

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

Número 4  
Diciembre 2009

# INN@TEC

Revista anual  
del Laboratorio  
Tecnológico  
del Uruguay

# INNOTEC

Número 4 – Diciembre 2009

INNOTEC (ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea]) es una revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Avda. Italia 6201, Tel.: (598 2) 601 3724, int.: 1364.

La distribución de esta revista es gratuita; para solicitar un ejemplar diríjase a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy).

Prohibida la reproducción total y parcial de artículos y/o materiales gráficos originales sin mencionar su procedencia. Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos son de responsabilidad de sus autores. Todos los derechos reservados ISSN 1688-3691 | ISSN 1510-6593 [en línea].

ISSN: 1688-3691

Título-clave: INNOTEC

Título-clave abreviado: Innotec

ISSN: 1510-6593

Título-clave: Innotec [en línea]

Título-clave abreviado: Innotec [en línea]



# INDICE

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

Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del LATU y autores externos con el objetivo de apoyar el desarrollo de tecnologías que aporten valor a los procesos de innovación.

Este número incluye como artículos invitados el trabajo que recibió el primer premio en INNOVA 2009: IV Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos (LATU, 30 de setiembre, 1-2 de octubre de 2009), y una clave para el reconocimiento de familias, géneros y especies de arañas Mygalomorphae del Uruguay.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a contactarse con el Centro de Información Técnica a través del correo electrónico [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy) para recibir las Instrucciones a los autores (ver pág. 3) y los documentos de referencia de nuestro proceso editorial.

## Director

Ing. Manuel Bello. Gerente de Sistemas de Información, LATU

## Equipo editor

Lic. Celeste Villagrán. Jefe del Centro de Información Técnica, LATU

Lic. Marina Barrientos (edición)

## Documentación

Lic. Lorena Fiori

Lic. Jacqueline Domínguez

Centro de Información Técnica, LATU  
Avda. Italia 6201 2º piso  
Tel.: (598) 2 601 3724, int. 1364  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
[citein.blogspot.com](http://citein.blogspot.com)  
[www.latu.org.uy](http://www.latu.org.uy)

Instrucciones a los autores.....	3
Índice de autores.....	51
Índice temático.....	52

## BIOTECNOLOGÍA

- 5 Evaluación de residuos de la industria forestal por un sistema de FSS de presacarificación con fines a la producción de alcohol  
*López, A., Lopretti, M., Tomasso, M., Duarte, G.*
- 10 Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2  
*Vázquez, S., Crosa, M. J., Rey, F., Lopretti, M.*

## METROLOGÍA

- 15 Evaluación del error debido a la evaporación en el método gravimétrico de calibración de micro pipetas  
*Sica, A., Constantino, P., Hejjo, G., Fabretti, J. A., Santo, C.*
- 19 Intercomparación bilateral entre LATU y PTB de calibración en puntos fijos (ITS-90) del Zn al Hg de un SPRT con PTB como laboratorio piloto  
*Robatto, O., Noatsch, U., Rudtsch, S.*

## TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

- 22 Comparación de los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso Colonia salado tradicionalmente y por impregnación en vacío  
*Crosa, M. J., Harispe, R., Mussio, P., Pelaggio, R., Repiso, L., Silvera, C.*
- 28 Composición química y calidad sensorial de jamones curados provenientes de cerdos alimentados con una dieta rica en ácido oleico y pasturas  
*Echenique, A., Repiso, L., Capra, G.*
- 33 Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador  
*Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R., Márquez, R.*

## INNOVA

- 37 Aplicación de Elastografía por Retorno Temporal a la evaluación de textura en quesos  
*Brum, J., Barrios S., Ares, G., Lema, P., Canetti, R., Negreira, C.*

## INVESTIGADORES EXTERNOS

- 41 Las arañas Mygalomorphae del Uruguay: clave para familias, géneros y especies  
*Montes de Oca, L., Pérez-Miles, F.*

# COMITÉ TÉCNICO DE ARBITRAJE

---

- **M.C. Luis Omar Becerra**

Coordinador científico, División de Masa y Densidad, Centro Nacional de Metrología (CENAM), México.

- **Ing. Agr. PhD Zohra Bennadji**

Investigadora principal del Programa Nacional de Investigación en Producción Forestal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Tacuarembó.

- **Dra. Ing. Liliana Borzacconi**

Profesor titular, Departamento de Ingeniería de Reactores, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay. Presidenta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICYT).

- **Prof. Fernando G. Costa**

Jefe del Laboratorio de Ecología, Etología y Evolución, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), Montevideo.

- **Dra. Ing. Quím. Patricia Gerla**

Profesor titular Grado 5, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.

- **Lic. Patricia Giorgio**

Responsable de las calibraciones de termómetros de resistencia de platino y termocuplas en puntos fijos, Departamento de Patrones Nacionales de Medida, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Argentina.

- **Dr. Ing. Agr. Federico Harte**

Profesor Adjunto. Food Science and Technology. University of Tennessee, Estados Unidos.

- **Dr. Q.F. Tomás López-Pedemonte**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay. Director de proyectos, Planta de Tecnología de los Alimentos (CERPTA), Universidad Autónoma de Barcelona.

- **Dra. María Ester Mancebo**

Jefe de seguimiento y evaluación, Programa Infamilia, Ministerio de Desarrollo Social (MIDES), Uruguay. Docente e investigador de la Facultad de Ciencias Sociales, Universidad de la República, Uruguay.

- **MsSc. Ing. Quím. Jorge Martínez Garreiro**

Profesor Agregado Grado 4, Departamento de Operaciones Unitarias en Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dr. Patrick Moyna**

Director del Departamento Tecnológico de Química, DEPTAQ, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dra. María del Pilar Menéndez Rodríguez**

Profesor Agregado de Farmacognosia y Productos naturales, Laboratorio de Biocatálisis y Biotransformaciones, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dr. Yoshito Mitani Nakanishi**

Director de Metrología de Materiales, Centro Nacional de Metrología (CENAM), México.

- **Dr. Ing. Luis Mussio**

Secretario Ejecutivo del JCRB (Joint Committee of the Regional Metrology Organizations), Bureau International des Poids et Mesures (BIPM), Francia.

- **Q. F. Annamaria Narizano**

Coordinadora de Cooperación Técnica Internacional, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

- **Dr. Luis Alberto Panizzolo**

Profesor e investigador, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dr. Ing. Agr. Fernando Rivas**

Director del Programa Nacional de Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Salto, Uruguay.

- **Dra. Sonia Rodríguez**

Investigadora y Profesor Adjunto, Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Ing. Agr. Cadmo Rosell**

Editor técnico, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

- **Dr. Ing. Kyösti Ruuttunen**

Manager de proyectos. Laboratorio de Química de productos forestales, Helsinki University of Technology, Finlandia.

- **Dr. Ing. Berardi Sensale**

Docente e investigador, Facultad de Ingeniería, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dr. Gustavo Seoane**

Director del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dra. Matilde Soubes**

Directora del Departamento de Biociencias, Facultad de Química. Profesor catedrático de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

- **Dra. Quím. Silvana Vero**

Profesor Agregado Cátedra de Microbiología, Facultad de Química, Universidad de la República.

- **Dra. Carmen Viera**

Sección Entomología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay. Jefa de Laboratorio Ecología del Comportamiento, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

- **Dra. Noemí Zaritzky**

Directora del CIDCA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT La Plata CONICET. Profesor Titular del Área Departamental de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

# Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

## Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos o artículos editados y autorizados por el correspondiente comité editor, dentro de los campos de interés de la institución. Esta publicación anual recopila las investigaciones realizadas por técnicos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) y autores externos en el marco de distintos proyectos.

El proceso de revisión de esta revista comienza con el (a) envío por parte del autor de su texto completo, por vía electrónica, a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). El Centro de Información Técnica (CITEIN) del LATU notifica al autor la recepción del texto y remite el artículo al miembro idóneo del (b) comité técnico de arbitraje del proceso editorial de INNOTEC, quien evaluará el desarrollo específico del mismo, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos. El (c) responsable editorial se comunica con el autor en respuesta a los comentarios que hace el evaluador del artículo. El (d) CITEIN edita el artículo aplicando en el texto las normas del manual de estilo, y envía la última versión revisada al autor para su aprobación final.

Se debe considerar para poder incluir artículos completos, que los mismos no deberán tener derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío del artículo. Los autores deberán firmar un formulario de cesión de derechos autorales y enviarlo a [ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy). En el caso de artículos con derechos de autor, solo se publicarán aquellos que cuenten con autorización expresa de la empresa a cargo de su edición.

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

LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

## Normas de presentación de los textos

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

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

La estructura de los textos incluye: un **resumen**, en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana; **palabras clave** (que no repitan los términos ya utilizados en el título); el texto de una (1) a diez (10) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes).

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

## Formato y estilo

- **Autor.** Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.
- **Título.** Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.
- **Resumen.** Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.
- **Introducción.** Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.
- **Material y Métodos.** Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.
- **Resultados.** Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.
- **Discusión (Conclusión).** Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.
- **Agradecimientos.** Breve reconocimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.
- **Referencias.** Ver *Manual de estilo de presentación de citas y referencias documentales del LATU* (solicitar en el Centro de Información Técnica del LATU).

## Ejemplos usuales de referencias:

### Monografías

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

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

*El Lazarillo de Tormes*. Marañón, Gregorio (prol.). 10a ed. Madrid: Espasa Calpe, 1958. (Colección Austral; 156).

### Revistas como un todo

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

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

### Artículos de revistas

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

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

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

## Normas

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

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN (España). UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: *Gestión de la I+D+I*. Madrid: AENOR, 2002.

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

## Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

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

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

## Patentes

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

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

## Secciones

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

## Fórmulas, figuras, tablas e imágenes

Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión).

Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla ni colocarlas en más de un folio o en forma perpendicular al texto.

El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas.

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

## Denominaciones en latín

Deben ir en cursiva.

---

# Evaluación de residuos de la industria forestal por un sistema de FSS de presacarificación con fines a la producción de alcohol

López, A. <sup>(1)</sup>, Lopretti, M. <sup>(1)</sup>, Tomasso, M. <sup>(2)</sup>, Duarte, G. <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Bioprocesos y Biotecnología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU - <sup>(2)</sup> Departamento de Bioprocesos y Biotecnología (2007-2008), LATU - <sup>(3)</sup> Departamento de Bioprocesos y Biotecnología (2007-2008), LATU (febrero - mayo 2009)

Contacto: mlopre@latu.org.uy

Recibido: 2/7/2009 - Aprobado: 25/11/2009

## Resumen

Con este trabajo se pretende colaborar en el desarrollo de la tecnología para la transformación de materiales lignocelulósicos en bioetanol mediante un proceso eficiente y económicamente rentable que facilite su implementación a nivel industrial. En un sistema de fermentación sólida se trataron residuos de la industria forestal mediante un procedimiento en dos etapas. Primero se inoculó el material con microorganismos que presentan actividad ligninolítica (*Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*) y luego con microorganismos con actividad celulolítica (*Trichoderma reesei*).

Para evaluar los resultados se determinó el contenido de azúcares fermentables, donde pudo observarse que las muestras tratadas con hongos mostraron un mayor contenido al ser comparadas con muestras sin tratar. Otros parámetros evaluados fueron el ADF y el NDF, los cuales descendieron en el material tratado, manifestando una probable predigestión.

Se realizaron medidas de absorbancia a longitudes de onda entre 200nm y 400nm para evaluar los productos de degradación de lignina, observándose un aumento en las muestras tratadas. Para evaluar la efectividad del tratamiento se realizaron sacarificaciones enzimáticas sobre el material tratado y el material sin tratar, determinándose luego por DNS los azúcares reductores obtenidos. El resultado determinó que con el tratamiento se obtuvo un aumento en los azúcares del 45 %.

El aumento en los rendimientos obtenidos permite considerar su utilización como metodología de presacarificación de bajo costo. Se considera promisorio la aplicabilidad del proceso y debido a la variabilidad obtenida se seguirá trabajando en su optimización.

Palabras clave: residuos lignocelulósicos, microorganismos ligninolíticos, sacarificación enzimática, azúcares reductores.

## Abstract

This work intends to collaborate in the development of the technology needed to transform lignocellulosic materials into bioethanol through a process that is both efficient and profitable so it can be deployed in the industry. In a system of solid fermentation, waste from the forestry industry was treated in a two stage process. At first, the material was inoculated with microorganisms that present ligninolytic activity (*Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*) and then with microorganisms with cellulolytic activity (*Trichoderma reesei*). To assess the results, the fermentable sugars content was determined, and the samples treated with fungi showed a higher content than the untreated ones. Other parameters took into consideration where the ADF and the NDF, which were lower in the treated material, showing a plausible predigestion. Some measures of absorbance at wavelengths in between 200nm and 400nm were made to assess the products from the lignine degradation and it showed an increase in the treated samples. To assess the effectiveness of the treatment, enzymatic sacarifications were done on both treated and untreated material and the reductor sugars were later measured through DNS. As a result, an increase of 45 % was found in the treated samples. The high performances obtained allows us to consider it as a low cost presacarification methodology. The applicability of the process appears to be promising and because of the high variability of the results there will be further work done in its optimization.

Keywords: lignocellulosic materials, ligninolytic microorganisms, enzymatic sacarifications, reductor sugars.

## Introducción

La búsqueda de combustibles sustitutos del gasoil y la gasolina para lograr la autosuficiencia energética y la independencia de precios del petróleo se ha transformado en una meta para varios países que promueven el desarrollo industrial sustentable. Además, el calentamiento global de la atmósfera, la emisión de gases de efecto invernadero y las catástrofes ambientales producidas a partir de derrames de hidrocarburos han motivado aún más la exploración de fuentes de energía alternativas.

Dentro de este contexto aparecen como una gran oportunidad los

biocombustibles, entre ellos el bioetanol, y entre las materias primas los residuos de la industria forestal como aportadores de celulosa y azúcares fermentables.

En contraste con lo que ocurre en la conversión de maíz a etanol, la ruta que involucra la conversión de celulosa a etanol implica poca o ninguna contribución a la emisión de gases de efecto invernadero (Demain, 2005).

La lignocelulosa es el componente principal de las plantas leñosas y no leñosas y representa la fuente principal de materia orgánica renovable. Grandes cantidades de "residuos" lignocelulósicos son generados a partir de las prácticas agrícolas y forestales que se

transforman en un problema de contaminación ambiental. Lamentablemente, gran parte de los residuos lignocelulósicos se disponen para su quemado, lo cual no se restringe únicamente a los países en vías de desarrollo, sino que se considera un fenómeno global (Levine, 1996). Sin embargo, las grandes cantidades de biomasa residual de plantas consideradas como "desecho" podrían potencialmente convertirse en productos con valor agregado, incluyendo biocombustibles, químicos, fuentes de energía económica para fermentación, alimentación animal mejorada y nutrientes humanos.

Los residuos lignocelulósicos están compuestos por lignina, hemicelulosa y celulosa. Debido a la complejidad de disolver la lignina sin destruirla, su estructura química exacta es difícil de dilucidar. La lignina está unida a la hemicelulosa y a la celulosa formando un sello físico alrededor de estos dos componentes, lo que genera una barrera impenetrable a soluciones y enzimas. Una de las problemáticas existentes es cómo deslignificar y predigerir la celulosa en forma eficiente y económica, lo cual luego permita hidrolizar y fermentar efectivamente.

De los tres componentes, la lignina es la más recalcitrante a la degradación, mientras que la celulosa es más resistente a la hidrólisis que la hemicelulosa. Tanto métodos de hidrólisis ácidos (Nguyen, 1993), como alcalinos (Chahal, 1992) han sido utilizados para degradar lignina. La optimización de pretratamientos químicos y físicos para fuentes específicas de biomasa es un campo de creciente interés (Ragauskas, 2006). Para muchos procesos las enzimas son preferidas a los procesos ácidos o alcalinos, ya que producen biocatálisis específicas, pueden operarse en condiciones menos extremas, no generan productos indeseados y son amigables con el medio ambiente.

Una herramienta importante para reducir el costo de esta depolimerización es el pretratamiento de estos lignocelulósicos para lograr una matriz biomásica más accesible a las enzimas. Los beneficios de estos pretratamientos están unidos a los recientes esfuerzos en investigación que han reducido los costos de las celulosas.

Uno de los pretratamientos biológicos utilizados es la fermentación en estado sólido (SSF). Otras estrategias para el bioprocésamiento de la lignocelulosa incluyen tratamientos anaeróbicos, composteo, producción de proteína unicelular para alimentación animal de ruminantes y el cultivo de hongos (Smith, 1987).

