubiese confirmado la presencia de los genes de virulencia mediante PCR. Para las presuntas colonias de *E. coli* O26, O103, O111 y O145 se utilizó la prueba de latex «Dry Spot Technology Serocheck (Oxoid, Basingstoke, UK)», para O45 y O121 se utilizó «*E. coli* Antisera» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) y para O157:H7 «RIM™ *E. coli* O157:H7 Latex Test» (Remel, Lenexa, USA).

Gen diana	Tamaño del amplicón esperado (pb)
<i>stx1</i>	260
<i>eae</i>	377
<i>stx2</i>	420

Tabla 3. Tamaños de los amplicones esperados para cada gen de virulencia al utilizar el kit «*E. coli* DEC PCR» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Se validó la detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna y en hamburguesas con agregado de proteína de soja, así como provenientes de diferentes establecimientos de producción (cinco mayores productores del mercado interno). Para esto se inocularon 20 muestras de hamburguesas de 65 g (dos muestras de cada tipo por establecimiento) con 0-5 UFC de *E. coli* O26 y se realizaron los screenings correspondientes en el Bax® System Q7 (DuPont), según procedimiento previamente detallado. El recuento del inóculo utilizado se realizó mediante Petrifilm™ AC (3M, USA) por quintuplicado. Se optó por la utilización de la cepa *Escherichia coli* O26 para estas pruebas por tratarse de la STEC no-O157 con mayor prevalencia a nivel internacional (Varela, et al., 2008;

Mathusa, et al., 2010). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Validación de la especificidad y recuperación de las siete cepas de STEC

Se realizó el recuento de aerobios totales de diez hamburguesas, correspondientes a las dos formulaciones de los cinco establecimientos productores, mediante el método de siembra incorporado en Plate Count Agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Se seleccionó el tipo de hamburguesa (formulación y establecimiento) que presentó el mayor valor de recuento de aerobios totales, y se inoculó 65 g de dicha muestra con 0 a 5 UFC de cada una de las siete cepas. Se prosiguió a la incubación y detección de los serogrupos inoculados según el procedimiento previamente descrito. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

A partir de las diferentes pruebas en las que se realizaron inoculaciones de las muestras se determinó el límite de detección de la técnica ensayada para cada serogrupo, tomando el menor valor de recuento para el cual se obtuvo un resultado positivo para el screening y la confirmación del serotipo en cuestión.

Resultados

Detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax® System Real-Time PCR (DuPont)

Al confirmar la ausencia de STECs en la muestra blanco, se procedió a la realización de los wet pools para llevar a cabo el screening de las muestras inoculadas. La detección de los genes de virulencia (*stx/eae*) y de los serogrupos de STEC inoculados en las muestras de hamburguesas fue positiva en todos los casos, con una carga bacteriana comprendida entre 0 a 5 UFC (Tabla 4).

Recuperación y confirmación de las cepas inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Recuperación en medios selectivos

Los productos de las inmunocentraciones correspondientes a cada cepa fueron sembrados en los medios específicos: MWBA, Rainbow agar y CHROMagar O157. En el primero se obtuvieron colonias blancas y pequeñas rodeadas de hemólisis. En Rainbow Agar se obtuvieron colonias sospechosas con diferentes morfologías, y por último, en el medio CHROMagar O157 las colonias presuntivas de *Escherichia coli* O157 presentaron color malva. La descripción completa de lo recuperado se describe en la Tabla 5.

Cepa inoculada	Concentración de inóculos (UFC)	Screening <i>stx/eae</i>	Panel 1 (O26, O111, O121)	Panel 2 (O45, O103, O145)	<i>E. coli</i> O157:H7
O26	2 [1;4]	+	O26+		
O45	4 [2;5]	+		O45+	
O103	2 [1;3]	+		O103+	
O111	3 [2;5]	+	O111+		
O121	1 [0;2]	+	O121+		
O145	5 [4;6]	+		O145+	
O157	2 [1;4]	+			+

Tabla 4. Resultados obtenidos de la detección de las siete cepas de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) utilizando los kits del Bax[®]SystemQ7 (DuPont). La concentración de cada inóculo se presenta como n [x;y], siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Confirmación de la presencia de genes de virulencia mediante PCR multiplex a tiempo final

En la Figura 1 se presenta el resultado de la PCR multiplex a tiempo final de las colonias sospechosas de STEC, descritas previamente en la Tabla 5, subcultivadas desde los medios selectivos a TSA.

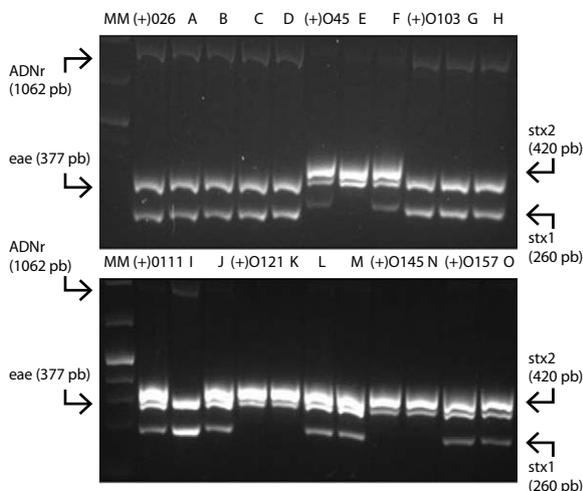


Figura 1. Productos de amplificación de PCR multiplex en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed. Carriles (A-D): Aislados presuntivos de *E. coli* O26, Carriles (E-F): Aislados presuntivos de *E. coli* O45, Carriles (G-H): Aislados presuntivos de *E. coli* O103, Carriles (I-J): Aislados presuntivos de *E. coli* O111, Carriles (K-M): Aislados presuntivos de *E. coli* O121, Carril (N): Aislado presuntivo de *E. coli* O145, Carril (O): Aislado presuntivo de *E. coli* O157. (+) O26: Control positivo de *E. coli* O26, (+) O45: Control positivo de *E. coli* O45, (+) O103: Control positivo de *E. coli* O103, (+) O111: Control positivo de *E. coli* O111, (+) O121: Control positivo de *E. coli* O121. (+) O145: Control positivo de *E. coli* O145, (+) O157: Control positivo de *E. coli* O157: H7. MM (Marcador Tamaño Molecular): GeneRuler[™] 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, USA).

En la mayoría de las muestras se observa una banda de 1062 pb del control positivo de amplificación del kit utilizado, correspondiente al gen ADNr 16S. Se observa además que al menos una colonia sospechosa de cada serogrupo inmunocentrado confirmó mediante PCR multiplex a tiempo final el perfil de virulencia esperado.

Para los aislamientos de *E. coli* O26 (carriles A-D) y *E. coli* O103 (carriles G y H), se observan dos bandas de 260 y 377 pb correspondientes a los genes *stx1* y *eae*, respectivamente. Para *E. coli* O45 (carriles E-F), únicamente el aislamiento sembrado en el carril F presentó tres bandas de 420, 377 y 260 pb, correspondientes a los genes *stx2*, *eae* y *stx1*, respectivamente. De manera similar, en los aislamientos de *E. coli* O111 (carril I-J) se logró confirmar una única colonia sospechosa (carril J) al obtenerse las tres bandas correspondientes a *stx2*, *eae* y *stx1*. Por otra parte, de tres colonias presuntivas de *E. coli* O121 (carril K-M) solo la sembrada en el carril K presentó dos bandas de 420 pb (*stx2*) y 377 pb (*eae*). Los mismos patrones de banda se obtuvieron para el aislamiento de *E. coli* O145 (carril N). Finalmente, para *E. coli* O157 (carril O) se observaron tres bandas de 420, 377 y 260 pb, correspondientes a los genes *stx2*, *eae* y *stx1*.

Confirmación mediante serología

A aquella colonia correspondiente a cada serogrupo de STEC que mediante PCR multiplex a tiempo final presentó el perfil genético esperado (ver Tabla 1), se le realizaron pruebas serológicas específicas para el serogrupo en cuestión. El resultado de dichas pruebas fue positivo en todos los casos.

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Tal como se muestra en la Tabla 6, el screening de los genes *stx/eae* y del serogrupo O26 en las muestras de hamburguesas de carne y proteína de soja correspondientes a diferentes establecimientos fue positivo. La concentración del inóculo utilizado determinado mediante Petrifilm[™]AC (3M, USA) fue de 3 UFC.

Serogrupo Inmunoconcentrado	Descripción de las colonias recuperadas		
	Rainbow Agar	MWBA	CHROMagar O157
O26	A - Violeta con borde blanco B - Violeta azuladas	C - Blanca pequeña, poca hemólisis D - Blanca mediana, poca hemólisis	n.s.
O45	E - Violeta con borde blanco	F - Blanca pequeña con hemólisis	n.s.
O103	G - Violeta con borde blanco	H - Blanca pequeña con hemólisis	n.s.
O111	I - Gris Azuladas	J - Blanca pequeña con hemólisis	n.s.
O121	K - Púrpura con halo violáceo difuso L - Púrpura	M - Blanca con hemólisis	n.s.
O145	N - Púrpura con halo violáceo difuso	No se recuperaron colonias hemolíticas	n.s.
O157	n.s.	n.s.	O - Color malva

Tabla 5. Descripción de colonias sospechosas aisladas en cada medio utilizado a partir de la IMS para cada serogrupo de STEC inoculado en las muestras. (n.s.): No sembrada.

Muestra hamburguesa: Establecimiento - Tipo	Concentración de Inóculo (UFC)	Screening serogrupo
1 - 100% carne	3 [0;5]	O26+
1 - Con agregado de prot. de soja		
2 - 100% carne		
2 - Con agregado de prot. de soja		
3 - 100% carne		
3 - Con agregado de prot. de soja		
4 - 100% carne		
4 - Con agregado de prot. de soja		
5 - 100% carne		
5 - Con agregado de prot. de soja		

Tabla 6. Resultados de la recuperación del serogrupo O26 en los dos tipos de formulación de todos los establecimientos. La concentración del inóculo se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Validación de la especificidad en la recuperación de las siete cepas de STEC

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones de aerobios totales obtenidas en las 10 muestras de hamburguesas sembradas. Se seleccionó la muestra que presentó la mayor

concentración (Hamburguesa 6), para evaluar con ella la especificidad de la recuperación de las siete cepas STEC inoculadas simultáneamente. En la Tabla 8 se resumen las concentraciones de los inóculos de cada serogrupo y el resultado del screening de los mismos, el cual resultó positivo en todos los casos.

Muestras	Concentración de aerobios totales (UFC/g)
1	4,8 x 10 ⁴
2	7,7 x 10 ⁴
3	2,1 x 10 ⁵
4	6,8 x 10 ⁵
5	2,8 x 10 ⁶
6	(E) 4,2 x 10 ⁷
7	4,1 x 10 ³
8	2,4 x 10 ⁴
9	5,7 x 10 ³
10	6,9 x 10 ⁴

Tabla 7. Concentraciones de aerobios totales en los diferentes tipos de hamburguesas (cinco establecimientos, dos formulaciones). (E): Valor estimado.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

La Tabla 9 resume el límite de detección de la técnica para cada serogrupo, teniendo en cuenta los diferentes inóculos realizados durante las etapas del estudio.