La fermentación en estado sólido se caracteriza por la completa o casi completa ausencia de líquido libre. El agua, esencial para la actividad microbiana, está presente en forma absorbida o complejada con la matriz sólida y el sustrato (Canel y Moo-Young, 1980). Estas condiciones de cultivo son adecuadas especialmente para el crecimiento de hongos, debido a que crecen en cantidades de agua relativamente bajas. Las SSF son prácticas para sustratos complejos que incluyen residuos agroindustriales, forestales y del procesamiento de alimentos y desechos utilizados como fuente de carbono para la producción de enzimas lignocelulolíticas.

El SSF es un proceso atractivo para producir enzimas microbianas utilizando materiales lignocelulósicos provenientes de desechos agroindustriales, debido al bajo capital de inversión y al bajo costo operativo (Chahal, 1996; Haltricht, 1996; Jecu, 2000). Este proceso, por lo tanto, sería ideal para los países en vías de desarrollo.

El objetivo primario de los tratamientos de los lignocelulósicos por las diferentes industrias es el acceso potencial a la celulosa incrustada en la matriz de lignocelulosa (Malherbe, 2003). Éstos establecen que la combinación de la tecnología de la SSF con la habilidad de un hongo apropiado para degradar lignina selectivamente hará posible la implementación a escala industrial de biotecnologías basadas en lignocelulosa.

Las especies del género *Pleurotus* presentan una serie de propiedades organolépticas y nutritivas, así como una reconocida capacidad biodegradativa. Tienen capacidad de secretar diversas oxidasas y fenoloxidasas, lo que le permite crecer en sustratos que contienen lignina y compuestos fenólicos.

Los hongos de la pudrición blanca como *Phanerochaete chrysosporium* o *Pleurotus ostreatus*, pertenecientes a los basidiomicetes, y el hongo de podredumbre parda *Gloeophyllum*

*trabeum* son los más eficientes degradadores de lignina (Gold y Alic, 1993). La ruptura de lignina se produce a través del uso de una familia de enzimas extracelulares llamadas colectivamente "ligninasas". Dos familias de enzimas ligninolíticas juegan un rol clave en la degradación enzimática: fenol oxidasa (lacasa) y peroxidasa (Lignina peroxidasa) (LiP) y manganoso peroxidasa (MnP) (Krause, 2003; Malherbe y Cloete, 2003).

Estos hongos también producen enzimas extracelulares capaces de hidrolizar la celulosa. El complejo celulolítico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, la exo- $\beta$ -1,4-glucanasa y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa. El hongo más estudiado a nivel piloto es *Trichoderma reesei*.

Las celulosas y las hemicelulasas tienen numerosas aplicaciones y potencial biotecnológico para la industria química, de combustibles, de alimentos, de bebidas, textil, pulpa y papel (Bhat, 2000; Sun y Cheng, 2002).

La reducción de costos en el bioprocésamiento se logrará por una combinación de los tratamientos que involucran pretratamientos y utilización de celulosas y hemicelulosa con otros pasos del proceso. Se ha propuesto una combinación en la producción de enzimas con los pasos de fermentación mediante microorganismos modificados capaces de producir celulosa y fermentación alcohólica, lo cual podría proveer de una liberación de la mezcla óptima de enzimas hidrolíticas específicas. En general, la fermentación de una mezcla de hexosas y pentosas es ineficiente, debido a que no se ha encontrado ningún organismo que pueda convertir todos los azúcares en etanol con altos rendimientos.

Durante más de 50 años una de las principales áreas de investigación de la biotecnología de lignocelulósicos ha sido conducida por la necesidad de aislar e identificar microorganismos que fueran productores de nuevas enzimas lignocelulolíticas. Desde la perspectiva de aplicación, el interés se ha focalizado además en encontrar enzimas que pudieran romper la lignocelulosa rápidamente, pero también que pudieran soportar pH, temperatura y agentes inhibitorios más exitosos dependiendo de la intención de la aplicación.

Uno de los desafíos que plantea la biotecnología de lignocelulósicos es, por tanto, lograr la deslignificación a gran escala con objeto de liberar la celulosa para su utilización como fuente de azúcares fermentables. Los azúcares generados a partir de los lignocelulósicos son una mezcla de hexosas (glucosa) y pentosas (xilosa y arabinosa). Las hexosas pueden fácilmente ser fermentadas a etanol empleando cepas industriales de *S. cerevisiae*. Sin embargo, no se han encontrado variedades *Saccharomyces* que puedan fermentar pentosas como xilosas a etanol, ni otros organismos que combinen todas las características industriales relevantes requeridas para la fermentación efectiva de xilosa a etanol (Attfield y Bell, 2006).

Los pretratamientos de los lignocelulósicos permiten mejorar la reactividad de los polisacáridos, reducir el tiempo de hidrólisis (velocidad) y así aumentar el rendimiento (Mosier, 2006).

Actualmente están ocurriendo grandes avances en este sentido, por medio de los microorganismos genéticamente modificados. Otro desafío importante involucra la necesidad de entender y manipular la tolerancia a etanol y azúcares y la resistencia a potenciales inhibidores generados en los tratamientos de presacarificación.

## Materiales y Métodos

### Preparación del sustrato

De acuerdo a los residuos forestales disponibles se ensayaron diferentes mezclas para determinar aquella que permitiera un adecuado crecimiento fúngico incorporando el mayor contenido de aserrín posible. La mezcla seleccionada consistió en un 60 % de chips de madera, 20 % de aserrín y 20 % de viruta.

Esta mezcla fue ensayada a dos escalas:

1. Escala banco: seis bandejas con 10 K cada una. Fueron rotuladas de 1 a 6, la número 1 no fue inoculada inocular (blanco).
2. Escala campo: nueve cajones con 57 K cada uno.

## Inoculación con hongos ligninolíticos

1. Escala banco: Se inocularon cinco bandejas (rotuladas de 2 a 6) con 2 K de mezcla de partes iguales en peso de inóculo de *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* crecido sobre semillas de trigo. Se preparó otra bandeja en las mismas condiciones pero sin inocular para que actuara como blanco (rotulada 1). Sesenta días más tarde se inocularon con *Trichoderma reesei* crecido sobre semillas de trigo con el fin de favorecer la sacarificación final (Figura 1).

2. Escala campo: Se inocularon los nueve cajones con 3 K de *Trametes versicolor* y 3 K de *Pleurotus ostreatus* crecido sobre semillas de trigo. Pasados los tres meses se inocularon con 3 K de *Trichoderma reesei* crecido sobre semilla de trigo con el fin de favorecer la sacarificación final.



Figura 1. Crecimiento fúngico en el tratamiento de madera.

## Seguimiento de la FSS

Para evaluar el tratamiento a escala banco se tomaron muestras en diferentes días y se realizaron las siguientes determinaciones:

### 1. Porcentaje de humedad, mediante secado a 65 °C hasta lograr peso constante.

Para este ensayo, de las cinco bandejas tratadas en las mismas condiciones se seleccionaron al azar la número 2 y la número 5, en tanto la número 1 actúa como blanco. Para la toma de muestra, de cada bandeja se realizó una mezcla de submuestras tomadas en las cuatro esquinas y en el centro de cada una.

### 2. FDA (Fibra detergente ácida). PEC QCO MPCC F 003 (\*) FDN (Fibra detergente neutra). PEC QCO MOCC F 004 (\*) Lignina. PEC QCO MPCC F 003 (\*)

Para este ensayo, de las cinco bandejas tratadas en las mismas condiciones se seleccionaron al azar la número 3 y la número 6, en tanto la número 1 actúa como blanco. Para la toma de muestra, de cada bandeja se realizó una mezcla de submuestras tomadas en las cuatro esquinas y en el centro de cada una.

Las muestras fueron secadas y molidas de manera de obtener un granulado homogéneo que permitiera obtener resultados comparables en los duplicados realizados para cada muestra, no superando 1 % de diferencia entre los resultados obtenidos.

Para ello se procedió a secar 100 g de cada muestra en estufa a 65 °C hasta peso constante y luego se molió en un molino martillo.

### 3. Análisis de azúcares liberados luego de la sacarificación enzimática de residuos de madera con y sin tratamiento. (\*)

Se extrajeron al azar muestras de las bandejas número 1, 2 y 3 del borde y centro de cada bandeja, rotulándose 1, 2 y 3 a las extraídas del borde de la bandeja (mezcla de las cuatro esquinas) y 1', 2' y 3' a las extraídas del centro. Se secaron las muestras en estufa a 65 °C

hasta peso constante. Se pesaron 2 g de muestra seca en un erlenmeyer de 125 ml, se agregaron 25 ml de buffer acetato pH 4.8 y 5 ml de una solución de enzima celulasa (solución con 20 g/l de enzima con 40.000u/g), lo que corresponde a 4000u de enzima.

Además, para verificar la actividad enzimática en otro erlenmeyer, rotulado "papel", se pesaron 2 g de papel de filtro whatman N° 1 con 25 ml de buffer acetato y 5 ml de la solución enzimática. Todos los erlenmeyers se mantuvieron en baño de agua sin agitación durante 6 hs. a 50 °C y luego se retiraron los recipientes a freezer para analizar al día siguiente su contenido en azúcares reductores por el método de DNS.

**Método de DNS:** Se colocaron 0,4 ml del filtrado en un tubo de ensayo y se agregaron 4 ml de reactivo DNS. Paralelamente se realizó un blanco con 0,4 ml de agua destilada.

Se incubó a 100 °C durante 10 minutos y se midió absorbancia relativa al blanco a 540 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando soluciones de glucosa de 0,8, 1,6, 3,2, 4,8 y 6,4 mg/ml, las cuales se prepararon a partir de una solución estándar de 8 mg/ml.

(\*) Para poder realizar estos ensayos las muestras fueron secadas y molidas de manera de obtener un granulado homogéneo. Para ello se procedió a secar 100 g de cada muestra en una estufa a 65 °C hasta obtener peso constante y luego se molió en un molino martillo.

Para evaluar los resultados que podrían obtenerse con diferentes concentraciones de enzima, se realizaron hidrólisis sobre la muestra rotulada 2'. Para esto se secó una muestra a 80 °C hasta peso constante y se molió para conseguir tamaño homogéneo de partículas. Se colocaron 5 g del material molido y 50 mL de agua destilada. El pH se ajustó a 4,8 con solución de HCl 10% (v/v). El tratamiento enzimático se efectuó durante 6 hs. a 45 °C en baño de agua con agitación. Se trabajó con cuatro concentraciones de enzima diferentes: 80 u/ml, 120 u/ml, 160 u/ml y 200 u/ml para los 5 g de sustrato. Se realizaron duplicados para cada concentración ensayada.

### 4. Identificación de productos de degradación de lignina.

Se retiraron muestras de las seis bandejas. Para la toma de muestra, de cada bandeja se realizó una mezcla de submuestras tomadas en las cuatro esquinas y en el centro de cada una. A éstas se le agregó una solución de NaOH al 30 % en una relación de 6 % (p/v). Se mantuvieron durante 30 minutos a 30 °C con agitación intermitente.

Para cada una de ellas se determinaron las absorbancias a longitud de onda 254, 280, 310 y 354 nm.

### 5. Determinación de azúcares reductores a partir del proceso realizado a escala de 57 K (campo).

Para evaluar una primera aproximación de los resultados obtenidos para un pequeño aumento de escala, se realizó la determinación de azúcares reductores a partir del proceso realizado a escala de 57 K (campo). Para ello se extrajeron muestras al azar de dos cajones ensayados. En ambos se retiró una muestra un mes después de la inoculación con *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (1 y 1A) y una muestra luego de la inoculación con *Trichoderma reesei* (2 y 2A). Se secaron las muestras en estufa a 65 °C hasta peso constante. Se trabajó con una concentración de enzima de 10.000 u.

## Resultados

Los resultados se exponen en el mismo orden en el que fueron presentados los procedimientos en la sección Materiales y Métodos.

1. Los resultados correspondientes a la determinación del porcentaje de humedad se exponen en la Tabla 1. La humedad se mantuvo en un rango entre 55 y 65 °C durante todo el proceso, lo cual es adecuado para los requerimientos de los hongos empleados.

Fecha de extracción	Nº de bandeja	% Humedad
Día 1	1	59,8
	2	57
	5	58,9
Día 30	1	65,3
	2	66,3
	5	63,8
Día 70	1	58
	2	55
	5	59,6
Día 85	1	65,6
	2	60,4
	5	65,2

Tabla 1. Determinación del % de humedad.

2. Los resultados correspondientes a FDA, FDN y lignina se expresan en la Tabla 2.

	Bandeja 1 (muestra del día 1)	Bandeja 1 (muestra del día 85)	Bandeja 3 (muestra del día 85)	Bandeja 6 (muestra del día 85)
Lignina (g/100g)	42	43	38	41
FDA Fibra detergente ácida (g/100g)	70	69	66	55
FDN Fibra detergente neutra (g/100g)	81	83	72	74

Tabla 2. Determinación de lignina, FDA y FDN.

En los resultados no se observaron cambios significativos en el parámetro correspondiente a lignina. Debido a que podría inferirse una tendencia a disminuir, se evaluaron los productos de degradación de lignina mediante la medida de absorbancias a longitudes de onda entre 200 y 400 nm (ver punto 6).

En el caso de FDA se observa una tendencia más clara a la disminución respecto al blanco, al igual que en la modificación en fibras totales FDN incluida la celulosa (posiblemente hidrolizada de forma parcial).

3. Análisis de azúcares liberados luego de la sacarificación enzimática de residuos de madera con y sin tratamiento. Los resultados de azúcares reductores obtenidos luego de la sacarificación enzimática se señalan en la Tabla 3.

Muestra	Absorbancia $\lambda_{570 \text{ nm}}$	Concentración de glucosa (g/l)	Promedio
1	0,1797	1,516	1,27
1'	0,1119	1,032	
2	0,2489	2,011	---
2'	0,0970	---	
3	0,2492	2,013	1,86
3'	0,1851	1,555	
Papel	1,1647	8,559	

Tabla 3. Azúcares reductores obtenidos luego de la sacarificación enzimática (la muestra Papel corresponde a un standard).

Ecuación de la recta de regresión de la curva de calibración con glucosa:

$$A_{570} = 0,13987 [\text{Glucosa}] - 0,03240$$

$$R^2 = 0,99872$$

$$[\text{Glucosa}]_B = (0,1458 + 0,03240) / 0,13987 = 1,2740 \text{ g/L}$$

$$[\text{Glucosa}]_T = (0,2277 + 0,03240) / 0,13987 = 1,8596 \text{ g/L}$$

Pudo apreciarse que el rendimiento del tratamiento se encuentra por encima del logrado sin tratamiento con hongos:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 1,8596 \times 100 / 1,2740 = 146\%$$

Este resultado indica que podría conseguirse un 46 % más de liberación de azúcares mediante el tratamiento de la madera con estos hongos.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis con mayores concentraciones de enzima sobre la muestra rotulada 2', se expresan en la Tabla 4. Para esto se secó una muestra a 80 °C hasta peso constante y se molió para conseguir tamaño homogéneo de partículas. Se colocaron 5 g del material molido y 50 mL de agua destilada. El pH se ajustó a 4,8 con solución de HCl 10% (v/v). El tratamiento enzimático se efectuó durante 6 hs. a 45 °C en baño de agua con agitación.

Muestra	Unidades enzima	A <sub>570</sub>	Glucosa (g/l)
1	4000	0,42	3,2
1A	4000	0,42	3,2
2	6000	0,53	4
2A	6000	0,49	3,7
3	8000	0,47	3,6
3A	8000	0,55	4,2
4	10000	0,59	4,4
4A	10000	0,54	4,1

Tabla 4. Hidrólisis enzimática del sustrato.

Se observa una tendencia al aumento de la glucosa liberada con la concentración de enzima. También se aprecia variabilidad en los duplicados, probablemente inherente a la variabilidad del sustrato. Esto nos indica que deben optimizarse las condiciones de la hidrólisis para lograr los mejores resultados.