Cepas STEC	Límite de detección (UFC)
O26	2 [1;4]
O45	3 [1;5]
O103	2 [1;2]
O111	3 [2;5]
O121	1 [0;2]
O145	5 [2;8]
O157	2 [1;4]

Tabla 9. Límite de detección determinado para cada serogrupo inoculado. Se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Discusión

Detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax[®] System Real-Time PCR (DuPont)

Los resultados de la Tabla 4 demuestran la sensibilidad de la metodología utilizada en este trabajo, ya que la detección de

Cepa STEC inoculada	Concentración del Inóculo (UFC)	Panel 1	Panel 2	<i>E. coli</i> O157:H7
O26	5 [3;6]	O26+		
O45	3 [1;5]		O45+	
O103	2 [1;2]		O103+	
O111	5 [3;6]	O111+		
O121	2 [1;3]	O121+		
O145	5 [2;8]		O145+	
O157	4 [2;5]			+

Tabla 8. Resultados de los inóculos y detección de las 7 cepas de STEC en la muestra de mayor concentración de aerobios totales mediante Bax[®] System Real-Time PCR. La concentración de cada inóculo se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

las cepas STEC inoculadas en las muestras de hamburguesas fue exitosa, incluso utilizando inóculos muy bajos y wet pools. Por tanto, la metodología validada demostró que el empleo de muestras compuestas resultó adecuado y no interfirió en la detección de STEC en hamburguesas congeladas crudas.

Recuperación y confirmación de las cepas inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Recuperación en medios selectivos

Respecto a la recuperación de las cepas en medios selectivos, las mismas presentaron colonias de morfología típica de STEC O157 y no-O157, según lo detallado en los catálogos comerciales disponibles. De todos modos, las morfologías de los diferentes serogrupos son muy similares entre sí, no siendo sencilla su discriminación basada en las características que se describen en las referencias bibliográficas provistas por los proveedores de los medios. Por esto resulta importante seleccionar más de un fenotipo de cada cepa para proseguir con las etapas de confirmación. Asimismo, cabe destacar la buena funcionalidad del medio MWBA para diferenciar las colonias de STEC, debido a la clara zona de hemólisis producidas por las mismas, en coincidencia con lo descrito en la literatura (Sugiyama, et al., 2001).

Confirmación de la presencia de genes de virulencia mediante PCR multiplex a tiempo final

La amplificación de los controles positivos de cada cepa de referencia demostró que durante la reacción de PCR multiplex a tiempo final no hubo inhibiciones. Esta etapa permitió confirmar que al menos una de las colonias sos-

pechosas recuperadas mediante IMS correspondía a las cepas inoculadas en las muestras de hamburguesas, ya que los genes que amplificaron coinciden con los descritos por el proveedor para cada cepa de referencia (Ver Tabla 1).

En el gel de electroforesis presentado (Figura 1) se puede apreciar que algunos de los aislamientos no presentaron el perfil genético esperado para cada serogrupo. Este hecho se debe principalmente a que la inmunoconcentración no es 100% específica. Es decir, si bien permite «limpiar» concentrando las cepas del serogrupo deseado, otras *E. coli* presentes en las muestras continúan en el producto final de la inmunoconcentración y crecen en los medios selectivos haciendo más compleja la selección de colonias.

El resultado obtenido era esperado, ya que la concentración se realizó a partir del caldo de cultivo que contenía las siete cepas de STEC, y por tanto era posible que durante la etapa confirmatoria mediante PCR multiplex se obtuvieran perfiles asociados a los diferentes serogrupos. A pesar de que estos resultados evidencian las principales limitaciones de esta técnica (reacciones cruzadas y falsos positivos), es importante resaltar que la misma permitió la confirmación de al menos una colonia sospechosa de cada cepa de STEC inoculada en las muestras de hamburguesas.

Se considera que a la hora del análisis de muestras en el laboratorio resultaría interesante incorporar en esta etapa del protocolo una reacción de PCR a tiempo final que permita confirmar el serogrupo buscado, dado que al seguir esta metodología desde una muestra naturalmente contaminada no se conoce qué genes de virulencia están presentes en la cepa aislada. El PCR a tiempo final es una técnica económica y nos permitiría asegurar que la colonia aislada corresponde al serogrupo buscado y que, a la vez, contiene los genes asociados a los factores de virulencia.

Confirmación mediante serología

Al igual que en las técnicas habituales de detección de patógenos, las pruebas serológicas se utilizan con el objetivo de culminar la confirmación de la identidad de las cepas aisladas. Estas resultan definitivas al momento de verificar el cumplimiento de las reglamentaciones actuales referentes a STECs, debido a que se considera un resultado positivo con la presencia de determinados serotipos de *E. coli* shigatoxigénica, confirmados finalmente por estas técnicas.

Es importante destacar que en el mercado existen disponibles pruebas serológicas que permiten la confirmación de varios serogrupos de STECs en simultáneo. Estos, así como nuevos productos que se desarrollen, podrían ser de gran utilidad como tamizaje en la etapa de confirmación. Sin embargo, al finalizar la técnica de búsqueda se debería realizar la confirmación con sueros específicos para cada serotipo buscado.

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Los resultados obtenidos de la detección de *Escherichia coli* O26 en hamburguesas de distinta formulación (100% carne vacuna o con agregado de proteína de soja) y producidas por diferentes establecimientos demostraron que estos parámetros no influyen en la performance de la metodología de

screening validada en este trabajo. Por tanto, podría emplearse adecuadamente para la búsqueda rápida de estos patógenos en hamburguesas congeladas crudas, independientemente de la composición de la mezcla cárnica.

Validación de la especificidad en la recuperación de las siete cepas de STEC

La recuperación de las siete cepas de STEC cuando estas fueron inoculadas simultáneamente demostró la alta especificidad de la técnica validada para detectarlas y aislarlas cuando se encuentran compitiendo entre sí y con la carga microbiana propia del alimento.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

Al ser las STECs patógenos alimentarios, las técnicas que se utilizan para su detección incluyen técnicas cualitativas de gran sensibilidad. Estas tienen la capacidad de detectarlas aun cuando estos patógenos están presentes en los alimentos en muy bajas concentraciones y en distintos tamaños de muestra.

Si bien en Uruguay no existe normativa con respecto a estas cepas, dada la importancia y el impacto a la salud de las STECs y de la *E. coli* O157:H7 en particular, los países que las reglamentaron exigen ausencia en 65 g de muestra. Por este motivo, la técnica de detección de STEC evaluada en este trabajo fue desafiada con valores menores a 10 UFC de estos patógenos.

Los resultados observados en la Tabla 8 muestran que para todas las cepas de STEC ensayadas la técnica validada tiene en promedio un límite de detección por debajo de 5 UFC. De acuerdo a lo anteriormente planteado, este valor se considera sumamente adecuado para la detección de estos patógenos alimentarios.

Conclusiones

Durante la realización de este trabajo se llevó a cabo la validación de la detección mediante PCR a tiempo real de las siete cepas *Escherichia coli* shigatoxigénicas: O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157, mediante la utilización de los kits disponibles comercialmente: «STEC Screening *stx/eae*», «STEC Panel 1 *E. coli* O26, O111, O121», «STEC Panel 2 *E. coli* O45, O103, O145» y «*E. coli* O157:H7 MP» (DuPont) y el equipo Bax® System Q7 (DuPont).

Se evaluó la utilización de muestras compuestas (wet pools), la recuperación de los positivos en medios selectivos luego de la inmunoconcentración específica de cada cepa y la detección de los genes de virulencia *stx/eae* en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final.

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la validación se logró poner a punto una técnica de detección rápida y confiable que puede ser aplicada en laboratorios especializados e industriales para el screening de las siete cepas de STEC más prevalentes a nivel mundial en hamburguesas crudas, empleando muestras compuestas, con límites de detección menores a 5 UFC (valor adecuado para la búsqueda de este tipo de patógenos en alimentos).

Reconocimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto Nacional de Carnes (INAC) y al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por la financiación del proyecto de investigación gracias al cual se desarrolló este trabajo.

Referencias

- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M. y Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States 1983-2002. En: *The Journal of Infectious Disease*. 192, pp.1422-9.
- CDC, 2005. Bacterial foodborne and diarrheal disease national case surveillance [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/fbsurvsumm2005.pdf>
- CDC, 2011. *National enteric disease surveillance: shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC). Annual Report 2011* [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surv-summ-2011-508c.pdf>
- D'Aoust, J.Y., Barnes, R., Carter, M., Drake, S.L., Evanson, D., Fanning, S., Flowers, R., Giaccone, V., Jaykus, L.A., Jouve, J.L., Kennedy, J., McClure, J., McNamara, A., Madsen, M., Nesbakken, T., Notermans, S., O'Brien, S., Ottaviani, F., Ottaviani, M., Smoot, M., Swaminathan, B., Vernozy-Rozand, C., Wall, P. y Whyte, P., 2007. *Food safety handbook. Microbiological challenges*. Montreal: Biométrieux. ISBN: 978-2-917162-08-8.
- EFSA y ECDC, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 [En línea]. En: *EFSA Journal*, 11(4), pp.1-250 [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129.htm>
- Gadea, M.P., Varela, G., Bernadà, M., Sirok, A., Mota, M.I., Sabelli, R., Grittiuz, G., Schelotto, F., Chinen, I., Chillemi, G. y Rivas, M., 2004. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. En: *Revista Médica Uruguaya*, 20, pp.79-81.
- Hussein, H. S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. En: *Journal of Animal Science*, 85 (E. Suppl.), pp.E63-E72.
- Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G. y Álvarez, E. E., 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 38, pp.38-40.
- Masana, M.O., D' Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G.A., Vilacoba, E., Irino, K. y Rivas, M., 2011. Genotypic characterization of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. En: *Journal of Food Protection*, 74(12), pp.2008-2017.
- Mathusa, E.C., Yuhuan, C., Enache, E. y Hontz, L., 2010. Non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in foods. En: *Journal of Food Protection*, 73(9), pp.1721-1736.
- Neill, M.A., 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. En: *Journal of Food Protection*, 60, pp.1444-1446.
- Paton, J.C. y Paton, A.W., 2000. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. En: *Science & Medicine*, 8(3), pp.28-37.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. y Forestier, C., 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. En: *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), pp.1023-1031.
- Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A. y Levine, M., 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. En: *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), pp.778-781.
- Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M.G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi, L., Marsano D.E., Mollar, M.C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R.M., Mead, P. y Griffin, P., 2008. Risk factors for sporadic shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. En: *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), pp.763-771.
- Signorini, M. L., Marín, V., Quinteros, C. y Tarabla, H., 2009. Hábitos de consumo de hamburguesas y riesgo de exposición a *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): modelo de simulación. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 41, pp.168-176.
- Sugiyama, K., Inoue, K. y Sakazaki, R., 2001. Mitomycin-supplemented washed blood agar for the isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than O157:H7. En: *Letters in Applied Microbiology*, 33, pp.193-195.
- USDA, Food Safety and Inspection Service, 2011. *Shiga toxin-producing Escherichia coli in certain raw beef products* [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPPubs/2010-0023FRN.pdf>
- USDA, 2013. *Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges* [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: mayo 2013]. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>
- Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M.I., González, S., González, G., Gugliada M.J., Carbonari, C.C., Algorta, G., Bernadà, M., Sabelli, R., Pardo, L., Rivas, M. y Schelotto, F., 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 40, pp.93-100.

Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina y elastasa en extractos de vegetales autóctonos

Search of inhibitory activity of trypsin and elastase in extracts of native plants

Macció, Laura ⁽¹⁾, Vallés, Diego ⁽¹⁾, Cantera, Ana María ^(1,2).

⁽¹⁾ Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay

⁽²⁾ Cátedra de Bioquímica, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: acantera@fq.edu.uy

RECIBIDO: 17/6/2014 - APROBADO: 10/11/2014

Resumen

Se estudió la capacidad inhibitoria para tripsina y elastasa de extractos de vegetales autóctonos: flores de *Achyrocline satureioides* (marcela), hojas de *Baccharis trimera* (carqueja), frutos de *Eugenia uniflora* (pitanga) y frutos de *Schinus molle* (anacahuita). Los extractos, que presentaron diferentes propiedades, se obtuvieron utilizando agua o etanol como solventes en distintas condiciones de tiempo y temperatura. La acción inhibitoria para elastasa fue baja (< 30%) o casi nula en los extractos ensayados. Para la tripsina, todos los extractos presentaron acción inhibitoria, observándose para un mismo material vegetal importantes diferencias según el solvente utilizado, independientemente de la temperatura de extracción. Los extractos de *S. molle* fueron los de mayor actividad inhibitoria para tripsina. Al extracto acuoso de este vegetal, obtenido a 100 °C, se le determinó IC₅₀ y tipo de inhibición.

Palabras clave: Inhibidores proteolíticos, serin-proteasas, inhibidores vegetales.

Abstract

The inhibitory capacity of trypsin and elastase of extracts prepared from *Achyrocline satureioides* flowers, *Baccharis trimera* leaves, *Eugenia uniflora* fruits and *Schinus molle* fruits was studied. The extracts showed differences for the same plant material depending on using water or ethanol as solvents, and were obtained under different time and temperature conditions. The elastase inhibitory action was low (< 30%) or almost absent in the extracts tested. For trypsin, all extracts showed inhibitory action and significant differences depending on solvent used, regardless of the extraction temperature. Extracts of *S. molle* showed the most potent inhibitory activity for trypsin. The aqueous extract of this plant obtained at 100 °C was selected to determine IC₅₀ and inhibition type.

Keywords: Proteolytic inhibitors, serin-proteases, plant inhibitors.

Introducción

Las enzimas proteolíticas desempeñan un papel esencial en los procesos de regulación de funciones celulares, tanto en etapas del desarrollo como tras la respuesta ante un estímulo dañino (Fuster-Lluch, et al., 2004).

Las proteasas serínicas son la clase más estudiada de proteasas y la tripsina es utilizada como modelo para este grupo (Leung, et al., 2000).

Los inhibidores de proteasas, ampliamente distribuidos en todos los organismos, han sido aislados y caracterizados de plantas, animales y microorganismos (Mosolov, et al., 2001; Haq, et al., 2004; Christeller, 2005).

En las plantas, los inhibidores de proteasas son compuestos a los que se les ha atribuido importantes funciones biológicas, entre ellas, participación en los mecanismos de defensa, en la regulación de proteasas endógenas (Lawrence y Koundal, 2002; Lingaraju, et al., 2008) y en respuesta a diversos factores abióticos (Díaz, 2006; Mosolov y Valvuen, 2011). Se ha

postulado que estos compuestos pueden brindar resistencia a plagas y fitopatógenos. Estos inhibidores también pueden ser utilizados como agentes terapéuticos, fármacos dirigidos o agentes nutracéuticos, y por esta razón su uso biotecnológico va en aumento (Tiffin y Gaut, 2001; Fei Fang, et al., 2010).

A diferencia de las proteasas, las familias de inhibidores no pueden ser agrupadas según el tipo catalítico de las enzimas que inhiben, porque algunas familias contienen inhibidores que actúan sobre distintas clases de proteasas (Rawlings, et al., 2004).

En el caso particular de la familia de inhibidores de proteasas serínicas, las más abundantes en plantas son: Bowman-Birk, Kunitz y Serpina, con características y modos de acción muy diferentes (Habib y Fazili, 2007).

Las flores de *Achyrocline satureioides* (marcela), hojas de *Baccharis trimera* (carqueja), frutos frescos de *Eugenia uniflora* (pitanga) y frutos secos de *Schinus molle* (anacahuita) constituyen una fuente natural y renovable con posibilidad de aumentar el valor agregado de los productos obtenidos de la flora autóctona de Uruguay. Además, estos vegetales

son utilizados generalmente por la medicina popular y en particular algunos son producidos en Uruguay como materia prima empleada en las industrias cosméticas y farmacéuticas.

El objetivo de este trabajo consistió en buscar la capacidad inhibitoria de proteasas en extractos de vegetales autóctonos de Uruguay y evaluar su acción frente a tripsina y elastasa.

Materiales y Métodos

Materiales

Equipos

Agitador magnético Caramag MIdi, balanza Gram Precision GX-230, baño de agua termostático Bioblock Scientific, centrífuga refrigerada Sigma 3K18, espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Reactivos

Azocaseína, Na- benzoil-L-arginina etil ester (BAEE), succinil-ala-ala-p-nitroanilina (SucAla₃-PNA), ácido tricloroacético (TCA), hipoclorito de sodio, buffer fosfato de sodio. Todos ellos calidad ppa.

Material vegetal

Al tratarse de flora nativa y autóctona, todos los ejemplares fueron colectados en vías públicas. Las hojas de *Achyrocline satureioides* (marcela) fueron colectadas en abril, las hojas de *Baccharis trimera* (carqueja) fueron colectadas a principios de verano, los frutos de *Eugenia uniflora* (pitanga) fueron colectados a fines de primavera y los frutos secos de *Schinus molle* fueron colectados en verano (Figura 1).



Figura 1. Material vegetal. a) Flores de *Achyrocline satureioides*; b) Hojas de *Baccharis trimera* y Frutos de *Eugenia uniflora* c) Frutos de *Eugenia uniflora* d) y *Schinus molle*.

Métodos

Preparación de extractos vegetales

Los extractos vegetales fueron preparados a partir de material vegetal previamente desinfectado con solución de hipoclorito

de sodio (0,5% v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Fueron enjuagados repetidas veces con agua destilada y finalmente secados en corriente de aire sobre papel de filtro.

Extractos acuosos

El material vegetal (2,0 g) se extrajo con 10,0 mL de agua destilada, se machacó en mortero y se agitó magnéticamente durante 5 minutos. El preparado se filtró a vacío por vidrio sinterizado, el filtrado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 6654xg a 4 °C. Se trabajó a dos temperaturas, 25 y 100 °C. Se fraccionó y almacenó a -20 °C.

Extractos etanólicos

Se procedió de igual forma que para la preparación de extractos acuosos, empleando etanol como solvente para la extracción en dos condiciones de temperaturas: 25 y 40 °C. Los extractos obtenidos se evaporaron en rotaevaporador a 45 °C. Luego de evaporado el alcohol, se resuspendió el concentrado con 10 mL de agua destilada. Se fraccionó y almacenó a -20 °C.

Actividad proteolítica

Método de Azocaseína

(sustrato semi-sintético no específico)

Se determinó la actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato por método de Andrew & Asenjo modificado (Vallés, et al., 2007).

Una unidad enzimática (U_{Az}) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir el incremento en una unidad de absorbancia a 337 nm a 37 °C, pH 7,2.

Método de Na-Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester (BAEE) (sustrato sintético específico para tripsina)

Se determinó la actividad proteolítica utilizando BAEE como sustrato según método descrito por Bergmeyer (1974).

Una unidad BAEE (U_{BAEE}) se define como la cantidad de enzima que produce un ΔA_{253nm} de 0,001 por minuto utilizando BAEE como sustrato a pH 7,6, 25 °C en un volumen de reacción de 3,2 mL.

Método de Succinyl-ala-ala-p-nitroanilide (SucAla₃-PNA) (sustrato sintético específico para elastasa)

Se determinó la actividad proteolítica de elastasa utilizando SucAla₃-PNA (Bieth, et al., 1974).

Una unidad (U_{SucAla_3-PNA}) queda definida como la cantidad de elastasa que hidroliza 1,0 μ mol SucAla₃-PNA por minuto a pH 8,0 y 25 °C.

Preparados enzimáticos

Se prepararon soluciones de elastasa y de tripsina como soluciones enzimáticas patrón que se utilizaron para evaluar la capacidad inhibitoria de los extractos vegetales.

Obtención de elastasa a partir de polvo pancreático

El preparado de elastasa se obtuvo por extracción de 1 g de polvo pancreático desgrasado con 20 mL de buffer fosfato de sodio 0,1M, pH 6,0 con agitación durante 30 minutos. Se centrifugó a 6654 xg, durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado se trató de igual manera, combinando ambos sobrenadantes para obtener la solución final.

Elastasa

El preparado obtenido a partir de polvo pancreático fue diluido para obtener una solución de trabajo de $0,62 \pm 0,05$ U_{SucAla3-PNA} en buffer Tris-HCl 0,1M, pH 8,0.

Tripsina

Todos los ensayos fueron realizados con una solución $3,2 \pm 0,2$ U_{Azo}/mL: buffer fosfato de sodio 0,2M, pH 7,2.

Búsqueda de actividad inhibitoria en extractos vegetales

Se mezcló 900 µL de solución de tripsina o elastasa con 100 µL de cada extracto (diluido al tercio) durante 30 minutos en baño de agua a 37 °C.

Se determinó la actividad proteolítica empleando azocaseína como sustrato para tripsina y SucAla3-PNA para

elastasa. Se determinó el % de actividad inhibitoria (%AI) como la diferencia de actividad de la enzima en ausencia de extracto inhibitor y la actividad de la enzima en presencia de extracto inhibitor.

Caracterización de la actividad inhibitoria

Tiempo de incubación

Se determinó el %AI variando los tiempos de incubación (0, 5, 10, 20, 30, 45 minutos) del preparado de tripsina con el extracto vegetal seleccionado.

Determinación de IC₅₀

Se determinó la actividad proteolítica de tripsina, empleando azocaseína y BAEE como sustratos, y se calculó % AI para las distintas concentraciones de los extractos seleccionados incubados durante 5 minutos con tripsina.

Se trazó diagrama de Dixon y se calculó el valor IC₅₀.

Determinación del tipo de inhibición

Se incubó 900 µL tripsina con distintos volúmenes de extracto (0, 6,0, 10,0, 20,0, 40,0 y 60,0 µL), ajustado a un volumen final de 1000µL con agua (25 °C, pH 7,0). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 25 °C.

Nº	Material vegetal	Solvente	T (°C)	pH (extracto)	Apariencia física del extracto
1	<i>A. saturoide</i> (flores)	Agua	25	4,5	Marrón claro
2		Etanol	100	4,5	Marrón oscuro
3			25	4,5	Amarillo verdoso
4		40	4,5	Amarillo verdoso intenso	
5	<i>B. trimera</i> (hojas)	Agua	25	5,0	Marrón oscuro
6		Etanol	100	5,0	Marrón claro
7			25	5,0	Verde oscuro
8		40	5,0	Verde fluorescente	
9	<i>E. uniflora</i> (frutos)	Agua	25	4,0	Rosa pálido
10		Etanol	100	4,0	Rosa bordeaux
11			25	4,0	Bordeaux
12		40	4,0	Bordeaux	
13	<i>S. molle</i> (frutos)	Agua	25	4,0	Beige oscuro con precipitado
14		Etanol	100	4,0	Beige oscuro con precipitado
15			25	4,0	Beige anaranjado oscuro con precipitado
16		40	4,0	Beige anaranjado con precipitado	

Tabla 1. pH y color de los extractos.

Se determinó la actividad de tripsina para distintas concentraciones de BAEE (0,05, 0,0625, 0,125, 0,25, 0,3 y 0,5mM) para cada mezcla. Se trazó diagrama de Lineweaver-Burk y se determinó el tipo de inhibición.

Resultados

Obtención de extractos vegetales

Como resultado de las diferentes condiciones de extracción se obtuvieron 16 extractos para los vegetales ensayados. Para un mismo material vegetal se observaron diferencias en el color de los extractos debidas al solvente empleado. El pH final de los extractos de un mismo vegetal tuvo el mismo valor, no variando con las distintas condiciones de extracción (Tabla 1).

Búsqueda de actividad proteolítica

A cada uno de los extractos se les determinó la actividad proteolítica a fin de descartar interferencias con posibles proteasas presentes en ellos. Los ensayos realizados para cada extracto no detectaron actividad proteolítica.

Actividad inhibitoria

La acción inhibitoria fue determinada por incubación de los extractos con cada una de las enzimas: tripsina y elastasa.

Las condiciones de obtención de los extractos y %AI para tripsina y elastasa incubadas con los diferentes extractos se muestran en la Tabla 2.

Se observó que los preparados 3 y 4 obtenidos a partir de *A. saturoidehojas* presentaron 40% de inhibición de tripsina.

El extracto 6 alcanzó un 56% de inhibición de tripsina, siendo el de mayor grado inhibitorio de los preparados de *B. trimera*.