4. Determinación de productos de la degradación de lignina. Los resultados obtenidos están contenidos en la Tabla 5.

MUESTRA	$\lambda_{354}$	$\lambda_{310}$	$\lambda_{280}$	$\lambda_{254}$
Bandeja 1	0,2303	0,3744	0,5426	0,6662
Bandeja 1 (duplicado)	0,2165	0,3551	0,5135	0,6314
Bandeja 2	0,4066	0,6685	0,9502	1,1831
Bandeja 3	0,4132	0,6785	0,9506	1,1837
Bandeja 4	0,3024	0,5045	0,7247	0,9056
Bandeja 5	0,4701	0,7713	1,0977	1,3620
Bandeja 6	0,3456	0,5743	0,8076	0,9996

Tabla 5. Absorbancias específicas de productos de degradación de lignina.

De los espectros realizados se ve un incremento en las absorbancias a 354, 310, 280, 254 nm de las muestras con tratamiento. Este aumento puede estar asociado al incremento en las mismas de compuestos monoméricos u oligoméricos de lignina degradada. Asimismo, puede asociarse con procesos oxidativos de la lignina, lo cual permitiría obtener mayor cantidad de estos compuestos.

5. Los resultados de la determinación de azúcares reductores a partir del proceso realizado a escala de 57 K (campo) se muestran en la Tabla 6. Los azúcares obtenidos en las muestras 1 y 2 son muy bajos, pero aumentan claramente en las muestras 1A y 2A. Este aumento podría deberse a que éstas ya estaban pretratadas, tanto para lograr una deslignificación (*Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus*) como una presacarificación (*Trichoderma reesei*). Este resultado hace pensar también en la posibilidad de aumentar la escala del proceso sin mayores dificultades.

Identificación de la muestra	Absorbancia	[Glucosa] (g/l)
1	0,2056	0,49
2	0,2348	0,55
1 A	2,1344	4,20
2 A	3,2860	6,42

Tabla 6. Azúcares reductores obtenidos luego de la sacarificación enzimática (escala campo).

## Conclusión

Es posible concluir que los residuos forestales evaluados en este trabajo son utilizados como sustrato y modificados por los hongos evaluados.

En general, las metodologías de hidrólisis de lignocelulósicos a azúcares fermentables utilizadas son químicas o enzimáticas y requieren instalaciones de planta con inversiones costosas.

El pretratamiento diseñado implica una manipulación simple, lo cual permite un escalado a nivel productivo sin grandes inversiones. Esta propuesta permitiría obtener oligómeros de celulosa por una presacarificación en fermentación semisólida.

Los resultados alcanzados hacen posible considerar que la optimización de este proceso podría mejorar los rendimientos, con un aumento en los azúcares fermentables obtenidos.

El costo del pretratamiento es bajo y puede emplearse con un doble propósito simultáneo: tratamiento de mejora de proceso y gestión del residuo.

El sistema de fermentación sólida permite realizar un diseño de tratamiento durante el estoqueo, mediante el cual se inocula el material disponiéndolo en trincheras.

En el rendimiento a escala piloto, el resultado primario del aumento del 46 % en azúcares reductores podría indicar que de aplicarse este tratamiento durante un tiempo más prolongado se alcanzarían mejores rendimientos y una mayor transformación.

La conversión de estos azúcares a alcohol por las tecnologías tradicionales es ya bien conocida, al igual que sus rendimientos.

La optimización de esta metodología permitirá su utilización, contribuyendo con el objetivo de lograr una mayor transformación de la biomasa lignocelulósica. Se deberá seguir trabajando en la conformación consorcial de los agentes (hongos) y en los procesos de extracción de los azúcares y formulación de una melaza comercial a partir de madera. Estos son algunos de los nuevos desafíos a considerar para trabajos futuros.

## Reconocimientos

Este trabajo se realizó en conjunto con la Empresa NALAVIP S.A. (Grupo de Industrias de la madera del Departamento de Paysandú) y con la Intendencia Municipal de Paysandú quienes colaboraron activamente en el desarrollo de este proyecto.

## Referencias

- ATTFIELD, P.; BELL P. Use of population genetics to derive nonrecombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains that grow using xylose as a sole carbon source. En: *FEMS Yeast Research*. 2006 (6/6):862-868.
- BHAT, M. Research review paper: cellulases and related enzymes in biotechnology. En: *Biotechnology Advances*. 2000, (18):355-383.
- CANEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. En: *Process Biochemistry*. 1980, (15):24-28.
- CHAHAL, D. Bioconversions of polysaccharides of lignocellulose and simultaneous degradation of lignin. En: KENNEDY et al. *Lignocellulosics: science, technology, development and use*.

London: Ellis Horwood Limited, 1992. pp. 83-93.

- CHAHAL, P.; CHAHAL, D. Production of cellulose in solid – state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG 80 on wheat straw. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, (57/58):433-442.
- CHRISTOPHERSON, C.; ANDERSON, E.; JAKOBSEN, T.; WAGNER, P. Xylanases in wheat separation. En: *Starch*. 1997, (49):5-12.
- COOMBS, J. EEC resources and strategies. En: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A*. 1987, (321):405-422.
- DEMAIN, A. L.; NEWCOMB, M.; WU, J.H.D. Cellulase, clostridia, and ethanol. En: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005, (69):124-154.
- GOLD, M.H.; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. En: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1993, 57(3):605-622.
- HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K.D., et al. Production of fungal xylanases. En: *Bioresource Technology*. 1996, (58):137-161.
- JECU, L. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. En: *Industrial Crops and Products*. 2000, (11):1-5.
- KRAUSE, D.O. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen. En: *FEMS Microbiology Reviews*. 2003, (27):663-393.
- LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Steady-state measurements of lactic acid production in a wild-type and a putative D-lactic acid dehydrogenase-negative mutant of *Zymomonas mobilis*: influence of glycolytic flux. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, (429):98-100.
- LEONOWICZ, A. Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of björkman lignin and some phenolic compounds. En: *Holzforschung*. 1999, (53):376-380.
- LEVINE, J. S. Biomass burning and global change. En: LEVINE, J. S. *Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa*. v.1. Massachusetts: MIT Press, 1996. pp.35
- MALHERBE, S.; CLOETE, T.E. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. En: *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2003, (1):105-114.
- MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. En: *Bioresource Technology*. 2005, 96(6):673-686.
- MOSIER, N. *Dry grind processing bridge to cellulosic ethanol. ag. and bio. engineering* [En línea]. West Lafayette: Purdue University, s.d. [Consulta: enero 2006]. Disponible en: fairway.ecn.purdue.edu/~lorre/16/research/bioenergy\_symposium-mosier-22FEB06.pdf
- NGUYEN, Q. A. Economic analyses of integrating a biomass-to-ethanol plant into a pulp/saw mill. En: SADDLER, et al. *Bioconversion of forest and agricultural plant*. s.l.: CAB International, 1993. pp. 321-340.
- RAGAUSKAS, A.J. The path forward for biofuels and biomaterials. En: *Science*. 2006, (311):484-489.
- RAJARTHANAM, S. Biodegradation and biosynthesis capacities of mushrooms: present and future strategies. En: *Critical Review in Biotechnology*. 1998, 18(283):91-236.
- SMITH, J. E.; ANDERSON, J. G.; SENIOR, E.K., et al. Bioprocessing of lignocelluloses. En: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. A*. 1987, (321):507-521.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review. En: *Bioresource Technology*. 2002, 83(1):1-11.
- ZHANG, Y.H.; LYND, L.R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: Bioenergetics and hydrolysis product assimilation. En: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, (102):7321-7325.

# Viabilidad del uso de suero de quesería como base del medio de cultivo de la cepa nativa probiótica *Lactobacillus paracasei* HA9-2

Vázquez, S. <sup>(1)</sup>, Crosa, M. J. <sup>(2)</sup>, Rey, F. <sup>(1)</sup>, Lopretti, M. <sup>(1)</sup>

Contacto: frey@latu.org.uy

<sup>(1)</sup> Departamento de Biotecnología y Bioprocesos. Gerencia de Proyectos Generales. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(2)</sup> Gerencia de Proyectos Alimentarios. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

Recibido: 30/6/2009 - Aprobado: 13/11/2009

## Resumen

El suero de quesería constituye un importante residuo de la industria láctea en Uruguay, por lo cual es importante encontrar alternativas viables para su uso. En este trabajo se evaluó el suero de queso como base para el desarrollo de un medio de cultivo de la cepa probiótica nativa *Lactobacillus paracasei* HA9-2. Se ensayaron diferentes concentraciones de carbohidratos y se evaluaron los efectos del agregado de sales como sulfato de magnesio y manganeso, una fuente de nitrógeno y del prebiótico comercial goma de acacia. A efectos comparativos se realizaron cultivos en MRS, medio específico para bacterias lácticas.

Los resultados obtenidos indican que el suero de queso con una concentración de carbohidratos de 70 g/l es un medio óptimo para el desarrollo de esta cepa. Tanto el agregado de sales como de fuente de nitrógeno y prebiótico producen mejoras importantes en la biomasa. Pero en el balance de costos realizado, al comparar la formulación del medio con el incremento de la biomasa producida, se concluye que el suero de queso como único componente es el óptimo para el cultivo de la cepa probiótica HA9-2. Asimismo, se probó el efecto prebiótico de la goma de acacia sobre esta cepa.

Palabras clave: probiótico, prebiótico, suero de queso.

## Abstract

The cheese whey is an important residue of the dairy industry in Uruguay, so it is necessary to find new viable alternatives for its use. We evaluated the cheese whey as a base for the development of a probiotic native *Lactobacillus paracasei* HA9-2 strain culture media. Several carbohydrate concentrations, salt effects as magnesium sulfate and manganese sulfate, a nitrogen source and a commercial prebiotic addition as acacia rubber were assayed. Comparative assays in lactic bacteria commercial media known as MRS were made. The results indicate that the cheese whey with 70 g/l of carbohydrates is an ideal media for the strain development. The salt addition as well as the nitrogen source and commercial prebiotic addition improve and increase the biomass. Finally, if we analyze the costs balance, and we compare the costs of the media and the increase of the biomass, we can conclude that the cheese whey is the best for the HA9-2 probiotic strain as the only component of the media. The acacia rubber prebiotic effect on this strain was also tested.

Keywords: probiotic, prebiotic, cheese whey.

## Introducción

El suero de queso constituye un importante desecho de la industria láctea. Si bien su composición es variada y depende del tipo de queso del que proviene, retiene hasta el 55 % de los nutrientes de la leche, como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Panesar et al., 2007). Por este motivo y por los importantes problemas de contaminación que genera su descarte como efluente –presenta un índice de DBO (demanda biológica de oxígeno) de 5,20–, sus usos alternativos constituyen un tema de investigación activa (Zumbado, Esquivel y Wormg, 2006).

La utilización del suero como tal es un gran problema, por la dificultad de su transporte y del mantenimiento de condiciones microbiológicamente aceptables, ya que es susceptible a la contaminación por bacterias, hongos y fagos (Zumbado, Esquivel y Wormg, 2006). Para solucionar esta dificultad, existen varias empresas en nuestro país que transforman el suero de queso en polvo. Recientemente comenzaron obras en la empresa PILI para construir una planta dedicada a procesar el suero de queso. Se espera que procese 220.000 litros de suero por día.

Uno de los aprovechamientos estudiados para el suero de queso es

su bioutilización para producir ácido láctico por *Lactobacillus casei* en un sistema de células inmovilizadas (Panesar et al., 2007).

Es sabido que los *Lactobacillus* son bacterias muy exigentes en factores de crecimiento; son varios los trabajos que reportan la inclusión en el medio de extracto de levaduras o lisado de proteínas, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y vitaminas para mejorar la producción de ácido láctico en suero (Panesar et al., 2007; Aeshlimann y Von Stockar, 1990; Arasaratnam, Senthuran y Balasubramaniam, 1996).

También se ha reportado la producción de ácido láctico a partir de lactosuero por varias especies de *Lactobacillus*, ensayando diferentes concentraciones de suero entre 20 y 100 g/l en reactores operando en modo batch y continuo, con diferentes aditivos, como extracto y sales, y diferentes condiciones de agitación (Serna y Rodríguez, 2005; Tango y Ghaley, 1999a). Tango (1999b) ha descrito la utilización de suero de queso para producción de ácido láctico por *Lactobacillus helveticus* en condiciones batch con un control continuo de temperatura y pH para lograr mejores rendimientos de biomasa y de ácido láctico. El foco de los estudios anteriores en el ácido láctico radica en sus variadas aplicaciones en la industria alimentaria, química y farmacéutica.

Macedo et al. (2002) han estudiado el efecto de suplementar el medio en base a suero con sales y vitaminas para la producción de

exopolisacáridos (EPS) por parte de *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M, llegando a la conclusión que en el suero con sales y vitaminas se lograban las producciones de EPS más altas reportadas hasta la fecha.

Se ha planteado la aptitud del suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus* (Lomas de León y Rojas, 2005).

Más recientemente, Zumbado et al. (2006) desarrollaron un medio en base a suero de quesería para la producción de biomasa por tres levaduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr* y *Saccharomyces cerevisiae*), con el objetivo de producción de proteínas para alimentación animal.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un medio en base a suero de quesería para el cultivo de la cepa *Lactobacillus paracasei* HA9-2. Es una cepa nativa, de origen humano, identificada como *Lactobacillus paracasei* por ensayos moleculares y denominada HA92 (Vázquez et al., 2007). Su cultivo en suero presenta la ventaja de su adaptación a un medio similar al de los productos en los cuales es factible su incorporación, entre ellos yogur y queso probiótico.

Debido a la importancia reportada por numerosos autores de la presencia de sales en la conversión de glucosa a ácido láctico por las bacterias lácticas, se estudiaron distintas formulaciones de medios de cultivo en base a suero de queso suplementado con sales (Panesar et al., 2007; Waldir et al., 2007; Xu et al., 2006).

## Materiales y Métodos

### Cepa bacteriana

La cepa denominada HA-9, nativa, de origen humano, fue identificada como *Lactobacillus paracasei* por ensayos moleculares. La misma se encuentra en el Banco de Cepas del Laboratorio Tecnológico del Uruguay, conservada a -20 °C en leche y glicerol.

### Evaluación de diferentes concentraciones de suero

Se realizaron dos pasajes en MRS de la cepa realizando cultivos overnight en condiciones de microaerobiosis a 37 °C sin agitación para el desarrollo del inóculo de las fermentaciones. Se ajustó la concentración del inóculo en  $1,0 \times 10^8$  ufc/ml por espectrofotometría. Se inocularon diferentes matraces de 500 ml al 1,0 % conteniendo 400 ml de suero de queso en concentraciones de carbohidratos de 20g/L, 50 g/L y 70 g/L y MRS estéril. El suero de queso fue previamente tratado térmicamente a 100 °C durante 30 minutos. Por tratarse de un medio no translúcido, su esterilidad se verificó por recuentos posteriores a su incubación a 37 °C durante 24 horas. Se condujeron ensayos por duplicado. Se utilizaron como control matraces sin inocular. En los cultivos se evaluaron las unidades formadoras de colonias a diferentes tiempos por recuento en placa de MRS y en los medios en base a suero la producción de ácidos orgánicos por titulación con NaOH 0,1N.

### Agregado de magnesio, manganeso, extracto de levadura y prebiótico

Se realizaron fermentaciones en batch en diferentes medios:

- suero de queso 70 g/l de carbohidratos;
- suero de queso suplementado con sulfato de magnesio hepta hidratado 0.3 g/l y sulfato de manganeso tetra hidratado 0.03 g/l;
- suero de queso suplementado con sulfato de magnesio hepta hidratado 0.3 g/l, sulfato de manganeso tetra hidratado 0.03 g/l y extracto de levadura al 0.5 % p/v;
- suero de queso 70 g/l de carbohidratos suplementado con prebiótico (Fibergum) al 0,5 % y al 1 % p/v. Se condujo un ensayo por duplicado utilizando como blanco un matraz de cada uno de los medios sin inocular.

El desarrollo del inóculo y las fermentaciones se efectuaron de la misma forma que en los ensayos anteriores. En los cultivos se evaluaron las unidades formadoras de colonias a diferentes tiempos por recuento en placa de MRS y el cambio de pH en el medio de cultivo a lo largo de la fermentación. El agregado de extracto de levadura modifica el color del medio dificultando la determinación del punto final de la titulación con NaOH, por lo que se realizaron medidas directas de pH.

### Evaluación de diferentes valores de pH en el desarrollo de los cultivos

Se realizaron fermentaciones en batch en suero de queso (70 g/L de carbohidratos) a pH 5,0, 5,5 y 6,0. El pH, tanto en el control como en los ensayos, fue mantenido utilizando HCl 10 N y NaOH 10N esterilizados por filtración. Los ensayos fueron seguidos por recuento a diferentes tiempos y el pH se controló cada una hora.

### Viabilidad económica de los medios evaluados

En primer lugar, se evaluó la factibilidad económica de la utilización del suero de queso como medio para la fermentación utilizando como referencia el MRS, un medio sintético óptimo para el desarrollo de *Lactobacillus*. Para ello se realizó una comparación de los costos para un reactor de 1000 litros.

En segundo lugar, se evaluó la factibilidad económica de la utilización de suero de queso, suero con agregado de extracto de levadura y suero con agregado de prebiótico. Se determinaron los costos de las distintas formulaciones para un reactor de 1000 litros y se hizo un balance entre los costos y la producción de biomasa.

## Resultados y Discusión

### Evaluación de diferentes concentraciones de suero

La mayor producción de ácido y de biomasa se dio en el suero de 70 g/l de carbohidratos, como se observa en el Gráfico 1 y la Tabla 1. En las curvas de crecimiento (Gráfico 2) se observa que la cepa presenta una fase lag de aproximadamente dos horas, lo que permite concluir que es una cepa adaptada a este tipo de medio.

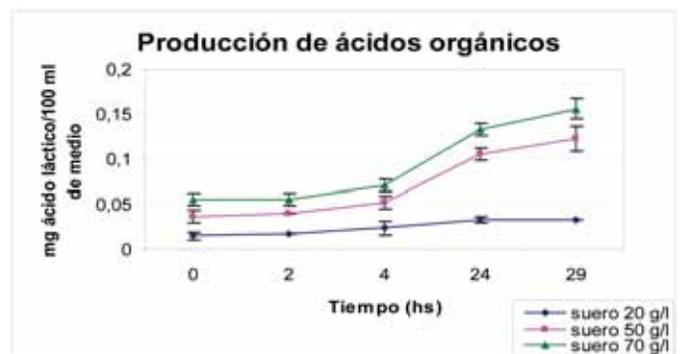


Gráfico 1. Producción de ácidos orgánicos determinada por valoración con NaOH a diferentes tiempos de fermentación.

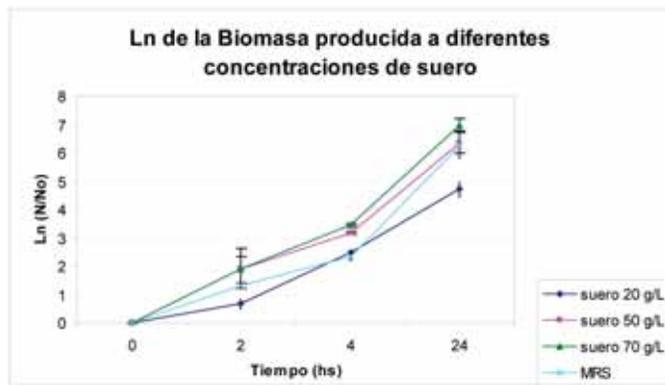


Gráfico 2. Logaritmo Neperiano de unidades formadoras de colonia por mililitro en función del tiempo de fermentación.

En la Tabla 1 se presentan algunos parámetros de las fermentaciones realizadas en batch en el suero con distintas concentraciones de carbohidratos, a modo de presentar el número de células iniciales, finales, fase lag, N/No. La fase exponencial no se pudo determinar con exactitud en esta experiencia y por este motivo no pudo calcularse la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ).

Parámetros	Suero 20 g/l	Suero 50 g/l	Suero 70 g/l	MRS control
Fase lag (hs)	2	2	2	2
Número de células inicial	5,20E+06	3,50E+06	2,80E+06	4,90E+06
Número final de células	5,80E+08	2,04E+09	3,04E+09	2,58E+09
N/No	111	583	1214	526

Tabla 1. Algunos parámetros de las fermentaciones en las diferentes concentraciones de suero de queso realizadas en batch y en MRS como control.

No se pudo obtener la concentración de ácido láctico en MRS por titulación con NaOH debido a que el color del medio impidió determinar el punto final.

### Agregado de magnesio, manganeso, extracto de levadura y prebiótico

Las variaciones del pH a lo largo de las fermentaciones se expresan en el Gráfico 3. Se observa que en el suero suplementado con sales y extracto de levadura se produce una acidificación mayor del medio en comparación con el suero sin suplementar. Las diferencias de acidificación entre el suero sin suplementar y el suplementado sólo con sales no son significativas. No se presentan variaciones en la duración de la fase lag (aproximadamente dos horas) entre los diferentes medios, por lo que las variaciones observadas en el pH no se deben a diferencias en las adaptaciones a los medios.

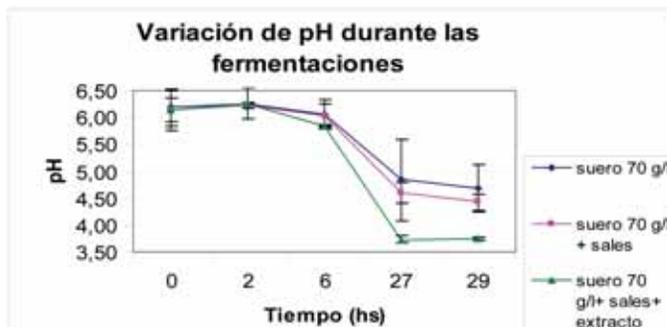


Gráfico 3. Variación del pH debida a la suplementación del medio con sales y extracto de levadura.

Los resultados de producción de biomasa (Tabla 2) indican un mayor crecimiento en el suero con extracto de levadura y sales, triplicándose al cabo de 24 hs de fermentación.

Parámetros	Suero 70 g/l	Suero 70 g/l + sales	Suero 70 g/l + sales + extracto de levadura
Fase lag (hs)	2	2	2
Número de células inicial	4,37E+06	5,73E+06	3,77E+06
Número final de células	1,50E+09	1,78E+09	3,53E+09
N/No	345	313	961

Tabla 2. Parámetros de las fermentaciones en batch en suero 70 g/l suplementado.

En el Gráfico 4 se presentan las curvas de crecimiento de la cepa en distintas formulaciones de medio. No se observan diferencias de comportamiento entre el suero y el suero suplementado con sales. Se observa un cambio en la cinética de crecimiento de la bacteria en el suero suplementado con sales y extracto de levadura.

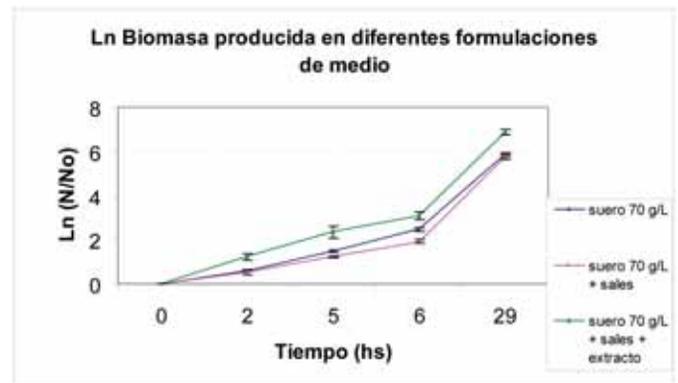


Gráfico 4. Logaritmo neperiano de la variación de la biomasa generada debida a la suplementación del medio con sales y extracto de levadura.

En relación al efecto del prebiótico, no se producen diferencias significativas de la cinética de crecimiento entre los cultivos en suero, en suero con prebiótico al 0,5 % y suero con prebiótico al 1 % (Gráfico 5). Se observa un aumento del 32 % de biomasa al suplementar el medio con el prebiótico al 0,5 % (Tabla 3).

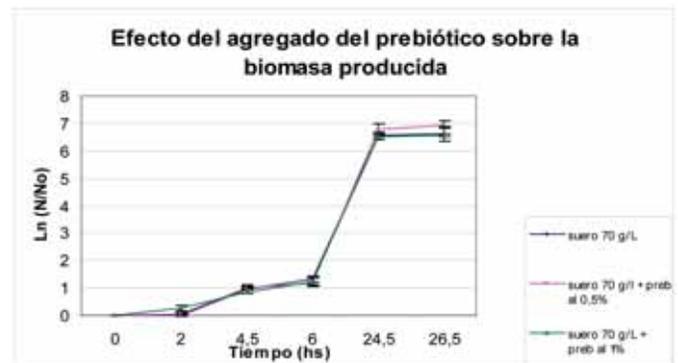


Gráfico 5. Logaritmo neperiano de la relación de biomasa (N) vs. biomasa al inicio de la fermentación (No) en función del tiempo.

Parámetros	Suero 70 g/l	Suero 70 g/l + prebiótico al 0,5%	Suero 70 g/l + prebiótico al 1%
Fase lag (hs)	2	2	2
Número de células inicial	5,85E+06	6,50E+06	6,15E+06
Número final de células	4,60E+09	6,75E+09	4,33E+09
N/No	766	1044	706

Tabla 3. Parámetros de las fermentaciones batch en suero 70 g/l suplementado con diferentes concentraciones de prebiótico.

## Evaluación de diferentes valores de pH en el desarrollo de los cultivos

En el Gráfico 6 se observa el efecto del pH en la cinética de crecimiento de los cultivos en suero con 70 g/l de carbohidratos. Se produce un mayor desarrollo de esta cepa de *L. paracasei* a pH 6,0; se determinó una relación de N/No final de 6,1, mientras que para pH 5,0 la misma es de 2,94 y a pH 5,5 es 4,76.

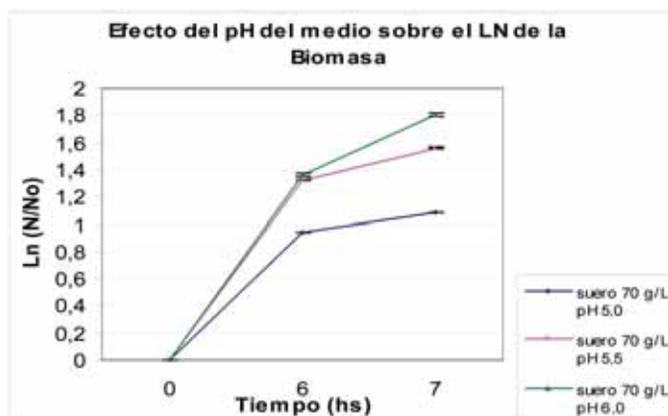


Gráfico 6. Curva de crecimiento a diferentes valores de pH utilizando el suero de queso como medio para la fermentación, expresada como N/No en función del tiempo.

## Viabilidad económica de los medios evaluados

En la Tabla 4 se presentan los costos de formulación de los diferentes medios de cultivo.

Costo (US\$/1000 litros)	MRS reconstituido	Suero 70 g/l	Suero de 70 g/litro con los suplementos	
			con extracto de levadura	con prebiótico
	11550	210	1088	276

Tabla 4. Costo de formulación de los medios de cultivo.

El agregado de extracto de levadura al suero de queso aporta nutrientes importantes para el desarrollo de la cepa HA9-2, provocando un aumento de casi el triple de producción de biomasa (Tabla 2). Sin embargo, el costo de formulación del suero con extracto de levadura es cinco veces mayor al costo del suero de 70g/l, no resultando económicamente viable.

La inclusión del prebiótico en el medio de cultivo provoca un incremento de la biomasa producida del 36 % (Tabla 3). Si bien el incremento en el costo de formulación es del 31,3 %, es necesario tener en cuenta en el balance económico el aumento de las actividades necesarias para la producción del medio. El prebiótico debe ser esterilizado por separado antes de incluirlo en el medio, aumentando el consumo de energía y, por consiguiente, el costo del proceso.

## Conclusiones

El desarrollo de la cepa probiótica nativa *Lactobacillus paracasei* HA9-2 en suero de queso a diferentes concentraciones de carbohidrato fue muy bueno, ya que se obtuvieron concentraciones superiores a las obtenidas en MRS, que es un medio específico para *Lactobacillus spp.* En el suero de queso con 70 g/l de carbohidratos se obtuvieron los mejores resultados de producción de biomasa.

El agregado de las sales sulfato de magnesio y de manganeso no produjo diferencias importantes que justifiquen su inclusión en el medio de fermentación. Sin embargo, la inclusión del extracto de levadura conjuntamente con las sales, duplicó la producción de biomasa. Es sabido que los *Lactobacillus* son bacterias exigentes en metabolitos como vitaminas, aminoácidos y minerales, y que el extracto de levadura aporta principalmente nitrógeno y vitaminas del complejo B. Pero el agregado de extracto presenta la desventaja de aumentar sustancialmente el costo del medio.

Dentro de los valores de pH ensayados para el suero de queso con 70 g/l de carbohidratos como medio de fermentación se producen desarrollos mejores a pH 6,0.

Los resultados obtenidos demostraron el efecto prebiótico de la goma de acacia sobre la cepa HA9-2 de *L. paracasei*. Asimismo, el poder estabilizante de la fibra sobre las emulsiones en conjunción con el efecto constatado sobre la cepa HA9-2 es un punto de partida para la investigación y diseño de alimentos probióticos. No obstante, en este caso particular no se aconseja su inclusión en el medio de fermentación debido al balance de costos desfavorable.

## Reconocimientos

Agradecemos a Carolina Ottati por su invaluable colaboración.

## Referencias

- AESHLIMANN, A.; VON STOCKAR, U. The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeates by *Lactobacillus helveticus*. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1990, 32(4):398-402.
- ARASARATNAM, V.; SENTHURAN, A.; BALASUBRAMANIAM, K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. En: *Enzyme and Microbial Technology*. 1996, (19):482-486.
- LOMAS DE LEON, Y.; ROJAS, C. Aprovechamiento de suero de leche de cabra como sustrato para el desarrollo de un producto fermentado probiótico con *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus*. En: Universidad de Guanajuato; Universidad de Nuevo León. *VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, (Guanajuato 1-3 de octubre 2005). Guanajuato: Universidad de Guanajuato, 2005. pp.475-484.
- MACEDO, M.; LACROIX, C.; GARDNER, J.; CHAMPAGNE, C. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. En: *International Dairy Journal*. 2002, (12):419-426.
- PANESAR, P.; KENNEDY, J.M.; GANDHI, D.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic production. En: *Food Chemistry*. 2007, (105):1-14.
- SERNA, L.; RODRIGUEZ, A. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. En: *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2005, 5 (1):54-65.
- TANGO, M.; GHALEY, A. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. En: *Biomass and Bioenergy*. 1999a, (17):221-238.
- TANGO, M.; GHALEY, A. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under

- batch conditions. En: *Biomass and Bioenergy*. 1999b, (16):61-78.
- VÁZQUEZ, S.; LOPRETTI, M.; REY, F.; ZUNINO, P. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus* spp. para su uso como probióticos en la industria láctea. En: *INNOTEC*. 2007, (2):12-14.
  - WALDIR, E.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.; QUILLAMA, E.; EGOAVIL, E. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. En: *Revista Peruana de Biología*. 2007, 14 (2):271-275.
  - XU, G.; CHU, J.; WANG, Y.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; PENG, H. Development of a continuous cell-recycle fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. En: *Process Biochemistry*. 2006, (41):2458-2463.
  - ZUMBADO, W.; ESQUIVEL, P.; WORNG, E. Selección de una levadura para producción de biomasa, crecimiento en suero de queso. En: *Agronomía Mesoamericana*. 2006, 17(2):151-160.
-

# Evaluación del error debido a la evaporación en el método gravimétrico de calibración de micro pipetas

Sica, A. <sup>(1)</sup>, Constantino, P. <sup>(1)</sup>, Heijo, G. <sup>(2)</sup>, Fabretti, J. A. <sup>(2)</sup>, Santo, C. <sup>(1)</sup>

Contacto: asica@latu.org.uy

<sup>(1)</sup>Departamento de Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(2)</sup>Aphos SRL.

Recibido: 30/7/2009 - Aprobado: 8/12/2009

## Resumen

La calibración de micro pipetas por el método gravimétrico consiste en la carga con agua destilada del instrumento y la posterior descarga en un recipiente abierto. Uno de los errores más frecuentes en este método es el provocado por la evaporación. El objetivo del presente trabajo es cuantificar dicho error y evaluar modificaciones al método gravimétrico convencional que permitan disminuirlo.

Para estudiar la magnitud de este efecto se estima el valor del volumen descargado antes de la evaporación, extrapolando la masa a tiempo cero a partir del gráfico de masa en función del tiempo. Se compara este valor con el obtenido de la lectura directa de la masa luego de la estabilización de la balanza, a un minuto de la descarga.