Los extractos 11 y 12 de *E. uniflora* alcanzaron 75 y 80% de inhibición de tripsina, y los extractos 9 y 10 obtenidos del mismo material vegetal mostraron un grado de inhibición de tan solo 16%.

La acción inhibitoria de los extractos 15 y 16 de *S. molle* fue de 80 y 92% para tripsina. Los extractos 13 y 14 tuvieron una acción inhibitoria del 62 y 64%.

La extracción en medio acuoso mostró una menor inhibición en la mayoría de los vegetales en comparación a la extracción etanólica, presentando *E. uniflora* la mayor diferencia (60%). Esto podría deberse a la extracción diferencial ejercida por los solventes empleados, ya sea que se extraigan distintos fitoquímicos o diferentes concentraciones de los mismos.

Para la inhibición de elastasa se alcanzó el mayor grado de inhibición (24- 28%) con los extractos preparados a partir de *E. uniflora* (11 y 12) y *S. molle* (15 y 16). El resto de los extractos no mostraron inhibición de elastasa de significancia.

Se seleccionaron los extractos que presentaron para cada material vegetal una alta capacidad inhibitoria de tripsina y baja actividad para elastasa (extractos acuosos 6 y 14; extractos etanólicos 4 y 12).

Efecto del tiempo de incubación en la actividad inhibitoria para tripsina

Se estudió el efecto del tiempo de incubación sobre la capacidad inhibitoria de los extractos seleccionados a 37 °C, pH 7,2.

Nº	Material vegetal	Órgano	Solvente	T (°C)	pH (extracto)	%AI _{TRIPSINA}	%AI _{ELASTASA}
1	<i>A. saturoidehojas</i>	Flores	Agua	25	4,5	23	11
2			100	4,5	24	7	
3			Etanol	25	4,5	40	8
4				40	4,5	41	4
5	<i>B. trimera</i>	Hojas	Agua	25	5,0	38	4
6			100	5,0	56	8	
7			Etanol	25	5,0	38	9
8				40	5,0	37	11
9	<i>E. uniflora</i>	Frutos	Agua	25	4,0	16	9
10			100	4,0	16	8	
11			Etanol	25	4,0	75	24
12				40	4,0	79	28
13	<i>S. molle</i>	Frutos	Agua	25	4,0	62	13
14			100	4,0	64	9	
15			Etanol	25	4,0	80	28
16				40	4,0	92	28

Tabla 2. Condiciones de extracción (solventes y temperaturas) y %AI de tripsina y elastasa de los extractos obtenidos a partir de *Achyrocline saturoidehojas* (1- 4), *Baccharis trimera* (5- 8), *Eugenia uniflora* (9-12) y *Schinus molle* (13-16).

La actividad inhibitoria de los extractos no varió a lo largo de los tiempos de incubación ensayados (Gráfico 1).

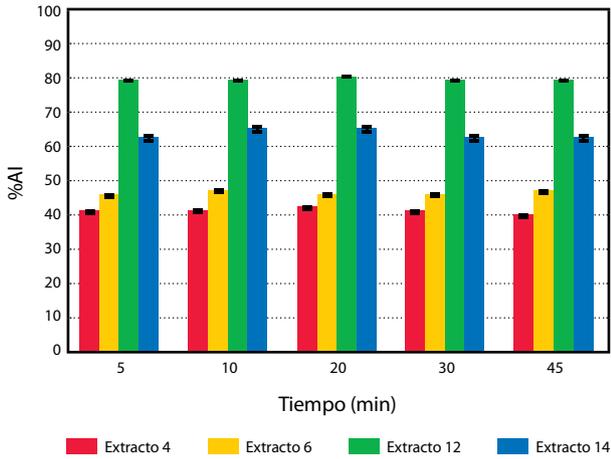


Gráfico 1. %AI de tripsina vs tiempo de incubación para el extracto 4, 6, 12 y 14.

Este resultado descartaría la acción de inhibidores irreversibles, los cuales se caracterizan por mostrar un continuo aumento de la actividad inhibitoria a lo largo del tiempo. En todos los casos se alcanzó el máximo de actividad inhibitoria a los 5 minutos.

Determinación de IC₅₀

Se determinó la concentración de extracto vegetal que inhibe el 50% de la actividad de tripsina. Los valores de IC₅₀ de las muestras seleccionadas se muestran en la Tabla 3.

Extracto	Material vegetal	Solvente	IC ₅₀ (µL)	IC ₅₀ (mg/mL)
2	<i>A. satureioidehojas</i> (flores)	agua	2,4	2.0X10 ⁻⁵
6	<i>B. trimera</i> (hojas)	etanol	80	8.5 X10 ⁻⁴
12	<i>E. uniflora</i> (frutos)	etanol	40	1.1 X10 ⁻³
14	<i>S. molle</i> (frutos)	agua	103	4.5 X10 ⁻⁴

Tabla 3. IC₅₀ de los extractos 2, 6, 12 y 14.

Los extractos acuosos de *A. satureioidehojas* y *S. molle* presentaron los mejores valores de IC₅₀ frente a los extractos etanólicos estudiados.

Se seleccionó el extracto 14 para realizar la caracterización de la inhibición de tripsina, dado que presentó las mejores características para ser utilizado en aplicaciones biotecnológicas (disponibilidad del material vegetal, extracción en agua, mayor capacidad inhibitoria de tripsina).

En los Gráficos 2 y 3 se muestra la variación en la actividad (V₀) de tripsina con distintas concentraciones de extracto utilizando azocaseína y BAEE como sustrato. Se trazó el diagrama de Dixon en cada caso. Los valores de IC₅₀

determinados para el extracto 14 fueron de 4.5 X10⁻⁴ y 2.7 X10⁻⁴ mg/mL, respectivamente.

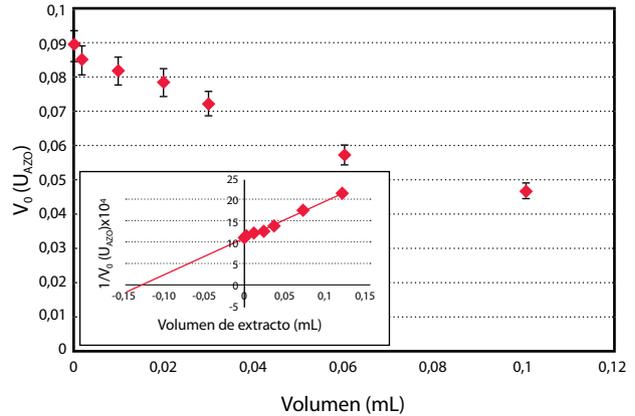


Gráfico 2. V₀ de tripsina vs distintos volúmenes de extracto 14. Diagrama de Dixon.

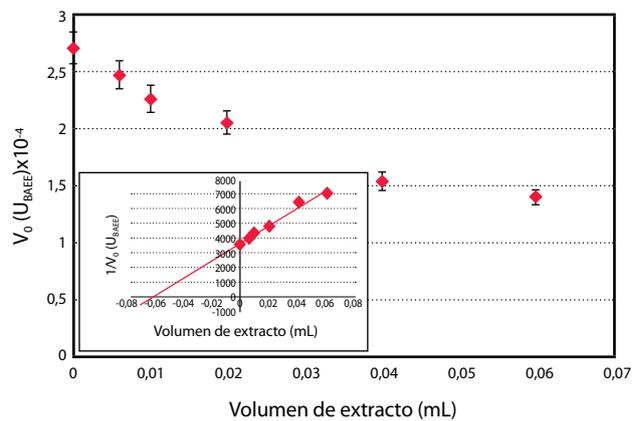


Gráfico 3. V₀ de tripsina vs distintos volúmenes de extracto 14. Diagrama de Dixon.

Determinación del tipo de inhibición

Se trazó el Diagrama de Lineweaver-Burk para tripsina en ausencia de extracto inhibitor y con distintas concentraciones de extracto (Gráfico 4).

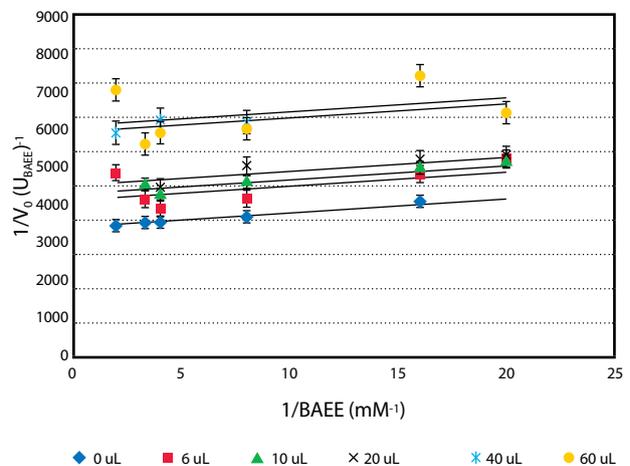


Gráfico 4. Diagrama de Lineweaver-Burk para tripsina inhibida con distintas cantidades de liofilizado de extracto 14.

El Gráfico 4 muestra un comportamiento típico de una inhibición acompetitiva para el extracto 14. Al tratarse de una inhibición reversible, es esperable que la capacidad inhibitoria sea independiente del tiempo de inhibición una vez que se alcanza el equilibrio, como se puede observar en el Gráfico 1.

La adjudicación de este tipo de inhibición corresponde al comportamiento del extracto en su conjunto y no a los inhibidores aislados y purificados. Esto señala la necesidad de continuar con la purificación y tipificación de los inhibidores aislados en estudios futuros.

Discusión

A partir de cuatro vegetales autóctonos se obtuvieron extractos que presentaron diferentes propiedades con las condiciones de extracción. Las diferencias observadas en las propiedades de los distintos extractos podría deberse a la extracción diferencial de componentes químicos o a la diferente concentración de los mismos en cada extracto como resultado de la combinación de condiciones de extracción.

Todos los extractos vegetales estudiados presentaron actividad inhibitoria para tripsina y para elastasa, siendo de mayor relevancia la capacidad inhibitoria para tripsina. Frente a los resultados obtenidos, una potencial aplicación de estos extractos vegetales sería la acción como insecticidas naturales, lo cual les significaría un lugar en el mercado en la protección de cultivos. En particular los extractos acuosos, debido a que son amigables con el medio ambiente.

De los materiales vegetales evaluados, *S. molle* ha mostrado ser el más atractivo para producción de preparados de base natural con capacidad controladora de plagas que afectan a cultivos.

Según estudios anteriores, *S. molle* es una planta que presenta actividad antifúngica y antimicrobiana, principalmente en las hojas (Gundidza, 1993). Tiene importancia etnobotánica, pues se la ha utilizado en el control de plagas agrícolas en varias oportunidades (Iannacone y Lamos, 2003; Silva, et al., 2005). También fue evaluada la actividad insecticida de extractos de frutos de *S. molle* sobre larvas de *Cydia pomonella* (Chirino, et al., 2001). Si bien en el trabajo de Chirino (2001) la acción insecticida no fue adjudicada a ninguna familia de compuestos químicos, los inhibidores de proteasas serínicos podrían ser importantes candidatos a ser considerados como responsables de algunas de estas propiedades presentadas en *S. molle*. De acuerdo a los datos existentes, la mortalidad en insectos podría deberse específicamente a inhibidores de tripsina, lo cual provoca una disminución en la digestión en los animales patógenos, dificultando o inhibiendo su normal desarrollo.

Conclusiones

Todos los extractos presentaron potencial de actividad inhibitoria de tripsina pero solo algunos presentaron inhibición de elastasa. Fue seleccionado el extracto de *S. molle* obtenido en solvente acuoso a 100 °C para realizar la caracterización de la inhibición de tripsina. El IC50 del extracto inhibidor para tripsina utilizando el sustrato Azocaseína fue de 109 uL y con BAEE como sustrato, de 63 uL. La acción inhibitoria del extracto presentó un comportamiento típico de una inhibición acompetitiva.

Reconocimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de una beca de iniciación a la investigación financiada por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII).