Se estudia una forma de disminuir la evaporación realizando la descarga en un recipiente con aceite vegetal, ya que por poseer una densidad menor al agua ésta queda ocluida en él. Esta variación del método se compara cuantitativamente con el método gravimétrico convencional con el fin de evaluar la incidencia de esta modificación.

Se concluye que la variación propuesta de descargar en un recipiente con aceite ofrece ventajas operativas, arrojando resultados de calibración comparables.

Palabras clave: gravimetría, evaporación, descarga, aceite, ventajas.

## Abstract

The calibration of piston pipettes by the gravimetric method consists on filling the instrument with distilled water and a subsequent deliver into an open vessel, located on the balance where the weighing is performed. One of the most frequent errors in calibrations by this method is caused by the phenomenon of evaporation. The purpose of this study is to quantify that error and to evaluate modifications to the conventional gravimetric method in order to decrease it.

To study the magnitude of this effect, we estimate the value of the volume delivered before the evaporation process, plotting the mass vs time and extrapolating the value of mass at zero time. This value is compared with the value obtained from direct reading after the stabilization of the balance, that is one minute after dispensing.

We study a way to reduce evaporation performing delivery in a vessel with vegetable oil, since by having a lower density than water the delivery is occluded in, minimizing evaporation. This quantitative variation of this method is compared with the conventional gravimetric method to evaluate the impact of this change in evaporation effect.

We conclude that the alternative procedure of delivering in a vessel with oil provides operational benefits, yielding comparable calibration results.

Keywords: gravimetry, evaporation, discharge, oil, advantages.

## Introducción

El método más sencillo y que requiere de menor equipamiento para calibrar micro pipetas es el de gravimetría. Dicho método consiste en descargar con la micro pipeta un líquido de densidad conocida (generalmente agua destilada) en un recipiente cuya masa es medida antes y después de la descarga. Conociendo la masa del líquido y su densidad puede calcularse el volumen descargado.

Los factores que tienen mayor influencia en la incertidumbre de calibración por este método pueden ser el tipo de construcción del instrumento (pistón-cilindro defectuoso, desgaste, etcétera), el propio método (diferencias en la presión de descarga, variaciones en la temperatura y otras condiciones del ensayo) y errores sistemáticos como la evaporación de la descarga de agua en el recipiente de pesaje o calibración de la balanza, entre otros.

El objetivo de este estudio es cuantificar la influencia de la evaporación en los resultados de calibración. Para minimizar la incidencia de la evaporación pueden utilizarse dispositivos disponibles

en el mercado que mantienen una atmósfera saturada de humedad en el recipiente de pesada o saturar el ambiente interior de la balanza donde se realiza la descarga.

Para cuantificar los efectos de la evaporación en cualquier condición es posible realizar la descarga en condiciones estándar de la temperatura y humedad, y registrar la lectura de la balanza a distintos tiempos. Con estos valores se realiza la regresión lineal y se obtiene el valor de masa correspondiente a tiempo cero, es decir, en el momento exacto que se realiza la descarga, cuando el efecto por evaporación puede suponerse nulo. Este método permite cuantificar, y por lo tanto corregir, los errores por evaporación, pero incrementa significativamente el tiempo de ensayo y agrega otras fuentes de incertidumbre, como lo es la deriva de la balanza, la medida de tiempo, etcétera.

La alternativa que se propone es utilizar un medio de descarga que disminuya la evaporación de modo que no sea necesario efectuar la corrección por el método de extrapolación. El medio seleccionado es aceite vegetal, el cual por su menor densidad que el agua ocluye la gota de descarga y disminuye así la evaporación.

## Materiales y Métodos

### Equipos empleados

Pipeta de volumen variable de 20  $\mu\text{l}$  a 200  $\mu\text{l}$ . Se elige una pipeta de volumen variable. Marca Nichiryo, modelo Nichipet EX, número de serie H7 1004991, división 0,2  $\mu\text{l}$ .

Comparador de masa de capacidad máxima 100g. Marca Sartorius, modelo C 100, serie 7050 1031 y división 0,001 mg.

Termómetro de división 0,1  $^{\circ}\text{C}$  con termocupla. Marca Newport, modelo True RMS, número de serie 6000334.

Cronómetro marca Casio.

Termohigrómetro y barómetro. Marca testo, modelo 454, número de serie 05604540 y divisiones 0,1  $^{\circ}\text{C}$ , 0,1%HR y 1hPa.

Recipientes de vidrio. Para la descarga de la pipeta.

Varilla de vidrio.

### Reactivos

Líquido de calibración. Agua destilada.

Aceite vegetal.

### Procedimiento experimental

Se evaluarán los resultados obtenidos si se aplican los dos procedimientos descritos con la variante sugerida (agregado de aceite).

#### Procedimiento de calibración que compensa el efecto de evaporación

- Se coloca el tip en la punta de la micro pipeta y se realizan tres enjuagues con agua destilada.
- Se miden las condiciones ambientales de temperatura, humedad y presión atmosférica, y la temperatura inicial del agua destilada.
- Se coloca el recipiente de pesada en la balanza y se aplica la tara.
- Se pipetea con agua destilada y se vierte en el recipiente de pesada. En ese momento se inicia el conteo del cronómetro.
- Se anotan las lecturas a 30, 60, 90, 120 y 150 segundos.
- Por último se registra la temperatura final del agua destilada.

#### Modificación realizada

Se coloca en recipiente de pesada un volumen de aceite muy superior al volumen de agua utilizado en todo el proceso de calibración y se sigue el procedimiento detallado anteriormente. En este caso debe tenerse la precaución de que toda el agua descargada quede cubierta por el aceite. Con este fin se utiliza la varilla, de manera de sumergir la gota con movimientos suaves.

#### Procedimiento simplificado (no compensa el efecto de evaporación)

Este procedimiento es igual al anterior pero en el paso e) sólo se registra la lectura a los 60 segundos de la descarga. También se realiza la modificación propuesta (agregado de aceite) para este procedimiento.

En todos los casos se toman medidas con la micro pipeta en volúmenes nominales de 50  $\mu\text{l}$  y 200  $\mu\text{l}$ , registradas por dos operadores y con un número de cinco repeticiones cada uno.

### Procesamiento de datos

#### Modelo matemático para procedimiento de calibración que compensa el efecto de evaporación

Este procedimiento considera la realización de medidas de masa descargada a distintos tiempos. Se realiza una regresión lineal de los resultados de masa obtenidos en cada ensayo a 30, 60, 90, 120 y 150 segundos, de manera de obtener la pendiente y la ordenada en el origen en cada caso. La pendiente representa la evaporación media (variación media de la masa de agua descargada en el recipiente en función del tiempo), mientras que la ordenada en el origen representa la masa descargada a tiempo cero según el modelo matemático aplicado.

Para el tratamiento de datos se calcularon los promedios de todas las medidas realizadas por los dos operadores que participaron en cada ensayo.

El volumen descargado por la micro pipeta a 20  $^{\circ}\text{C}$  se calcula según la siguiente ecuación (ec. 1):

$$V_{20} = (M_d) \cdot \left( \frac{1}{\rho_w - \rho_A} \right) \cdot \left( 1 - \frac{\rho_t}{\rho_B} \right) \cdot (1 - \gamma \cdot (t - 20)) \quad (\text{ec. 1})$$

Donde:

$M_d$  es promedio de las masas a tiempo cero (extrapoladas a partir de las regresiones lineales realizadas) (g).

$\rho_A$  es la densidad del aire (g/ml).

$\rho_B$  es la densidad de las pesas utilizadas en la calibración de la balanza.

$\rho_w$  es la densidad del agua a t  $^{\circ}\text{C}$  (g/ml).

t es la temperatura del agua de calibración.

$\gamma$  es el coeficiente de dilatación térmica del material del instrumento (en el caso de micro pipetas corresponderá al coeficiente de expansión térmica del material del sistema de pistón del instrumento, en este caso se usa el correspondiente al polipropileno de  $\gamma=1,0\text{E}-05$   $1/^{\circ}\text{C}$ ).

#### Modelo matemático para procedimiento simplificado

En este modelo no se corrige el efecto por evaporación, calculando se el volumen de la micro pipeta a partir de la masa descargada media a un minuto de realizada la descarga.

Para ello se utiliza la ecuación (ec. 1), pero usando el promedio de las lecturas de la balanza a un minuto de la descarga. Todos los valores promediados están en las mismas condiciones de temperatura y ambientales, teniendo en cuenta las incertidumbres en las variables de influencia. Por esta razón es válido promediar las masas descargadas en lugar de los volúmenes.

#### Estimación de incertidumbre

La incertidumbre correspondiente a ambos procedimientos de calibración fue calculada como la suma cuadrática de las componentes tipo A y tipo B (según ISO/IEC 98-3).

#### Evaluación del error por evaporación

Como forma de evaluar si el error sistemático debido a la evaporación es significativo, se propone normalizarlo, es decir, calcular el error normalizado como indica la siguiente ecuación (ec. 2):

$$En = \frac{E}{\sqrt{(U_{ref}^2 + U_{resultado}^2)}} \quad (\text{ec. 2})$$

$En$  = Error normalizado

$E$  = Resultado – Valor de referencia (error debido a la evaporación).

$U_{ref}$  = Incertidumbre expandida del valor de referencia.

$U_{resultado}$  = Incertidumbre expandida del resultado informado.

Como valor de referencia se utilizará en todos los casos el valor de calibración obtenido a partir del método de descarga en recipiente seco, considerando la evaporación. Un error normalizado superior a 1 implica que el error en la medición es significativo.

## Resultados y Discusión

### Resultados del procedimiento de calibración que compensa el efecto de evaporación

Las Tablas 1 y 2 expresan los resultados para los volúmenes nominales de 50 µl y 200 µl, respectivamente, utilizando las dos variantes del método.

	Agua	Aceite
Temperatura media (°C)	20,17	20,76
Volumen a 20 °C (µl)	50,12	50,14
Error (µl)	0,12	0,14
Incertidumbre expandida (µl)	0,29	0,19
Evaporación media (mg.s <sup>-1</sup> )	-4,9E-03	-4,4E-05
Repetibilidad pendiente (mg.s <sup>-1</sup> )	8,2E-03	7,0E-05
Evaporación en un minuto (µl)	0,30	0,05

Tabla 1. Resultados obtenidos para el volumen de 50 µl.

	Agua	Aceite
Temperatura media (°C)	20,63	20,63
Volumen a 20 °C (µl)	200,50	200,56
Error (µl)	0,50	0,56
Incertidumbre expandida (µl)	0,24	0,60
Evaporación media (mg.s <sup>-1</sup> )	-7,7E-03	-1,5E-04
Repetibilidad pendiente (mg.s <sup>-1</sup> )	1,4E-03	1,6E-04
Evaporación en un minuto (µl)	0,61	0,01

Tabla 2. Resultados obtenidos para el volumen de 200 µl.

En el Gráfico 1 se muestran los promedios de las pendientes correspondientes a las regresiones lineales para las dos variantes del método.

Esta pendiente es una medida de la pérdida de masa de agua por evaporación con respecto al tiempo en ambas variantes. Se observa en el caso de la descarga en aceite que el efecto de la evaporación puede considerarse despreciable frente a los valores correspondientes a la descarga en el recipiente seco. Por otro lado, se observa que utilizando un recipiente seco la pendiente de evaporación es mayor para el mayor volumen nominal. Esto se debe a que estas pendientes no son relativas al volumen. Si se relativizan al volumen, las pendientes de evaporación son menores para mayores volúmenes, ya que la relación área expuesta/volumen es menor en este caso.

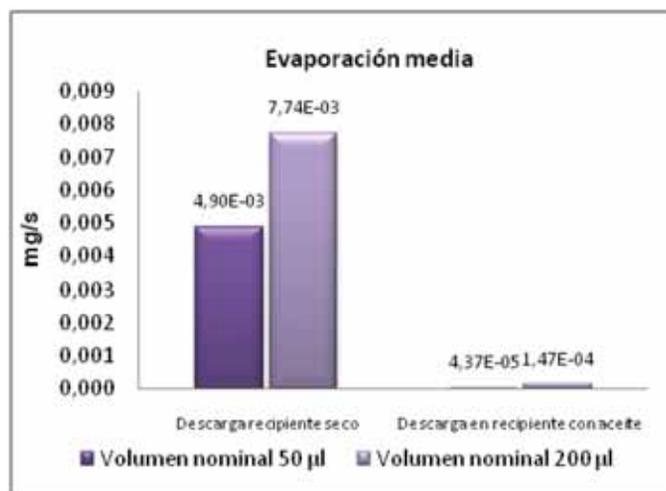


Gráfico 1. Promedios de las pendientes de las regresiones lineales de cada método.

En los Gráficos 2 y 3 se observan los resultados de la calibración por ambas variantes (recipiente seco y con aceite). Estos resultados son comparables dentro de las incertidumbres estimadas.

Se concluye que si se corrige el efecto de evaporación con el modelo matemático propuesto, las dos variaciones conducen a resultados equivalentes, implicando evaporaciones muy diferentes. Esto puede considerarse una validación de la exactitud del método de descarga en recipiente seco con extrapolación a tiempo cero, haciendo posible la utilización de estos resultados como valores de referencia en la evaluación de la exactitud del método de descarga en aceite.

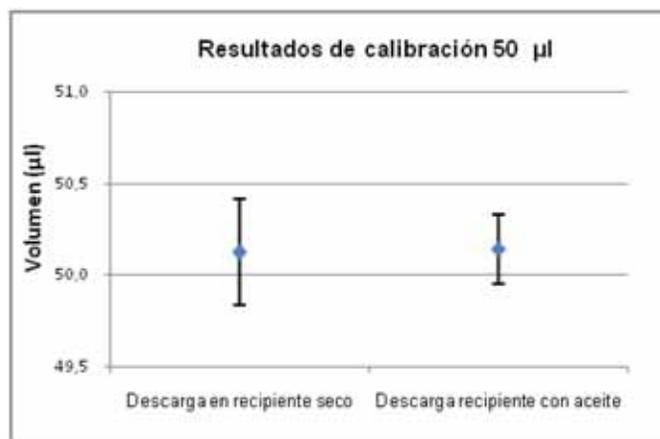


Gráfico 2. Volumen de calibración con su incertidumbre para la pipeta en 50 µl.

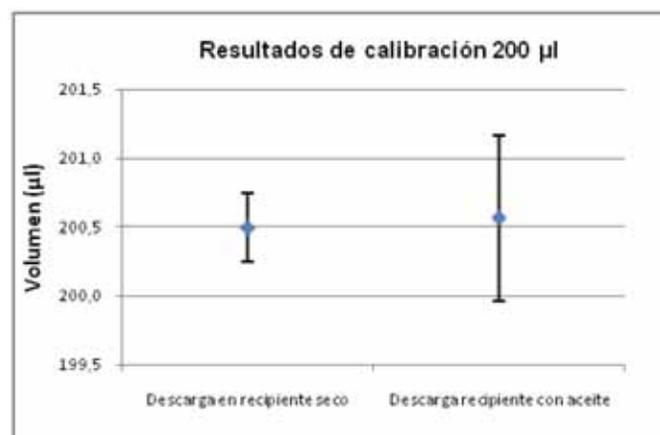


Gráfico 3. Volumen de calibración con su incertidumbre para la pipeta en 200 µl.

### Resultados del procedimiento de calibración simplificado (no compensa el efecto de evaporación)

Para la cuantificación del volumen de evaporación se tomaron las lecturas a un minuto con las dos variantes propuestas. Esto es debido a que en los ensayos del método de descarga en aceite la lectura de la balanza a 30 segundos no alcanza la estabilidad.

Se observa que el método de descarga en aceite disminuye el volumen de agua evaporado, reduciendo el error sistemático debido al efecto de la evaporación en el proceso de calibración. En el Gráfico 4 se observa el volumen evaporado a un minuto de la descarga en ambos métodos.



Gráfico 4. Promedios de las pendientes de las regresiones lineales de cada método.

En los Gráficos 5 y 6 se comparan los resultados de calibración obtenidos en todos los procedimientos, tomando como referencia el correspondiente a la descarga en recipiente seco y compensando la pérdida por evaporación.

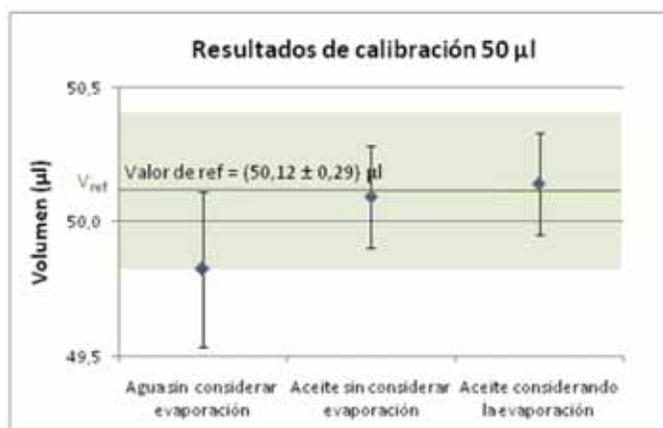


Gráfico 5. Resultados de calibración para volumen nominal de 50 µl.

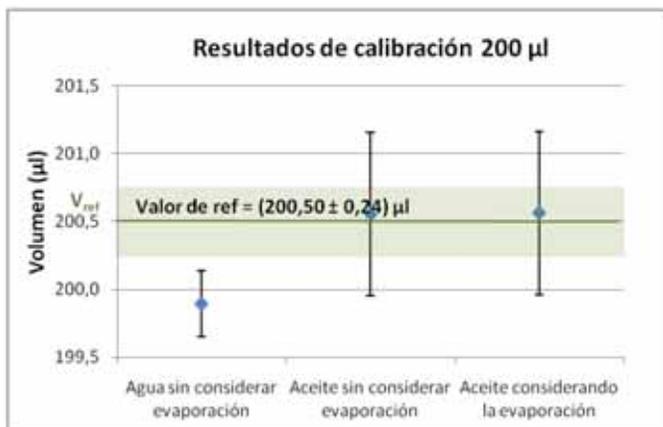


Gráfico 6. Resultados de calibración para volumen nominal de 200 µl.

En los Gráficos 5 y 6 puede observarse que los valores que se obtienen realizando la calibración descargando en el recipiente seco sin compensar la pérdida por evaporación, tienen un sesgo significativo, mientras que los resultados descargando en aceite son comparables al valor de referencia en ambos casos para los dos volúmenes ensayados. Esto se comprueba numéricamente en la Tabla 3, donde se observan los errores normalizados de los ensayos graficados anteriormente. Los valores cercanos y aun superiores a 1 de los resultados al realizar la descarga en agua sin compensar la pérdida de masa por evaporación

manifiestan la importancia de considerar este efecto. Por otra parte, al realizar la calibración descargando en aceite los errores normalizados son muy inferiores a 1.

Ensayo	50 µl	200 µl
Descarga en agua <sup>b</sup>	0,73	1,76
Descarga en aceite <sup>a</sup>	0,06	0,10
Descarga en aceite <sup>b</sup>	0,08	0,09

<sup>a</sup>Compensando la pérdida por evaporación (por extrapolación de la masa a tiempo cero)  
<sup>b</sup>Sin compensar la pérdida por evaporación (tomando como resultado el correspondiente a la lectura a 1 minuto de la descarga)

Tabla 3. Resultados de errores normalizados para ambos volúmenes nominales.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que considerar la evaporación (método de calibración simplificado) permite evitar errores sistemáticos significativos.

La extrapolación a tiempo cero es una forma efectiva de obtener resultados de calibración confiables, ya que estima el valor de masa en el momento de la descarga.

El método de descarga en aceite como forma alternativa de eliminar el efecto de evaporación ofrece ventajas operativas a la calibración, dado que permite realizar el procedimiento sin tomar medidas a lo largo del tiempo, con resultados comparables.

## Reconocimientos

Se agradece a las siguientes personas por sus aportes para la realización de este trabajo:

Al Quím. Farmac. Andrés Venturini, por proporcionarnos reactivos necesarios para este trabajo.

A la Dra. Mary Lopretti, por proporcionarnos la micro pipeta utilizada en este trabajo.

A la Ing. Quím. Joselaine Cáceres, por ceder el uso de las instalaciones del laboratorio de masa para realizar las medidas.

## Referencias

- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 4787: *Laboratory glassware, volumetric glassware. Methods for use and testing of capacity*. Ginebra: ISO, 1984.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 8655-2: *Piston operated volumetric apparatus. Part 2: Piston pipettes*. Ginebra: ISO, 2002.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO/IEC 98-3: *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*. Ginebra: ISO, 2008.

# Intercomparación bilateral entre LATU y PTB de calibración en puntos fijos (ITS-90) del Zn al Hg de un SPRT con PTB como laboratorio piloto\*

Robatto, O. <sup>(1)</sup>, Noatsch, U. <sup>(2)</sup>, Rudtsch, S. <sup>(2)</sup>

Contacto: orobatto@latu.org.uy

<sup>(1)</sup>Departamento de Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(2)</sup>Physikalisch - Technische Bundesanstalt (PTB). Berlín, Alemania.

Recibido: 10/7/2009 - Aprobado: 4/12/2009

\*Trabajo presentado en el simposio Temperatur 2009, (Berlín 24-25 de junio de 2009). Berlín: PTB, 2009

## Resumen

El Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, es el Instituto Metrológico Nacional del Uruguay, miembro firmante del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo (MRA) entre Laboratorios Nacionales de Metrología del Comité Internacional de Pesas y Medidas (CIPM). Las capacidades de medida y calibración (CMCs) del LATU fueron reconocidas en junio de 2004 y se encuentran publicadas en la BIPM- Key Comparison Data Base (BIPM, 2009). El LATU estuvo acreditado desde 2001 hasta junio de 2007 por el Deutscher Kalibrier Dienst (Servicio de Acreditación Alemán) en las magnitudes Masa, Balanzas y Temperatura (Laboratorio DKD, DKD-K-25601). Se decidió a partir de ese momento probar el cumplimiento con los criterios establecidos por el CIPM MRA y los requisitos de la Norma ISO/IEC 17025 en el marco de una auditoría in situ llevada a cabo en el LATU en enero de 2008. Como parte de ese proceso de revisión de pares, se realizó una Intercomparación Bilateral entre el PTB y el LATU en los puntos fijos de la Escala Internacional de Temperatura (ITS-90), desde el punto triple de Hg hasta el punto de congelación del Zn, con el PTB como laboratorio piloto. En este artículo los resultados son presentados y discutidos de manera de sostener la declaración de mejores capacidades de medida y calibración (CMCs) en sustitución de las ya declaradas.

**Palabras clave:** Puntos fijos, Escala Internacional de Temperatura 1990 (EIT-90), capacidades de medida y calibración (CMCs), Incertidumbres, Error Normalizado En.

## Abstract

Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, is the National Metrology Institute of Uruguay, signatory of the CIPM Mutual Recognition Arrangement (CIPM MRA), has Calibration and Measurement Capabilities (CMCs) in temperature that were first published in the BIPM Key Comparison Data Base (BIPM, 2009) in June 2004. LATU was a DKD Laboratory accredited in Mass, Balances and Temperature from 2001 until June 2007 when it was decided to adopt the CIPM criteria for proving compliance with ISO/IEC 17025 through a Peer Review process. The LATU on site Peer Review was carried out in January 2008, as part of the process. During the evaluation, a bilateral intercomparison was performed between PTB and LATU at the ITS-90 fixed points covering the range from Hg TP to Zn FP with PTB acting as the Pilot Laboratory. In this paper the results are presented and discussed in order to support the declaration of better Calibration and Measurement Capabilities (CMCs) and substitute the declared ones.

**Keywords:** Fixed Points, International Temperature Scale of 1990 (ITS-90), Calibration and Measurement Capabilities (CMCs), Uncertainties, Normalized Error En.

## Introducción

En el marco del Acuerdo de Reconocimiento Mutuo entre Pares del Comité Internacional de Pesas y Medidas (CIPM, firmado por Laboratorios Nacionales de Metrología), se realizan comparaciones interlaboratorio como una herramienta efectiva para demostrar la equivalencia de las capacidades de medida y calibración entre los distintos Institutos Metrológicos Nacionales (NMIs).

Estas comparaciones se organizan usualmente como intercomparaciones multilaterales clave, tanto por el CIPM o por las Organizaciones Metrológicas Regionales (RMOs).

Este artículo describe una intercomparación entre el LATU (miembro del Sistema Interamericano de Metrología, SIM) y PTB (miembro de EURAMET) en el rango desde  $-38.8344$  °C hasta  $419.527$  °C, utilizando un termómetro de resistencia de platino (SPRT) como portador de la escala y con PTB actuando como laboratorio piloto.

El SPRT fue calibrado empleando la siguiente secuencia: PTB-LATU-PTB. El objetivo principal de esta comparación fue demostrar la capacidad del LATU para calibrar SPRTs, en el rango de temperatura citado, mediante el empleo de sus propias celdas de puntos fijos y así poder declarar sus Capacidades de Medida y Calibración (CMCs) en la Base de Datos de Comparaciones Clave (KCDB), Apéndice C del CIPM MRA.

## Materiales y Métodos

### Equipos empleados

**SPRT.** Se empleó en esta intercomparación un termómetro de resistencia de platino estándar de vaina larga (SPRT), de valor nominal de resistencia  $25 \Omega$  (Rosemount modelo 162CE, número de serie: 4895, vaina de protección de acero inoxidable). Se compararon

mediante este instrumento las realizaciones de la Escala Internacional de Temperatura 1990 (ITS-90) de Alemania y Uruguay. El rango comparado fue desde -38.8344 °C hasta 419.527 °C, esto incluyó los puntos fijos del Hg, H<sub>2</sub>O, Ga, Sn y Zn.

**Puentes de medida de resistencia.** Ambos laboratorios utilizaron un puente para mediciones de relación de resistencia AC / DC marca ASL modelo F18 con dos resistencias estándar AC / DC marca Tinsley de valores nominales de resistencia de 25 ohm y 100 ohm, respectivamente.

**Celdas y hornos.** El valor nominal de la pureza de materiales en las celdas de puntos fijos del LATU y el PTB se especificó como igual o mejor que 99,9999 % (6N o seis nueves). Las Tablas 1 y 2 muestran las características de las celdas de puntos fijos y hornos empleados por LATU y PTB, respectivamente.

Punto fijo	Fabricante	Patrones del LATU	Material	Horno/Baño
Zn	Isotech	Celda cerrada	Johnson Matthey	Horno de una zona YSI
Sn	Isotech	Celda cerrada	Johnson Matthey	Horno de una zona ISOTECH
Ga	Isotech	Celda cerrada	Johnson Matthey	Calibrador ISOTECH
TPW	CENAM	Vidrio borosilicato		Baño Dewar con hielo picado
Hg	Isotech	Triple point		ISOTECH

Tabla 1. Detalles de los puntos fijos empleados por LATU para la realización de la comparación.

Punto fijo	Fabricante	Celda Referencia del PTB(*)	Material	Horno/Baño
Zn	PTB	Celda abierta N° XXV	Preussag Pure Metals GmbH	Horno de tres zonas ISOTECH Modelo ITL 17703
Sn	PTB	Celda abierta N° X	Koch Chemicals Ltd.	Horno de tres zonas ISOTECH Modelo 17701
Ga	Isotech	Celda cerrada N° 213	Johnson Matthey	Calibrador ISOTECH
TPW	Hart Scientific	Vidrio cuarzo N° 1043	V-Efecto smow +10 µK (**)	Baño de punto triple de agua ISOTECH
Hg	Isotech	Punto triple N° M 006		Aparato de punto triple de mercurio YSI d

Tabla 2. Detalles de los puntos fijos empleados por PTB para la realización de la comparación.

(\*) Trazables a los patrones nacionales.

(\*\*) Efecto por la composición isotópica del agua media oceánica SMOW=Standard Mean Ocean Water.

La comparación comenzó en el PTB con la realización de la calibración del SPRT desde el 11 de enero hasta el 18 de enero de 2008, continuó en el LATU desde el 28 de enero hasta el 2 de febrero y fue finalizada en el PTB el 13 de febrero de 2008.

## Protocolo

La comparación se ha llevado a cabo mediante el cumplimiento de los requisitos de este protocolo:

1) Medición de la resistencia del SPRT en el punto triple de agua (TPW) con un puente de medida de resistencias luego de haber recibido el termómetro.

2) Mediciones de la resistencia del SPRT en el punto de congelamiento del (Zn FP), punto de congelamiento del estaño (Sn FP), punto de fusión del galio (Ga MP), punto triple de mercurio (Hg TP) con un puente de medida de resistencias en el orden citado.

3) Medición de la resistencia del SPRT en el punto triple de agua (TPW) con un puente de medida de resistencias luego de cada punto fijo realizado.

## Modelo matemático

Para realizar la comparación de resultados se emplea la siguiente ecuación:

$$W_T = R_T / R_{TPW}$$

Para cada punto fijo implicado, LATU llevó a cabo una realización y PTB hizo al menos dos realizaciones de cada uno. La resistencia de los SPRT se midió en dos corrientes de medición (1 mA y 1,414 mA) para poder determinar el valor de potencia cero. La resistencia de los SPRT se corrigió por el efecto de presión hidrostática para cada punto fijo.

## Resultados

Las comparaciones de los resultados para las mediciones PTB-LATU-PTB obtenidas se muestran en la Tabla 3.

Punto fijo	W <sub>T90</sub> (PTB) 0 mA	W <sub>T90</sub> (LATU) 0 mA	W <sub>T90</sub> (PTB) 0 mA	T <sub>PTB</sub> -T <sub>LATU</sub> /mK
Fechas	Ene 11 a Ene 18 2008	Ene 28 a Feb 2 2008	Feb 7 a Feb 18 2008	
Hg	0,84418626	0,84419396	0,84418634	-1,9 mK
Ga	1,11810344	1,11810407	1,11810367	-0,1 mK
Sn	1,89252229	1,89252512	1,89252197	-0,8 mK
Zn	2,56842888	2,56842346	2,56842799	1,4 mK

Tabla 3. Diferencias entre las mediciones obtenidas en PTB y en el LATU expresadas en mK; la diferencia está referida al promedio de las mediciones realizadas en PTB menos las mediciones realizadas en LATU.

Los resultados de la Tabla 3 se expresan en el Gráfico 1.

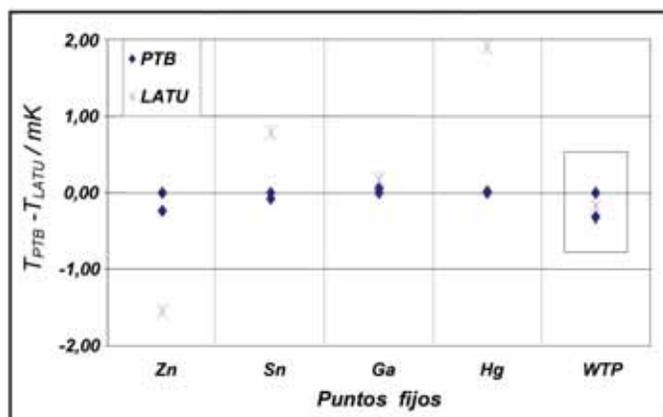


Gráfico 1. Resultados de la comparación PTB-LATU-PTB.

### Expresión de la incertidumbre

Los valores de la incertidumbre correspondientes al LATU se expresan en la Tabla 4. Se informan por separado las contribuciones tipo A y tipo B para cada punto fijo, de forma de brindar una mejor aproximación con respecto a los parámetros considerados en la estimación de los valores de incertidumbre.

Punto fijo	Hg	H <sub>2</sub> O	Ga	Sn	Zn
Pureza	6N		6N	6N	6N
Longitud de inmersión / cm	17,9	26,7	25,7	18,3	18,4
Contribución Incertidumbre Tipo B					
Impurezas Isotópicas	0,25	0,10	0,20	0,52	0,71
Corrección por presión hidrostática	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02
Presión de gas	0,01	0,15	0,01	0,70	0,70
Resistores Standard	0,50	0,50	0,50	1,40	1,40
Puente de medida de resistencias	0,05	0,05	0,02	0,012	0,012
Propagación del WTP	0,17	0,00	0,22	0,38	0,51
Autocalentamiento	0,05	0,04	0,05	0,20	0,20
Error por flujo de calor	0,02	0,01	0,01	1,0	1,0
Comportamiento de la curva	0,20	0,15	0,10	0,40	0,35
Total Tipo B	0,62	0,56	0,59	1,76	2,41
Contribución Tipo A al Presupuesto de la Incertidumbre					
Incertidumbre Total Tipo A (k = 1)	0,16	0,18	0,19	0,80	0,19
Incertidumbre Total Expandida (k = 2)	1,99	1,17	1,25	3,87	4,84

Tabla 4. Expresión de los valores de incertidumbre correspondientes al LATU.