Referencias

- Bergmeyer, H.U., 1974. *Methods of enzymatic analysis*. 2a ed. Vol. 1. Nueva York: Academic Press. pp.515-516.
- Bieth, J., Spiess, B., Wermuth, C.G., 1974. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastasa. En: *Biochem. Med.*, 11(4), pp.350-357.
- Chirino, M., Cariac, M., Ferrero, A.A., 2001. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatales de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) En: *Bol. San. Veg. Plagas*, 27, pp.305-314.
- Christeller, J.T., 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. En: *FEBS J.*, 272, pp.5710-5722.
- Díaz, M.M., 2006. *Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, Sesamia nonagrioides (lepidoptera: noctuidae): caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab* [En línea]. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid. (Tesis Doctoral). [Consulta noviembre de 2013]. Disponible en: http://oa.upm.es/453/1/MARIA_MERCEDES_DIAZ_MENDOZA.pdf
- Fei Fang, E., Ho Wong, J., Fern Bah, C.S., Lin, P., Wah Tsao, S. y Bun Ng, T., 2010. Bauhinia variegata var. variegata trypsin inhibitor: From isolation to potential medicinal applications. En: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 396, pp.806-811.
- Fuster-Lluch, O., Galindo, M.F., Ceña, V. y Jordán, J., 2004. Las serina proteasas y su función en los procesos de muerte neuronal. En: *Rev. Neurolog.*, 38(5), pp.449-457.
- Gundidza, M., 1993. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle*. En: *Linn. Cent. Afric. J. Med.*, 39, pp.231-234.
- Habib, H. y Fazili, K.M., 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. En: *Biotech. Mol. Biol. Rev.*, 2(3), pp.68-85.
- Haq, S.K., Atif, S.M. y Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. En: *Arch. Biochem Bioph.*, 431, pp.145-159.
- Iannacone, J., Lamas, G., 2003. Toxicological effects of Peruvian peppertree (*Schinus molle*) and lantana (*Lantana camara*) on *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae), *Trichogramma pintoi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Capidosoma koehleri* (hymenoptera: Encyrtidae) in Peru. En: *Agricultura Técnica*, 63(4), pp.347-360.
- Lawrence, P.K. y Koundal, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. En: *Elec. J. Biotech.*, 5, pp.121-143.
- Leung, D., Abbenante, G. y Fairlie, D.P., 2000. Protease inhibitors: current status and future prospects. En: *J Med Chem.*, 43, pp.305-341.
- Lingaraju, M.H. y Gowda, L.R., 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: another member with single disulfide bridge. En: *Biochem Biophys Acta*, 1784(5), pp.850-855.

- Mosolov, V.V., Grigoryeva, L.I. y Valueva, T.A., 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review). En: *Appl. Biochem. Microbiol.*, 37(2), pp.115-123.
- Mosolov, V.V. y Valueva, T.A., 2011. Inhibitors of proteolytic enzymes under abiotic stresses in plants (review). En: *Appl. Biochem. and Microbiol.*, 47(5), pp.453-459.
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P. y Barrett, A.J., 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. En: *Biochem. J.*, 378, pp.705-716.
- Silva, G., Orrego, O., Hepp R. y Tapia, M., 2005. Búsqueda de plantas con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais* en maíz almacenado. En: *Pesq. Agropec. Bras.*, 40(1), pp.11-17.
- Tiffin, P. y Gaut, B., 2001. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in zea and related genera. En: *Mol. Bio. Evol.*, 18(11), pp.2092-2101.
- Vallés, D., Furtado, S. y Cantera, A.M.B., 2007. Characterization of news proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). En: *Enzyme Microb. Tech.*, 40, pp.409-413.

Caracterización de las antocianinas de la flor de ceibo como sensibilizadores naturales para su uso en celdas fotovoltaicas

Characterization of anthocyanins from ceibo flower as natural sensitizers in photovoltaic cells

Cerdá, María Fernanda ⁽¹⁾, Enciso, Paula ⁽¹⁾.

⁽¹⁾Laboratorio de Biomateriales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: fcerda@fcien.edu.uy

RECIBIDO: 14/05/2014 – APROBADO: 9/10/2014

Resumen

La energía solar es la fuente de energía más promisoría del futuro. La conversión directa de luz solar en energía eléctrica mediante el uso de celdas solares posee muchas ventajas sobre los métodos usados en la actualidad, debido a que no genera desechos o contaminantes.

En particular, las celdas solares sensibilizadas con pigmentos (DSSC) o celdas de Graetzel representan una alternativa a las convencionales celdas solares de silicio. En las últimas tres décadas han atraído considerable atención como una forma de producir celdas fotovoltaicas de bajo costo dada la posibilidad de alcanzar con ellas una alta eficiencia de conversión (de aproximadamente 12%) y su alto rendimiento durante períodos de luz prolongados e incluso en condiciones de stress térmico.

En este trabajo se evalúan pigmentos de origen natural, la mezcla de antocianinas provenientes de la flor del ceibo, como sensibilizadores de estas celdas. Se utilizan medidas de absorbancia UV-visible, voltamperometría cíclica y espectroscopía de impedancia electroquímica como forma de caracterización.

Palabras clave: Antocianinas, sensibilizadores, DSSC.

Abstract

Solar energy is the promising font of the future. Direct conversion of solar light into electricity using solar cells has many advantages, arising from the fact that does not generate contaminants or waste.

Particularly, dye sensitized solar cells (DSSC) or Graetzel cells represent an alternative to conventional silicon ones. In the three last decades DSSC have attracted great attention because of their low cost, the achievement of high efficiency conversion (12%), and good yields during prolonged light periods and under thermal stress.

In this work, a mixture of natural dyes, anthocyanins from ceibo flower, is evaluated for their use as sensitizers. UV-visible measurements, cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy are used to characterize these dyes.

Keywords: Anthocyanin, sensitizers, DSSC.

Introducción

La obtención de energía a partir de recursos fósiles genera problemas relacionados con la limitada disponibilidad de los mismos y las desastrosas consecuencias ambientales de su uso masivo. Esto ha llevado a un aumento en el interés por el desarrollo de fuentes alternativas de energía renovables que sean capaces de satisfacer la demanda global energética. Entre las fuentes de energía posibles, la solar es la más promisoría del futuro, ya que la conversión directa de luz solar en energía eléctrica mediante el uso de celdas solares posee muchas ventajas sobre los métodos usados en la actualidad, debido a que no genera desechos o contaminantes.

La producción de energía fotovoltaica se ha duplicado cada dos años desde 2002, haciendo de este el sector energé-

tico que más rápidamente crece. Afortunadamente, Uruguay presenta niveles de radiación solar considerables, lo cual le otorga un atractivo adicional al uso de estas celdas (Abal, et al., 2011). Con respecto a la legislación, nuestro país cuenta con grandes avances en su marco jurídico, con normas aprobadas que contribuyen a la reglamentación ambiental. En referencia al marco energético, el Poder Ejecutivo ha aprobado que el 50% de la energía generada en el país debe provenir de fuentes renovables a 2015, incluyendo un 25% proveniente de energías no convencionales (Uruguay, 2000; Uruguay, 2010). Sin embargo, los altos costos de estas tecnologías continúan siendo un problema difícil de afrontar.

En ese contexto, las celdas solares sensibilizadas con pigmentos (conocidas como celdas de Graetzel o DSSC) han atraído considerable atención en las últimas tres

décadas como una forma promisoriosa de tecnología para producir celdas fotovoltaicas de bajo costo. Asimismo, estas celdas alcanzan una alta eficiencia de conversión (las más eficientes alcanzan valores de un 12%), y tienen un alto rendimiento durante períodos de luz prolongados e incluso en condiciones de stress térmico (Gao, et al., 2008; Cao, et al., 2009; Chen, et al., 2009; Wang, et al., 2010; Yella, et al., 2011; Bisquert, et al., 2004).

Una celda DSSC típica contiene en el corazón del sistema una película de material semiconductor mesoporoso nanocrystalino (en general TiO_2 , forma anatasa) cubierta con una monocapa de pigmentos coloreados capaces de sufrir procesos de transferencia de carga adsorbidos a la superficie del semiconductor. El semiconductor se deposita sobre un óxido transparente conductor (electrodo de FTO o de ITO), a través del cual se ilumina la celda, y se pone en contacto con una solución de electrolito que contiene una cupla redox (I^-/I_3^-). El circuito se cierra con un electrodo de platino o carbono (Bisquert, et al., 2004; Ito, et al., 2007).

Al producirse la fotoexcitación del pigmento por la luz solar, el electrón es inyectado hacia la banda de conducción del semiconductor, moviéndose posteriormente hacia el sustrato de FTO o ITO. La regeneración del pigmento oxidado por reducción del mismo ocurre en el electrodo auxiliar, donde la cupla yoduro/tri-yoduro del electrolito aporta los electrones necesarios. Esto además previene la recaptura del electrón de la banda de conducción por el pigmento oxidado. El circuito se completa con la migración de electrones a través de los conectores externos.

En suma, el dispositivo genera energía eléctrica a partir de la luz solar sin sufrir ninguna transformación química permanente.

El TiO_2 es un semiconductor que posee una brecha energética ancha entre las bandas de valencia y de conductividad, de ca. 3 eV, dependiendo de la estructura cristalina que adopte (3.0 eV para el rutilo y 3.2 eV para la anatasa). Esto le permite una absorción óptica en la región del UV (por debajo de los 400 nm) que representa apenas un 10% del total del espectro solar. Todo material que posea una brecha más angosta y, por lo tanto, absorba en el visible o la región del infrarrojo puede usarse para sensibilizar materiales de TiO_2 . Así, varios materiales sensibilizadores pueden ser usados con este fin, como los semiconductores inorgánicos con brechas más angostas, metales y complejos metálicos (Imahori, et al., 2006; Scott, et al., 2007; O'Reagan, et al., 2007; Klahr, et al., 2009), y pigmentos orgánicos (Howie, et al., 2008; Fukuri, et al., 2006) sin despreciar los pigmentos de origen natural que también han sido muy estudiados (Calogero, et al., 2012; Hao, et al., 2006; Zhou, et al., 2011; Li, et al., 2013; Calogero y Di Marco, 2008; Al-Bat'hi, et al., 2013).

Para ser eficiente, el pigmento debe tener un coeficiente de extinción molar alto y un rango espectral ancho que le asegure la capacidad de absorber luz en el visible así como en el IR cercano. En segundo lugar, el potencial redox del pigmento debe ser suficientemente mayor que el valor de la banda de conducción del TiO_2 para que sea posible el proceso de transferencia de electrones.

Por último, estos pigmentos deben presentar grupos funcionales capaces de unirse al TiO_2 a través de interacciones covalentes, electrostáticas, enlaces por puente de hidrógeno o por fuerzas de van der Waals. La mayoría de los pigmentos usan para este fin sus grupos funcionales carboxilos e hidroxilos (Brumbach, et al., 2009).

Los pigmentos naturales constituyen una alternativa atrayente como fotosensibilizadores en celdas de Graetzel debido a su bajo costo y a la abundancia del recurso, lo que muestra a estas celdas como una opción atractiva en países con economías emergentes como el nuestro. Se han reportado trabajos con pigmentos naturales donde se alcanzan eficiencias nada despreciables de hasta un 2%, pero donde los costos de las mismas y su estabilidad compiten con las de mayor eficiencia (Grätzel y Zakeeruddin, 2013; Yum, et al., 2012; Dwivedi, et al., 2013; Ito, et al., 2011).

Varios pigmentos han sido extraídos a partir de flores, hojas y frutas para ser utilizados en celdas solares de tipo DSSC, como las antocianinas, las clorofilas, las xantofilas, los flavonoides y los carotenos. Algunos de ellos presentan altos coeficientes de extinción ($10^5 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), lo que les confiere interesantes características para su uso como sensibilizadores (Calogero, et al., 2012).