En la Tabla 5 se muestran las capacidades de medida y calibración (CMCs) a ser declaradas por el LATU.

Punto fijo	U <sub>LATU</sub> (k=2) aceptadas por el DKD en 2006
Hg	5,0 mK
TPW	1,5 mK
Ga	1,5 mK
Sn	5,0 mK
Zn	5,0 mK

Tabla 5. Capacidades de medida y calibración a declarar (CMCs).

Estas son las capacidades que fueron aceptadas por el Deutscher Kalibrierdienst durante la última auditoría de acreditación efectuada en marzo de 2006. El auditor responsable de la auditoría de Peer Review (revisión de pares) estuvo de acuerdo en mantener estos valores de capacidades y recomendó estudiar la caracterización de todas las celdas de puntos fijos empleadas, para poder disminuir estos valores de capacidades de medida y calibración en el futuro. Las capacidades de medida y calibración del PTB se exponen en la Tabla 6.

Punto fijo	U <sub>PTB</sub> (k=2)
Hg	0,26 mK
Ga	0,25 mK
Sn	0,85 mK
Zn	1,30 mK

Tabla 6. Capacidades de medida y calibración declaradas ante el CIPM del PTB (CMCs).

### Error normalizado |En|

Luego de haber determinado las diferencias y sus incertidumbres asociadas, se pueden emplear herramientas muy útiles de análisis de datos.

Entre estas últimas se encuentra el error normalizado |En|, que se define mediante la siguiente ecuación:

$$|En| = |(T_{LATU} - T_{PTB}) / \sqrt{(U_{LATU}^2 - U_{PTB}^2)}|$$

Se espera que los valores de |En| sean menores o iguales a 1 para poder establecer que las diferencias de temperatura entre los dos laboratorios sean consistentes con las incertidumbres declaradas.

La Tabla 7 presenta los valores de |En| obtenidos. Todos los valores cumplen con la condición |En| < 1. Esto implica que las capacidades de medida y calibración que se pretenden declarar son sostenibles.

Punto fijo	En
Zn	0,27
Sn	0,16
Ga	0,07
Hg	0,38
TPW	0,14

Tabla 7. Error normalizado |En|

### Conclusiones

Los resultados obtenidos apoyan las capacidades de medida y calibración (CMCs) a ser remitidas para su revisión y posterior publicación en la base de datos de comparaciones clave del CIPM (MRA).

Sin embargo, y de acuerdo con el equipo auditor de la Peer Review, LATU debe caracterizar sus celdas para poder determinar si sus comportamientos se acercan a los ideales con respecto a la presión hidrostática y a la transferencia de calor al medio ambiente.

Se han dado pasos en esa dirección al estudiar en detalle las celdas de punto triple de agua (TPW), obteniendo resultados satisfactorios luego de haber mejorado la aislación del ambiente y empleando equalizadores de cobre en el pozo de la celda.

Por otra parte, el LATU adquirió una Unidad de Calibración de puentes de medida de resistencia desarrollada en el MSL (Measurement Standard Laboratories, de Nueva Zelanda) para mejorar la trazabilidad de sus medidas eléctricas.

### Referencias

- BUREAU INTERNATIONAL DES POIDS ET MESURES. *Key comparison data base* [En línea]. Cèdex: BIPM, [s.d.]. [Consulta: 28 de setiembre de 2009]. Disponible en: <http://kcdb.bipm.org/AppendixC/default.asp>.
- PRESTON-THOMAS, H. The International temperature scale of 1990 (ITS-90). En: *Metrologia*. 1990, (27):3-10.
- WOGER, W. Remarks on the en-criterion used in measurement comparisons. En: *PTB-Mitteilungen*. 1999, (109):24-27.

# Comparación de los cambios químicos y microbiológicos en la maduración del queso Colonia salado tradicionalmente y por impregnación en vacío

Crosa, M. J. <sup>(1)</sup>, Harispe, R. <sup>(2)</sup>, Mussio, P. <sup>(1)</sup>, Pelaggio, R. <sup>(1)</sup>, Repiso, L. <sup>(1)</sup>, Silvera, C. <sup>(3)</sup>

Contacto: mcrosa@latu.org.uy

<sup>(1)</sup> Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(2)</sup> Naturalia S.R.L - <sup>(3)</sup> Universidad Católica del Uruguay Dámaso Antonio Larrañaga (UCU).

Recibido: 3/07/2009 - Aprobado: 2/12/2009

## Resumen

El queso Colonia es un queso típico uruguayo, elaborado según los criterios de calidad y tradición quesera de inmigrantes suizos radicados en el departamento de Colonia. Su investigación y publicación aportan conocimiento para la difusión de un proceso que aún no presenta denominación de origen protegida. El objetivo del estudio fue investigar si la tecnología de salado por impregnación en vacío afecta el proceso de maduración del queso Colonia en comparación con el proceso de salado tradicional. Para el seguimiento de los cambios se realizaron determinaciones del índice de maduración, concentración del cloruro de sodio en agua del queso, el pH y la evolución de las bacterias *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* subsp. *mesenteroides* y *Propionibacterium*. Al finalizar la maduración, se evaluaron sensorialmente los atributos de textura, sabor y aroma, apariencia externa y apariencia interna. Las condiciones operativas elegidas del salado por impregnación en vacío lograron el mismo ingreso de sal que las del proceso tradicional y en la mitad del tiempo. No se observaron diferencias en ninguno de los parámetros químicos y microbiológicos estudiados. En lo sensorial tampoco se apreciaron diferencias en el flavor, textura y apariencia externa. Se hallaron ciertas diferencias en el tamaño y distribución de los ojos.

Palabras clave: Tiempo de salado, bacterias lácticas, bacterias propiónicas, queso uruguayo.

## Abstract

“Colonia” type cheese is a typical Uruguayan cheese, elaborated following the quality standards and cheese making tradition brought by Swiss immigrants settled down at the Uruguayan department of Colonia. Its study and outreach provide knowledge to the diffusion of a process which does not present a protected designation of origin. The aim of the study was to analyze if the vacuum impregnation technology affects Colonia cheese ripening process compared with the traditional salting methods. Chemical, microbiological and sensory changes during ripening after both, SIV and traditional salting methods, were analyzed in this study. Chemical changes refer to moisture, sodium chloride concentration and rate of ripening. The microbiological changes were focused onto bacteria growing and identification of *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* subsp. *mesenteroides* and *Propionic* bacteria. Sensory attributes linked to texture, taste and flavor, as much as external and internal appearances were evaluated. The selected operating conditions of the vacuum impregnation process allowed the income ingress of salt to the cheese in half traditional process time. Under these conditions, no differences in chemical and microbiological parameters studied were appreciated. There were no sensory differences in flavor, texture and the outward appearance but certain differences in the size and distribution of the eyes were found.

Keywords: Time of salting, lactic acid bacteria, Propionic bacteria, Uruguayan cheese.

## Introducción

El queso Colonia es un queso típico uruguayo, elaborado según los criterios de calidad y tradición quesera de los inmigrantes suizos radicados en la cuenca lechera del departamento de Colonia. El proceso tradicional de salado del queso Colonia de 7 kg ocurre por inmersión en salmuera concentrada (20°Bé, 5,2 de pH, 10-12 °C de temperatura) durante 48 horas. En estas condiciones, el ingreso de sal ocurre por difusión, con el tiempo de inmersión como única variable de control del proceso.

La tecnología de salado por impregnación en vacío fue ampliamente estudiada por Fito y colaboradores desde el año 1994 (Fito, 1994; Fito et al., 1993; Guamis, 1997; Pavia, 1999). En este mecanismo, la penetración de la sal en el queso se debe no sólo al proceso de acción capilar, sino también al gradiente de presión impuesto al sistema.

La aplicación de esta tecnología permite disminuir el tiempo de salado y controlar el ingreso de sal en el queso, mediante el monitoreo de los ciclos de presión de vacío versus tiempo y tiempo a presión

atmosférica. Por otro lado, este proceso de salado podría afectar la microestructura del queso, la evolución de los fermentos microbianos y, en consecuencia, la proteólisis (Pavia et al., 1999).

Pavia et al. (2000) estudiaron la proteólisis del queso tipo Manchego salado por impregnación en vacío. El proceso de salado afectó únicamente el grado de proteólisis en la cáscara del queso en comparación con el salado tradicionalmente.

La maduración del queso es un proceso mediante el cual la cuajada recién elaborada, de pobres características reológicas y sensoriales, se transforma en una masa homogénea con sabor, aroma y textura característicos. Ello se logra durante la maduración, por medio de cambios secuenciales y simultáneos causados por las proteinasas de la leche, las enzimas coagulantes y los cultivos iniciadores.

En este estudio se determinó el índice de maduración como indicador del grado de proteólisis, la difusión de cloruro de sodio en el queso, el valor del pH y la evolución de las bacterias *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc* subsp. *mesenteroides* y de las bacterias propiónicas. Al finalizar la maduración, se evalúan sensorialmente los atributos de textura, sabor

y aroma, apariencia externa y apariencia interna.

El objetivo del estudio fue investigar si la tecnología de salado por impregnación en vacío afecta el proceso de maduración del queso Colonia en comparación con el proceso de salado tradicional. No se reportan estudios publicados al respecto para el caso del queso Colonia; su estudio y publicación aportará datos relevantes para el desarrollo de esta tecnología en Uruguay.

## Materiales y Métodos

### Descripción del proceso de elaboración del queso

En la planta de elaboración de la empresa Naturalia S.R.L. se elaboró queso en tina de 1.100 litros de leche pasteurizada y estandarizada en su tenor graso en 2,7 %, utilizando fermento directo de bacterias lácticas y propiónicas y cuajo bovino líquido. La cuajada se cortó en granos medios de 6 a 7 mm de diámetro, se agitó durante 15 minutos a 32 °C y se coció a 48 °C durante 30 a 40 minutos. Posteriormente se pescó el cuajo y se pre-presó, logrando 15 moldes para quesos de 7 kg peso final. Las unidades se prensaron durante cuatro horas y se salaron en salmuera. Una vez finalizado el proceso de salado, se mantuvieron en cámara de oreo de 7 °C durante 12 horas y finalmente se pasaron a la cámara fría de maduración. Los quesos se mantuvieron 10 días en la cámara fría a 8 °C y 85 % de humedad relativa y los 10 días siguientes en la cámara caliente a 20 °C y 90 % de humedad relativa. Finalizado el proceso de maduración, los quesos presentan un 25.5 % de grasa en base húmeda, 4,15 % de nitrógeno total en base húmeda, 44 % de humedad en base húmeda y 0,55% de cloruro de sodio en base húmeda.

El proceso de salado tradicional (TRAD) consiste en la inmersión de los quesos en salmuera 20 Bé de densidad y 10-12 °C durante 48 horas. El salado por impregnación en vacío (SIV) consistió en la inmersión de los quesos en la salmuera durante 20 horas a presión atmosférica, seguido por dos horas de cambios de presión por pulsos de vacío hasta 100 mmHg y recuperación a la presión atmosférica durante una hora más. Esto suma un tiempo total del proceso de 24 horas.

### Diseño de la experiencia

La experiencia se realiza por duplicado. Cada experiencia corresponde a una tina de 1.100 litros de leche, logrando 15 unidades de 7 kg, de las cuales ocho fueron saladas por impregnación en vacío y las otras siete según proceso tradicional. El proceso de maduración fue el mismo en todas las unidades. Se registró diariamente la temperatura, introduciendo una sonda de temperatura hasta el centro geométrico de una pieza salada SIV y otra salada TRAD.

El estudio de la maduración se realizó tomando unidades enteras de queso de las cámaras de maduración en los días 3, 6, 10, 13 y 20 para su análisis. En la otra experiencia, los días de extracción fueron 2, 6, 10, 13, 21. En cuatro de los cinco muestreos se toma una muestra del queso salado SIV y del TRAD y en uno de los muestreos se toman dos muestras de cada queso.

### Descripción de procedimientos analíticos

El seguimiento de la temperatura del centro geométrico de los quesos fue diario. La sonda de pincho tipo K fue introducida y mantenida en el queso durante todo el proceso de maduración. El registro de la temperatura y humedad ambiente en las cámaras se realizó mediante un datalogger Testo, ubicado cerca de los quesos en estudio.

La medida de pH fue con pHmetro tipo de penetración Mettler Toledo inLab, siguiendo el protocolo de ensayo PEC.LACAM.LAC 006.

El nitrógeno total (%NT) fue obtenido por disolución del queso en citrato de sodio 9,5 molar, el nitrógeno soluble se obtuvo en la solución de pH 4,6 (%NS) y el no proteico (%NNP), por disolución en 12 % tricloroacético (TCA). La digestión se efectuó por método de Kjeldhal, según norma IDF 20B.

El porcentaje de cloruro de sodio fue determinado por titulación potenciométrica, según norma IDF 88. El porcentaje de humedad fue determinado siguiendo el método recomendado por norma IDF 4A.

Las determinaciones del % NaCl, del % Humedad y del pH se realizaron en las zonas “centro”, “medio” y “cáscara”. La “cáscara” corresponde al primer centímetro y medio de la superficie del queso. El “centro” es la zona a un radio menor a 10 centímetros de distancia de la superficie y a 3 cm de distancia de la cara superior e inferior del cilindro, respectivamente. El “medio” es el resto del queso.

Se estimó la flora total del queso mediante recuento en PCA (Plate Count Agar - Difco), a 30 °C por 48 horas. El recuento de los *Lactococcus* fue por medio sólido M17 Agar (Difco) suplementado con un 10 % de Lactosa, el cual se incubó a 30 °C por 48 horas. Este mismo medio se utilizó para el *Streptococcus thermophilus*, pero incubando a 42 °C. La evolución de los *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* se obtuvo por el medio diferencial Reddy's Differential Agar (Modified - HiMedia). Luego de cuatro días a 30 °C se pueden diferenciar las colonias de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* por el consumo del citrato que crea un halo claro en el medio de cultivo. El recuento de *Leuconostoc mesenteroides* fue en MRS (de man, Rogosa, Sharpe – Oxoid) adicionado con vancomicina en una concentración de 30µg/ml que se incubó a 25 °C por 48 horas. El recuento de las bacterias propiónicas fue mediante el medio selectivo ALGA – PAL Propiobac (anaerobiosis, 30 °C por seis días).

La evaluación sensorial se realizó con un panel integrado por siete expertos, en los atributos apariencia externa, apariencia interna, textura y flavor, según norma IDF 99C.

### Descripción del tratamiento estadístico de los datos

Los ensayos químicos se realizaron por duplicado hasta lograr concordancia según el error analítico correspondiente a cada técnica. En un muestreo se contaron dos unidades del queso SIV y dos del queso TRAD; en esta instancia se determinó el intervalo de confianza al 95 % de cada ensayo de cada experimento para un número de muestras igual a cuatro. Para los ensayos microbiológicos los recuentos fueron realizados por duplicado con una incertidumbre del laboratorio para recuento en PCA: 0,15 unidades logarítmicas.

## Resultados y Discusión

### Registro de la historia térmica de las muestras

En el Gráfico 1 se presentan la temperatura ambiente y la temperatura del centro geométrico del queso impregnado y del salado tradicionalmente tomadas cada 24 horas. Al finalizar el proceso de salado, la temperatura de los quesos fue de 13 °C y bajó a 8 °C (temperatura de cámara) luego de 24 horas de estadía. Cuando se cambian a cámara caliente, los quesos logran 18 °C luego de 60 horas de estadía, pero recién después de 120 horas se logra una temperatura en el centro del queso de 20 °C.