Lo que se plantea en esta propuesta es la extracción y caracterización de las antocianinas provenientes de la flor del ceibo (*Erythrina crista-galli*), rica en este tipo de flavonoides (Yum, et al., 2012; Mitscher, et al., 1988; Miño y Ferraro, 2002). Las antocianinas son responsables del color rojo característico de esta flor, con un máximo de absorbancia a 530 nm (Scogin, 1991; Mazza and Miniati, 1993). Son compuestos polifenólicos que se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos y presentan grupos OH responsables de la unión con el TiO_2 (Scogin, 1991; Mazza y Miniati, 1993). En esta flor en particular se encuentran mayoritariamente tres clases de antocianinas: cianidina 3-soforósido, cianidina 3-glucósido y pelargonidina 3-glucósido (Scogin, 1991), cuyas estructuras se observan en la Figura 1.

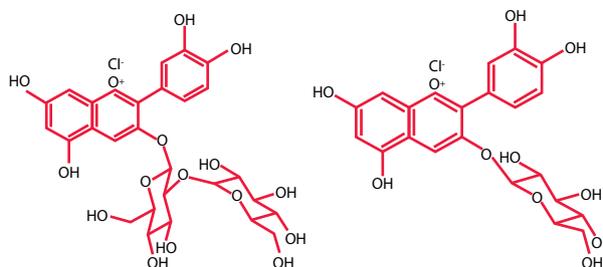


Figura 1. Estructura de antocianinas presentes en *Erythrina crista-galli*: cianidina 3-soforósido (izquierda), cianidina 3-glucósido (derecha).

También se evaluó la estabilidad de las antocianinas frente a varios parámetros físicos y químicos a los cuales se encontrarán expuestas al ser parte de la celda, entre ellos la temperatura y los componentes del electrolito (NaI y etilenglicol).

Finalmente, se procedió al armado de celdas de tipo «sándwich», determinándose por espectroscopía de impedancia electroquímica sus cambios en el comportamiento en presencia y en ausencia de luz.

Materiales y Métodos

Extracción de antocianinas

Se utilizaron hojas de *Erythrina crista-galli*. Para obtener el extracto de antocianinas, 2 g de material vegetal seco fueron mortereados con 10 mL de etanol 95% a tempera-

tura ambiente. Luego de filtrar el extracto, se volvió a tratar con 5 mL de solvente en iguales condiciones. Los filtrados fueron reunidos y llevados a sequedad bajo corriente de nitrógeno. La concentración total de antocianinas de los extractos utilizados en los estudios se determinó de acuerdo a $A_{530} - (0,25 \cdot A_{657})$, que compensa la contribución de clorofila a la absorbancia a 530 nm (Rabino y Mancinelli, 1986; Akond, 2011).

Caracterización de los pigmentos

Se realizó la caracterización por voltamperometría cíclica de la mezcla de antocianinas (extracto 95% etanol) a una concentración de 0,1 mg/mL. Se utilizó un electrodo de trabajo de Au-*pc* (policristalino, 0,0707 cm² de área geométrica), un electrodo de referencia de Ag/AgCl ($E = 0,195$ V vs. ENH) y grafito como electrodo auxiliar. El electrolito soporte fue NaClO₄ 0,05 M o mezcla al 50% con etanol, y se aplicaron rutinas a diferentes velocidades de barrido de potencial situadas entre 0,01 y 0,1 V s⁻¹.

La estabilidad térmica de las antocianinas fue evaluada en un rango de temperatura de entre 25 °C y 90 °C a través de medidas de absorbancia a 530 nm, siguiendo la variación en los valores medidos. Para los estudios de estabilidad con respecto al NaI (0 M-3 M) y al etilenglicol (mezclas en etanol dentro del rango 0% a 40%) también se efectuaron medidas de absorbancia a igual longitud de onda.

Caracterización electroquímica de la celda

Se armaron celdas de tipo «sándwich», utilizando un electrodo de FTO (*fluorine doped tin oxide*) conteniendo al semiconductor y al pigmento como electrodo de trabajo, y como electrodo auxiliar FTO cubierto de grafito. El pigmento fue depositado por adsorción sobre el TiO₂ nanoestructurado obtenido por aplicación directa de la pasta comercial (Degussa P-25) por *doctor blade* sobre el electrodo de vidrio conductor. El circuito se completó colocando entre ambos electrodos el etilenglicol conteniendo la cupla redox I⁻/I₃⁻ (Smestad, 1998).

Una vez armada la celda, se procedió a su control por medidas de impedancia electroquímica, realizadas tanto en presencia de luz como en oscuridad. Estas medidas se realizaron en un rango de 0 a 700 mV, a frecuencias comprendidas entre 100 mHz y 3 MHz.

Resultados

Caracterización electroquímica de los pigmentos

Con respecto a la caracterización electroquímica, se realizaron los perfiles voltamperométricos para el Au-*pc* en electrolito soporte NaClO₄ 0,05 M; en NaClO₄ 0,05 M y etanol 95% en iguales volúmenes; y en presencia de las antocianinas del ceibo en mezcla etanol 95%-NaClO₄ 0,05 M. Grandes cambios fueron observados en los perfiles voltamperométricos en presencia de las antocianinas con respecto a los perfiles obtenidos en electrolito soporte. En ellos se observa una contribución anódica a 1,3 V con su pico catódico correspondiente en 0,6 V,

que no se encontraba presente en los perfiles provenientes del electrolito soporte o del etanol (Gráfico 1).

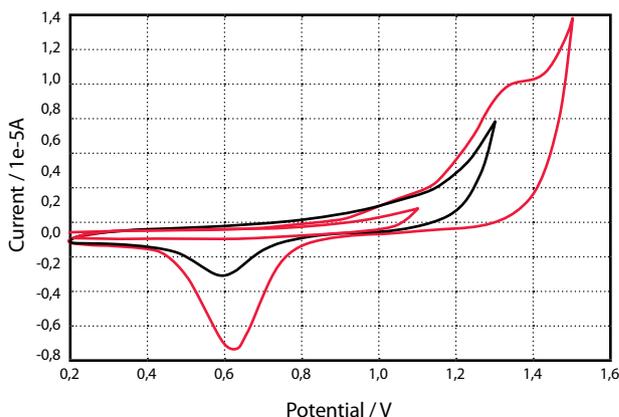


Gráfico 1. Voltamperogramas de Au-*pc* en presencia del pigmento de ceibo (en etanol 95%) y electrolito soporte NaClO₄ a diferentes barridos de potencial.

Estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad se hicieron siguiendo el comportamiento a 530 nm, longitud de onda en que las antocianinas presentan un máximo en el valor de absorbancia (Gráfico 2).

Con la temperatura se observaron dos situaciones: una primera región donde se observa un aumento en los valores de absorbancia al incrementar la temperatura desde 25 °C a 60 °C, y una segunda región, correspondiente a las temperaturas más altas, donde los valores de absorbancia son similares, como se observa en el Gráfico 3.

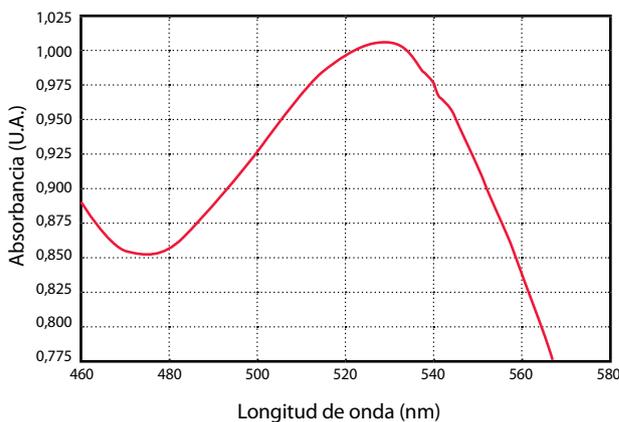


Gráfico 2. Espectro de absorbancia de una solución conteniendo una mezcla de antocianinas extraídas con etanol a partir de la flor del ceibo.

Respecto a la estabilidad del pigmento frente al NaI, se observó un aumento en los valores de absorbancia a 530 nm al incrementar la concentración de NaI desde 0 M a 3,0 M (Gráfico 4).

Frente al etilenglicol, no se obtuvieron cambios significativos en los valores de absorbancia al incrementar el porcentaje del mismo.

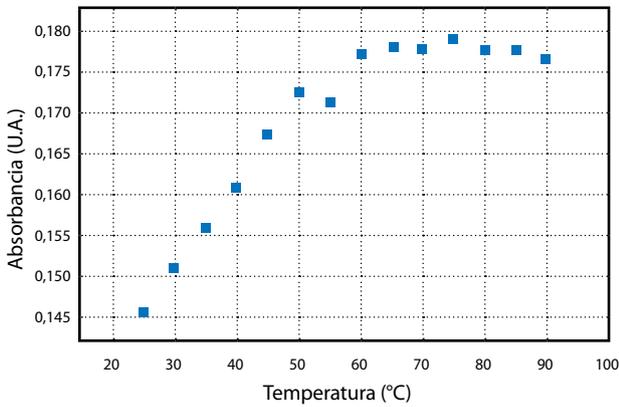


Gráfico 3. Evaluación del comportamiento de antocianinas frente al incremento de temperatura.

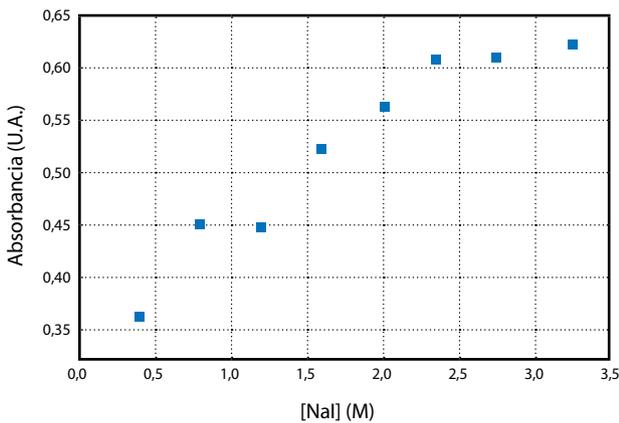


Gráfico 4. Evaluación del comportamiento de antocianinas frente al incremento de NaI.

Estudios de impedancia

Los resultados obtenidos por impedancia para las celdas que contienen el pigmento de color rojo fueron analizados utilizando un circuito como el que se muestra en la Figura 2 (Frabregat-Santiago, 2005).

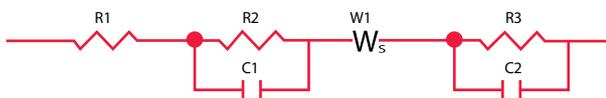


Figura 2. Circuito equivalente para una celda DSSC.

En este modelo los elementos R2 y C1 representan los procesos de transferencia de carga que ocurren sobre el electrodo de trabajo, mientras que R3 y C2 representan lo que ocurre sobre el electrodo auxiliar.

Analizando los valores medidos de acuerdo a este circuito, se pudo observar una gran disminución (a aproximadamente un valor final que representa el 1% del inicial) en los valores de R2 y una duplicación en los valores de la C1, al pasar de condiciones de oscuridad a condiciones de iluminación (con lámpara de led, potencia de 100 watts).

Esto puede apreciarse en forma muy clara al comparar los perfiles de impedancia medidos en ambas condiciones (Gráfico 5).

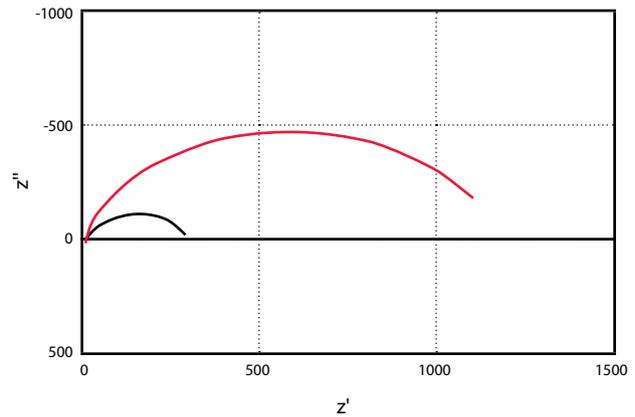


Gráfico 5. EIS de la celda armada en oscuridad (rojo) y en presencia de luz (negro). $E_{aplicado} = -0.467$ V, grafito como electrodo auxiliar.

Discusión

Caracterización electroquímica de los pigmentos

Como se mencionara en la sección previa, en los voltamperogramas obtenidos en presencia de la mezcla de antocianinas se observa una contribución anódica a 1.3 V, con su pico catódico correspondiente a 0.6 V. De acuerdo a la bibliografía corresponderían al comportamiento redox de los grupos OH de las antocianinas en un proceso que tiene lugar en dos etapas. El OH se adsorbe a la superficie del electrodo de trabajo para luego oxidarse a potenciales más altos. La adsorción de estos grupos funcionales ocurre a potenciales más bajos que la del etanol, inhibiendo la oxidación del solvente (Kremer, et al., 2008).

Un potencial de oxidación de 1.3 V es un valor adecuado para el uso de las antocianinas como sensibilizadores de la celda, ya que permitiría, por un lado, la transferencia electrónica hacia el semiconductor de TiO_2 , por otro, su regeneración por la cupla presente en el electrolito (Enciso, et al., 2013).

Estudios de estabilidad

El incremento de la absorbancia con la temperatura se debe a la interacción electrostática planar en los grupos cromóforo de las antocianinas, fenómeno denominado copigmentación. El ión flavilio es casi planar y muestra una deslocalización electrónica que se extiende por todo el grupo cromóforo, y es el responsable de la copigmentación (Rustoni, et al., 2012).

Posteriormente, a partir de 60 °C el fenómeno de copigmentación ya no ocurre y por tanto se observa una meseta en los valores de absorbancia. Asimismo, no ocurre la degradación del pigmento en el rango de temperaturas de 60 °C a 90 °C, reacción en la que las antocianinas devienen en chalconas, las cuales son incoloras. Dado que luego de la

exposición a altas temperaturas no se observan pérdidas en la intensidad del color del pigmento, puede afirmarse la gran estabilidad térmica de las antocianinas del ceibo.

El aumento en los valores de absorbancia al incrementar la concentración de NaI se debe a que el catión Na^+ puede formar complejos con las antocianinas que contienen grupos hidroxilos en el anillo fenólico y de esta manera incrementar la intensidad de color del pigmento.

Por lo tanto, en las condiciones de armado de una celda, las antocianinas muestran un excelente comportamiento frente a su posible uso como sensibilizadores, ya que su capacidad de absorber la luz no se ve afectada por la presencia del solvente, la cupla o el aumento de temperatura.

Estudios de impedancia

Las medidas electroquímicas usando esta técnica permiten evaluar los cambios asociados a la transferencia de electrones que ocurren en una celda de tipo DSSC en funcionamiento. Si una celda contiene los componentes adecuados, es decir, contiene un sensibilizador capaz de transferir electrones al ser excitado por la luz, y luego es capaz de regenerarse a través de la cupla I^-/I_3^- , esto debe verse a través de los cambios observados en presencia de luz en los valores de resistencia y capacidad de los elementos del circuito equivalente utilizado para modelar la celda.

El comportamiento observado en la celda en condiciones de luz respecto a las medidas realizadas en oscuridad está de acuerdo a lo esperado: si el pigmento es capaz de transferir electrones al semiconductor luego de ser excitado con la luz, la resistencia de transferencia de carga debe disminuir.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos por voltamperometría cíclica se determinó que la transferencia electrónica desde el estado excitado del pigmento de la flor del ceibo (*Erythrina crista-galli*) a la banda de conducción del semiconductor podría ser posible, por presentar un potencial de oxidación suficientemente alto con respecto al TiO_2 (0.53 V) (Gao, et al., 2008). Este hecho, así como la regeneración del pigmento por la cupla, se verificó con las medidas de impedancia electroquímica al utilizar este pigmento como sensibilizador en el armado de una celda DSSC.

Asimismo, las antocianinas presentes mostraron una buena estabilidad frente a los diferentes parámetros a los cuales están expuestas al formar parte de la celda: la temperatura, el soluto (NaI) y el solvente (etilenglicol) del electrolito.

En resumen, el pigmento proveniente de la flor del ceibo constituye un buen sensibilizador debido a su absorbancia en el visible, a su estabilidad frente a parámetros físicos y químicos, así como a su gran flexibilidad en la adaptación a nivel molecular, así como a los grupos funcionales que posee y que le permiten su anclado al semiconductor.

Reconocimientos

Se agradece a las instituciones nacionales que financiaron este proyecto de investigación, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y a PEDECIBA Química.

Referencias

- Abal, G., D'Angelo, M., Cataldo, J., y Gutierrez, A., 2011. *Mapa solar del Uruguay. Versión 1.0. Memoria técnica* [En línea]. Montevideo: Universidad de la República. [Consulta: abril de 2014] Disponible en: <http://www.fing.edu.uy/iff/solar/memoria-mapa-solar-v1.pdf>
- Akond, A. S., Khandaker, L., Berthold, J. y Gates, L., 2011. Anthocyanin, total polyphenols and antioxidant activity of common bean. En: *American Journal of Food Technology*, 6(5), pp.385-394.
- Al-Bat'hi, S. A., Alaei, I. y Sopyan, I., 2013. Natural photosensitizers for dye sensitized solar cells. En: *International Journal of Renewable Energy Research*, 3(1), pp.138-143.
- Bisquert, J., Cahen, D., Hodes, G., Rühle, S., Zaban, A., 2004. Physical chemical principles of photovoltaic conversion with nanoparticulate, Mesoporous Dye-Sensitized solar cells. En: *The Journal of Physical Chemistry B*, 1088(24), pp.8106.
- Brumbach, M. T., Boal, A. K. y Wheeler, D. R., 2009. Metalloporphyrin assemblies on pyridine-functionalized titanium dioxide. En: *Langmuir*, 25(18), pp.10685-90.
- Calogero, G. y Di Marco, G., 2008. Red sicilian orange and purple eggplant fruits as natural sensitizers for dye-sensitized solar cells. En: *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 92(11), pp.1341-1346.
- Calogero, G., Yum, H. J., Sinopoli, A., Di Marco, G., Grätzel, M. y Nazeeruddin, M. K., 2012. Anthocyanins and betalains as light-harvesting pigments for dye-sensitized solar cells. En: *Solar Energy*, 86(5), pp.1563-1575.
- Cao, Y. M., Bai, Y., Yu, Q. J., Cheng, Y. M., Liu, S., Shi, D., Gao F. y Wang P., 2009. Dye-sensitized solar cells with a high absorptivity ruthenium sensitizer featuring a 2-(Hexylthio)thiophene conjugated bipyridine. En: *Journal of Physical Chemistry C*, 113(15), pp.6290-6297.
- Chen, C. Y., Wang, M. K., Li, J. L., Pootrakulchote, N., Alibabaei, L., Ngoc-le, C. H., Decoppet, J. D, Tsai, J. H., Grätzel, C., Wu, C. G., Zakeeruddin, S. M., y Grätzel, M., 2009. Highly efficient light-harvesting ruthenium sensitizer for thin-film dye-sensitized solar cells. En: *ACS Nano*, 3(10), pp.3103-3109.
- Dwivedi, C., Dutta, V., Chandiran, A. K., Nazeeruddin, M. K. y Grätzel, M., 2013. Anatase TiO_2 hollow microspheres fabricated by continuous spray pyrolysis as a scattering layer in dye-sensitized solar cells. En: *Energy Procedia*, 33, pp.223-227.
- Enciso, P., Cabrerizo, F. M., Gancheff, J. S., Denis, P. A. y Cerdá, M. F., 2013. Phycocyanin as potential natural dye for its use in photovoltaic cells. En: *The Journal of Solution Chemistry and Modeling*, 2(1), pp.225-233.
- Fabregat-Santiago, F., Bisquert, J., Garcia-Belmonte, G., Boschloo, G. y Hagfeldt, A., 2005. Influence of electrolyte in transport and recombination in dye-sensitized solar cells studied by impedance spectroscopy. En: *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 87(4), pp.117-131.
- Fukuri, N., Masaki, N., Kitamura, T., Wada Y. y Yanagida, S., 2006. Electron transport analysis for improvement of solid-state dye-sensitized solar cells using poly(3,4-ethylenedioxythiophene) as hole conductors. En: *J. Phys. Chem. B*, vol. 110(50), pp.25251-8.
- Gao, F., Wang, Y., Shi, D., Zhang, J., Wang, M. K., Jing, X. Y., Humphry-Baker R., Wang, P., Zakeeruddin, S. M. y Grätzel, M., 2008. Enhance the optical absorptivity of

- nanocrystalline TiO₂ film with high molar extinction coefficient ruthenium sensitizers for high performance dye-sensitized solar cells. En: *Journal of American Chemical Society*, 130(32), pp.10720-10728.
- Grätzel, C. y Zakeeruddin, S. M., 2013. Recent trends in mesoscopic solar cells based on molecular and nanopigment light harvesters. En: *Materials Today*, 16(2), pp.11-18.
- Gross, J., 1987. *Pigments in fruits*. Liverpool: Academic press. ISBN: 0123042003.
- Hao, S., Wu, J., Huang, Y. y Lin, J., 2006. Natural dyes as photosensitizers for dye-sensitized solar cell. En: *Solar Energy*, 80(2), pp.209-214.
- Howie, W. H., Claeysens, F., Miura H. y Peter, L. M., 2008. Characterization of solid-state dye-sensitized solar cells utilizing high absorption coefficient metal-free organic dyes. En: *Journal of the American Chemical Society*, 130 (4), pp.1367-1375.
- Imahori, H., Hayashi, S., Umeyama, T., Eu, S., Oguro, A., Kang, S., Matano, Y., Shishido, T., Ngamsinlapasathian, S., y Yoshikawa, S., 2006. Comparison of electrode structures and photovoltaic properties of porphyrin-sensitized solar cells with TiO₂ and Nb, Ge, Zr-Added TiO₂ composite electrodes. En: *Langmuir*, 22(26), pp.11405-11411.
- Ito, S., Chen, P., Comte, P., Nazeeruddin, M. K., Liska, P., Pechy P., y Grätzel, M., 2007. Fabrication of screen-printing pastes from TiO₂ powders for dye-sensitized solar cells. En: *Progress in Photovoltaics: Research and Applications*, 15(7), pp.603-612.
- Ito, S., Dharmadasa, I. M., Tolan, G. L., Roberts, S. J., Hill, G., Miura, H., Yum, J. H., Pechy, P., Liska, P., Comte, P. y Grätzel, M., 2011. High-voltage (1.8 V) tandem solar cell system using a GaAs/AlXGa(1-X) As graded solar cell and dye-sensitized solar cells with organic dyes having different absorption spectra. En: *Solar Energy*, 85(6), pp.1220-1225.
- Klahr, B. M. y Hamann, T. W., 2009. Performance enhancement and limitations of cobalt bipyridyl redox shuttles in dye-sensitized solar cells. En: *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(31), pp.14040-14045.
- Kremer, C., Cerdá, M. F., Torres, J., Heinzen, H., Bertucci, A., y Domínguez, S., 2008. Electrochemical behavior of flavonoids in the presence of metal ions. En: Hughes, J. G., Robinson, A. J. *Inorganic biochemistry: research progress*. New York: Nova Science Publishers. pp.161-184.
- Li, Y., Ku, S. H., Chen, S. M., Ajmal Ali, M. y AlHemaidFahad M. A., 2013. Photoelectrochemistry for red cabbage extract as natural dye to develop a dye-sensitized solar cells. En: *International Journal of Electrochemical Science*, 8(1), pp.1237-1245.
- Mazza, G. y Miniati, E., 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. En: *Molecular Nutrition*, 38(3), p. 343.
- Miño, J. y Ferraro, G., 2002. Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de *Erythrina crista-galli* L. («Ceibo»). En: *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2), pp.93-98.
- Mitscher, L., Gollapudi, D., Gerlach, D. y Ward, J. 1988. Erycristin, a new antimicrobial petrocarpa from *Erythrina crista galli*. En: *Photochemistry*, 27(2), pp.381-385.
- O'Reagan, B. C., Durrant, J.R. y Bakker, N. J., 2007. Influence of the TiCl₄ treatment on nanocrystalline TiO₂ films in dye-sensitized solar cells. 2. charge density, band edge shifts, and quantification of recombination losses at short circuit. En: *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(37), pp.14001-14010.
- Rabino, I. y Mancinelli, A. L., 1986. Light, temperature and anthocyanin production. En: *Plant Physiology*, 81, pp.922-924.
- Rustoni, L., Bedgood, D. R., Failla, O., Prenzeld, P. D. y Robards, K., 2012. Copigmentation and anti-copigmentation in grape extracts studied by spectrophotometry and post-column-reaction HPLC. En: *Food Chemistry*, 132(4), pp.2194-2201.
- Scogin, R., 1991. Anthocyanins of the Genus *Erythrina* (Fabaceae). En: *Biochemical Systematics and Ecology*, 19, pp.329-332.
- Scott, M. J., Nelson, J.J., Caramori, S., Bignozzi, C. A. y Elliot, C. M., 2007. Cis-Dichloro-bis (4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine) osmium(II)- modified optically transparent electrodes: application as cathodes in stacked dye-sensitized solar cells. En: *Inorganic Chemistry*, 46(24), pp.10071-10078.
- Smestad, G. P., 1998. Education and solar conversion: demonstrating electron transfer. En: *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 55(1), pp.157-178.
- Uruguay. Ley 17283, de 28 de noviembre de 2000. *Diario Oficial*, 12 de diciembre de 2000, p. 932.
- Uruguay. Decreto 173/010, de 1 de junio de 2010. *Diario Oficial*, 8 de junio de 2010, p.1103.
- Wang, P., Yu, Q. J., Wang, Y. H., Yi, Z. H., Zu, N. N., Zhang, J. y Zhang, M., 2010. High-efficiency dye-sensitized solar cells: The influence of lithium ions on exciton dissociation, charge recombination, and surface states. En: *ACS Nano*, 4(10), pp.6032-6038.
- Yella, A., Lee, H-L., Tsao, H. N., Yi, C., Chandiran, A. K., Nazeeruddin, S. M., Diau, W., Yeh, C., S. M. Zakeeruddin, S. M. y Grätzel, M., 2011. Porphyrin-sensitized solar cells with cobalt (II/III)-based redox electrolyte exceed 12 percent efficiency. En: *Science*, 334 (6056), pp.629-634.
- Yoshitama, K., 1987. An acylated delphinidin-3-rutinoside-5,3',5'-triglucoside from *Lobelia erinus*. En: *Phytochemistry*, 16(11), pp.1857-1858.
- Yum, J. H., Moon, S. J., Karthikeyan, C., Wietasch, S. H., Thelakkat, M., Zakeeruddin S. M., Nazeeruddin, M. K. y Grätzel, M., 2012. Heteroleptic ruthenium complex containing substituted triphenylamine hole-transport unit as sensitizer for stable dye-sensitized solar cell. En: *Nano Energy*, 1(1), pp.6-12.
- Zhou, H., Wu, L., Gao, Y. y Ma, T., 2011. Dye-sensitized solar cells using 20 natural dyes as sensitizers. En: *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 219(3), pp.188-194.

ÍNDICE DE AUTORES

Acquarone, Alejandro	7, 14
Araya-Quesada, Yorleny	50
Arcia, Patricia	24
Bombi Haedo, Katherine	19
Cadenazzi, Mónica	61, 70
Camacho, Javier Ignacio	7, 14
Cantera, Ana María	84
Carrara Balbi, María Victoria	19
Carro Techera, Silvana	31
Cartmell, Elise	19
Cerdá Bresciano, María Fernanda	91
Chilibroste, Pablo	31
Colzada Sellanes, Enrique	31
Constantino, Luis Pablo	7, 14
Crosa Balestra, María José	61, 70
Curutchet, Ana	24
Delucchi Zapparat, María Inés	31
Elichalt, Marta	70
Enciso, María Paula	91
Escobar, Daniela	24, 31
Escudero, Jorge	61
Estellano, Gabriel	70
Ferreira, Natalia	19
Ferreira, Verónica	61
Gámbaro, Adriana	43
Garmendia, Juan Gabriel	43
Grille, Lucía	31
Macció Betancurt, Ana Laura	84
Maciel, Andrés	14
Maquieira, Ana María	75
Márquez Romero, Rosa	24
Martínez Bernié, Inés	75
Martínez-Bengochea, Anabel	19
Míguez Caramés, Diana Margarita	19
Montesano, Ana	43
Morales-Torres, Alejandra	50
Mussio, Paula	75
Nolla, Juan Pablo	31
Olazábal, Laura	70
Pagano, Teresa	43
Pelaggio, Ronny	24, 31
Piedrabuena Perdomo, Laura Elizabeth	31
Próspero, María Inés	61

Raggio, Laura María	43
Rampoldi, Cecilia	31
Reinares, Rosana	31
Silva, Roberto	70
Skerl, Verónica	70
Soumastre, Martina	75
Souto, Laura	61
Suburú, Gabriela	61, 70
Tihista, Hugo	61
Torres, Marina	70
Urrestarazu, Pedro	24
Vallés, Diego	84
Vargas-Aguilar, Pedro	50
Vilaró, Francisco	70
Viola, Natalia	31
Wexler, Lea	50

ÍNDICE TEMÁTICO

A

Absorción	21, 50, 52, 58, 61, 62, 63, 64, 92
Aceite	52, 56, 57, 58, 63, 64, 71, 72, 73
Achyrocline satureioides (marcela)	84, 85, 87
Actividad proteolítica de elastasa	85
Adsorción	53, 54, 56, 57, 93, 94
Agua desionizada	20
Aguas	19-23
Alimentos	24-74
Almidón	50, 51, 53, 56, 57, 58, 62
Análisis fisicoquímicos	62
Antocianinas	91, 92, 93, 94, 95
Aves	19
Azocaseína	85, 86, 88, 89

B

Baccharis trimera (carqueja)	84, 85, 87
Balanza de presión	7, 8, 12
Bioacumulación	19, 20
Bioetanol	22
Biofertilizantes	22
Biogás	22
Biomasa	19, 20, 22

Biotecnología 75-90

Blancura	61, 63, 67
--------------------	------------

C

Calibración	7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 32
Calidad de la leche	31, 32, 40
Campana invertida	14, 15, 16, 17
Caracterización electroquímica	93, 94
Caracterización fisicoquímica	64
Carne picada	43, 44, 45, 46, 47, 48, 76
Carne vacuna	77, 78, 81, 82
Caseínas	25, 31, 32, 35, 38, 40
Celdas fotovoltaicas	91, 92
Celdas solares	91, 92
Células somáticas	31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40
Cenizas	50, 51, 53, 61, 63, 64
Chips de papa	70, 71, 72, 73
Coagulación	24, 25, 29, 32, 40, 41
Cohesividad	26, 27, 28, 29, 34, 39, 41, 53, 54, 55, 61, 63, 65, 66, 67
Color	20, 21, 50, 53, 57, 58, 63, 64, 65, 67, 70, 71, 72, 73, 74, 78, 80, 87, 86, 92, 94, 95
Composición de la leche	31, 32, 33, 34, 39, 41
Compuestos organoclorados	19, 22

Conductividad	20, 21, 92
Consumidor	40, 43, 44, 45, 48, 51
Crustáceos	19
Cuajo	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32
D	
DKD-R 6-1	7, 8, 9, 11, 12, 13
Dureza	25, 26, 27, 28, 29, 30, 39, 41, 50, 53, 54, 55, 57, 61, 62, 63, 65, 66, 67
E	
Efluentes industriales	20
Eichhornia crassipes	19, 20
Elastasa	84, 85, 86, 87, 89
Elasticidad	25, 26, 27, 28, 29, 34, 39, 41, 50, 53, 54, 61, 63, 65, 66, 67
Electrodos	93
Energía eléctrica	91, 92
Energía fotovoltaica	91
Escherichia coli	75, 76, 78, 82
Eugenia uniflora (pitanga)	84, 85, 87
Extracto seco	24, 25, 26, 27, 29, 34
Extractos de vegetales	85, 86, 87, 89
Extrusión	61, 62, 63, 64, 67
F	
Fibra total e insoluble	63
Fitopatógenos	84
Fitorremediación	19, 20
Flor del ceibo	91, 92, 93, 95
Fosfatos	19, 21, 51, 52
Fósforo soluble	20, 21
Fósforo total	20, 21
Fritura en vacío	70, 71, 72, 73
G	
Geles cárnicos	50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58
Grano entero	61, 62
Granulometría	61, 62, 63, 64
GUM Workbench	7, 8, 10, 11, 13
H	
Hamburguesas	45, 46, 47, 58, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82
Harina de plátano verde	50, 56, 58
Humedad	9, 24, 26, 27, 29, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 51, 53, 56, 58, 63, 64, 72
I	
Incertidumbre	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
Información nutricional	70
Insectos	19, 89
K	
Kraft	19, 20, 63
L	
Leche	24, 25, 26, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41
Lenguaje R	7, 8, 11
Luminosidad	55, 56, 57, 58, 63, 67, 72
M	
Macroinvertebrados	19
Mamíferos acuáticos	19
Masticabilidad	34, 39, 41, 50, 53, 57, 55, 61, 63, 65, 66, 67
Materia grasa	24, 25, 26, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 40, 41, 61, 63, 64, 70, 72, 73
MCM	7, 8, 10, 11, 12, 13
Mercado	14, 43, 44, 48, 70, 72, 73, 76, 78, 82, 89,
Metales pesados tóxicos	20
Metrología	7-18
Micromanómetros	14
Monte Carlo	7, 8, 10, 11, 13
N	
Nanotecnología	91-96
Nitratos	19, 20, 21
Nutrientes	19, 20, 21, 22, 62

P

Pan multigrano	61, 62
Patrones	7, 8, 14, 15, 32, 79
Peces	19
Pigmento	92, 93, 94, 95
Pigmentos naturales	92
Plantas flotantes	19
Presión diferencial	14, 16
Producción de leche	32
Proteasas	32, 84, 85, 87, 89
Pulpa de celulosa	19, 20, 22

Q

Queso Dambo	24, 25, 29, 30, 31, 33
-----------------------	------------------------

R

Recuento de células somáticas	31, 32, 33, 35, 37, 40
Rendimiento quesero	25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 40, 41
Río Uruguay	19, 20
Rutas de bioacumulación	19

S

Salud	37, 40, 45, 46, 47, 48, 51, 70, 71, 72, 73, 76, 82
Schinus molle (anacahuita)	84, 85, 87
Sensibilizadores naturales	91
Sensorial	24, 25, 26, 28, 29, 30, 43, 62, 70, 71, 72, 73
STEC	75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82

T

Textura	24, 25, 26, 27, 29, 31, 34, 39, 41, 43, 45, 46, 47, 48, 50, 53, 58, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 71
Transglutaminasa	24, 25, 51
Tripsina	62, 84, 85, 86, 87, 88, 89

V

Voltamperometría cíclica	91, 93, 95
------------------------------------	------------





ISO 9001:2008
NRO. 15367



ISO 9001:2008
NRO. 15367



LATU. Centro de Información Técnica
Avda. Italia 6201, entresuelo. Montevideo - Uruguay
Tel.: +[598] 2601 3724 int. 1350
ditec@latu.org.uy
<http://www.latu.org.uy>
<http://ojs.latu.org.uy>