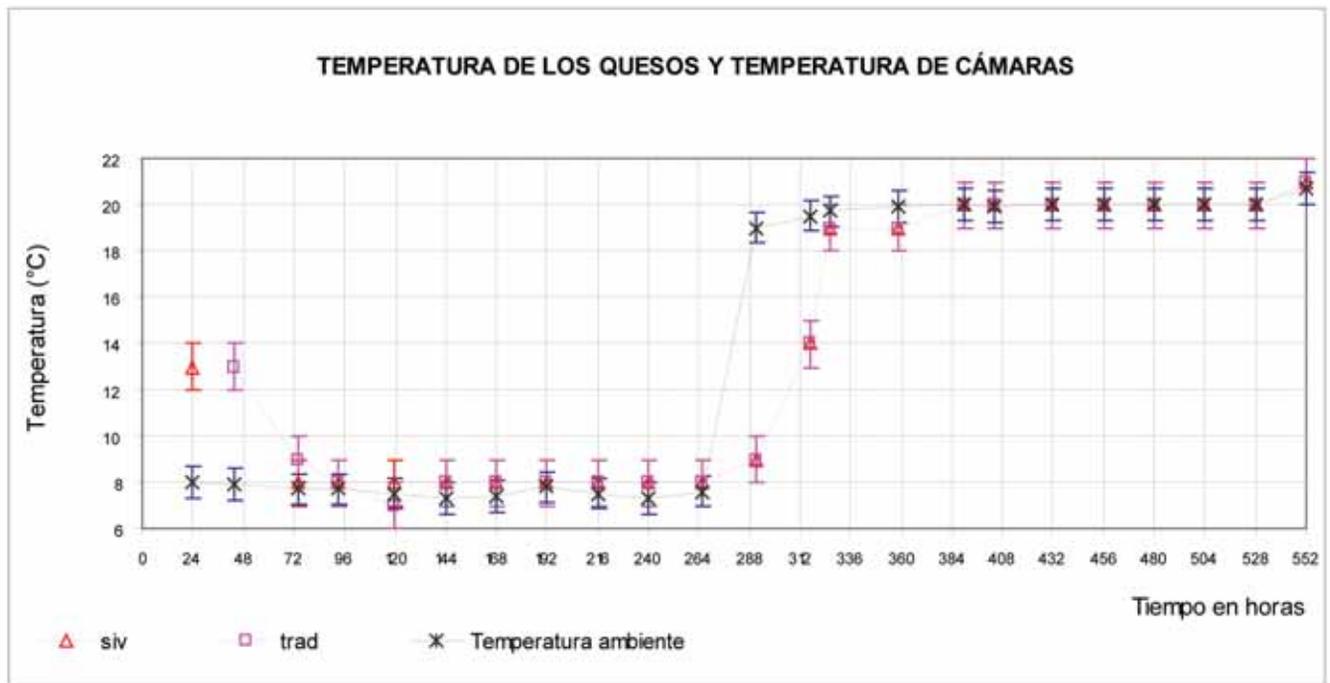


Gráfico 1. Seguimiento de temperatura de los quesos SIV y TRAD.

## Medida del pH

En la Tabla 1 se presentan los valores de pH del centro, medio y cáscara de los quesos salados por TRAD y SIV.

DIA	PH					
	SIV			ATM		
	CENTRO	MEDIO	CASCARA	CENTRO	MEDIO	CASCARA
3	5,38	5,40	5,49	5,33	5,34	5,48
6	5,38	5,44	5,52	5,38	5,39	5,50
10	5,38	5,42	5,48	5,40	5,39	5,48
13	5,34	5,39	5,53	5,34	5,41	5,58
13	5,36	5,39	5,55	5,34	5,35	5,53
21	5,34	5,37	5,53	5,34	5,37	5,48
PROMEDIO	<b>5,36</b>	<b>5,40</b>	<b>5,52</b>	<b>5,36</b>	<b>5,38</b>	<b>5,51</b>
IC 95%	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,06

Tabla 1. Los datos informados corresponden al valor promedio de ambas experiencias. Se promedian los valores de pH en los diferentes días de maduración y se determina el intervalo de confianza con un 95 % de significancia.

Los quesos SIV y TRAD no presentaron diferencias significativas (al 95 %) en los valores de pH. Tampoco se observa evolución alguna del pH en las tres zonas estudiadas durante la maduración. Pero se observan, en concordancia con otros estudios (Pavia, 2000), diferencias de la cáscara con el medio y centro del queso que están relacionadas con la diferencia de la concentración del cloruro de sodio en agua entre las zonas del queso.

## Proteólisis

En el Gráfico 2 se expone la extensión de la proteólisis de los quesos TRAD y los SIV de las experiencias. Los quesos SIV no presentaron diferencias significativas al 95 % con los TRAD en ninguno de los días de maduración analizados.

Existieron diferencias en la evolución de la proteólisis entre las experiencias. Los valores iniciales del %NS/NT y de NNP/NT del batch 2 fueron mayores. Considerando que el porcentaje de nitrógeno total fue concordante en ambas experiencias, de  $4,00 \pm 0,04\%$ , se puede adjudicar esta diferencia al poder proteolítico del cuajo agregado en tina. Sin embargo, se logra el mismo grado de avance de la proteólisis al final del proceso.

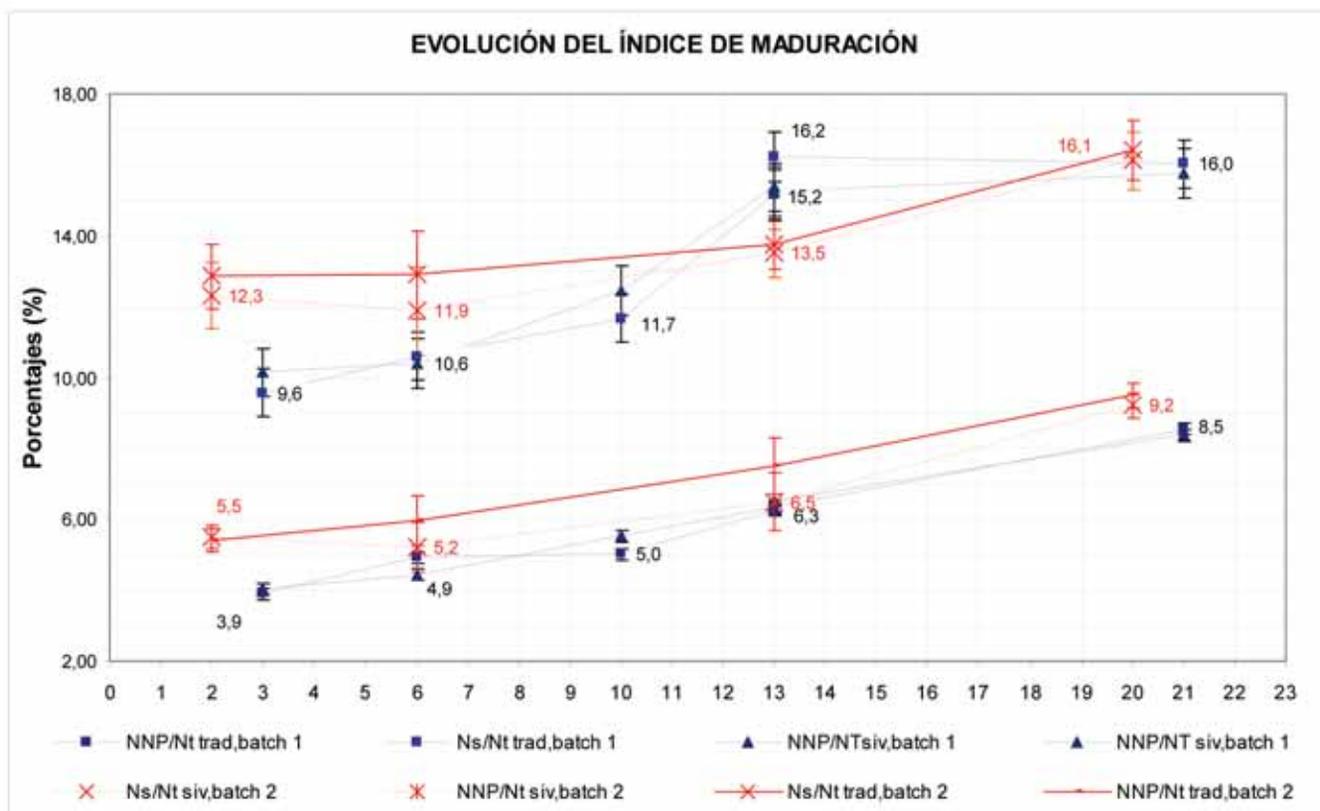


Gráfico 2. Evolución del % nitrógeno soluble y en % nitrógeno no proteico de los quesos salados tradicionalmente y de los quesos salados por impregnación en vacío, ensayo de ambas experiencias. El valor informado surge del promedio de los valores obtenidos de cada experiencia, aceptando concordancia cuando la diferencia absoluta es menor a 0.08.

### Perfil de concentración de NaCl/agua

En el Gráfico 3 se expresa la evolución de la concentración de cloruro de sodio en el agua contenida en la masa del queso salado tradicionalmente y por impregnación en vacío, de la cáscara, medio y centro del queso durante su maduración.

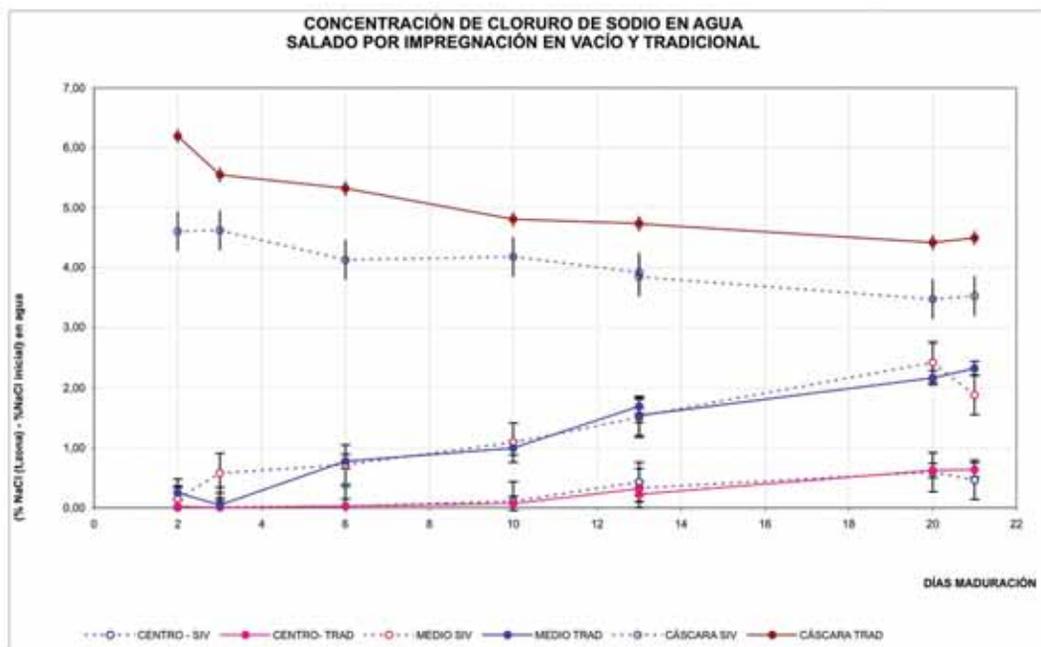


Gráfico 3. Evolución del cloruro de sodio en la cáscara, medio y centro en los diferentes días de maduración. Los valores informados en los días 6, 10 y 13 corresponden al promedio de ambos batch.

La concentración de sal en el centro y medio del queso no presentó diferencias significativas al 95 % entre los salados por impregnados en vacío y los salados tradicionalmente. Pero en la cáscara el % NaCl/agua de los quesos SIV fueron significativamente menores a los TRAD. Esto ocurre porque los pulsos de vacío aplicados afectan el ingreso de la sal en el centro y medio del queso, pero la concentración en la cáscara continúa dependiendo fuertemente del tiempo de salado (Crosa et al., 2008).

### Resultados microbiológicos

En el Gráfico 4 se muestran los recuentos de *Streptococcus thermophilus* en el queso salado tradicionalmente y en el queso con impregnación en vacío a lo largo del proceso de maduración. El número de *Streptococcus thermophilus* no presenta diferencias significativas entre ambos quesos (SIV y TRAD).

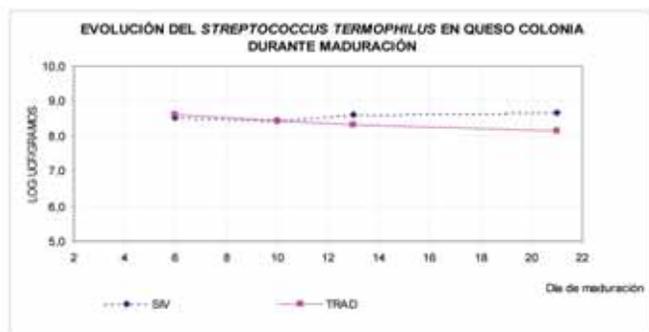


Gráfico 4. Recuento de *Streptococcus thermophilus*. Recuentos realizados por duplicado; incertidumbre del laboratorio para recuento en PCA: 0,15 unidades logarítmicas.

En el recuento de *Lactococcus* y *Lactococcus diacetyl lactis* no se observaron diferencias en los quesos con distintas tecnologías de salado, presentando ambos un mismo perfil de crecimiento a lo largo del proceso de maduración (Gráfico 5).

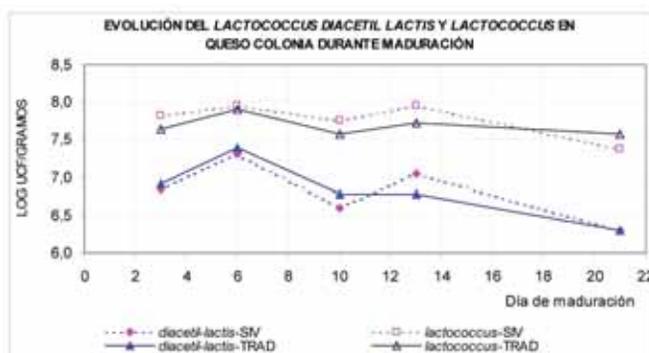


Gráfico 5. Recuento de *Lactococcus* y *Lactococcus diacetyl lactis*. Recuentos realizados por duplicado; incertidumbre del laboratorio para recuento en PCA: 0,15 unidades logarítmicas.

Se observa una evolución ascendente, logrando un orden de diferencia, en el recuento de las bacterias *Leuconostoc mesenteroides* y de las bacterias propiónicas durante la maduración (Gráfico 6). Sin embargo, cabe destacar que no existieron diferencias significativas entre los quesos tradicionales e impregnados al vacío.

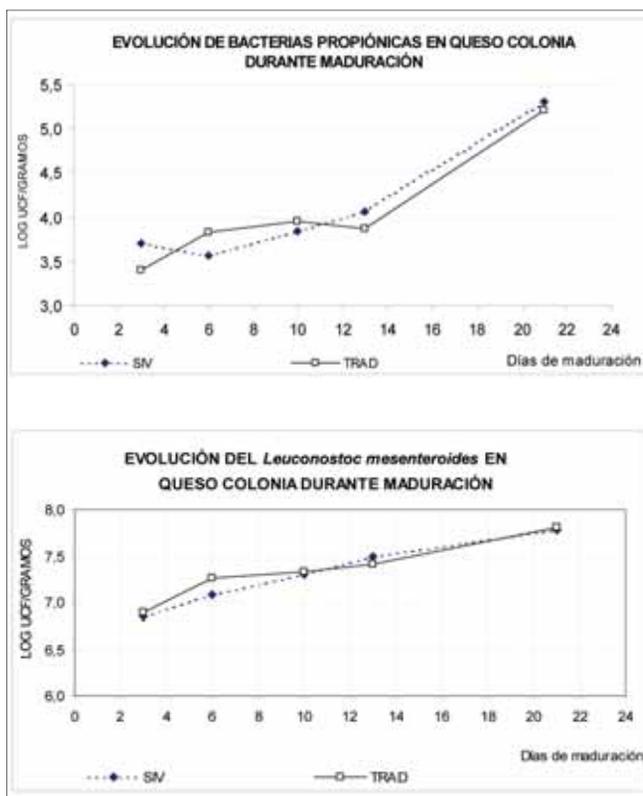


Gráfico 6. Recuento de *Leuconostoc mesenteroides* y bacterias propiónicas. Recuentos realizados por duplicado; incertidumbre del laboratorio para recuento en PCA: 0,15 unidades logarítmicas.

Al realizar el recuento de mesófilos totales en PCA a lo largo de la maduración se observaron valores del orden de  $10^8$  durante todo el proceso en ambos quesos. Estos valores constantes y del orden de los obtenidos para los recuentos de los distintos fermentos lácticos, evidencian la no existencia de una fuente de contaminación externa que podría de algún modo interferir con el estudio realizado al competir con la flora en estudio.

### Evaluación sensorial

En la Tabla 2 se presentan los puntajes asignados a cada atributo. Se detectaron diferencias en la apariencia interna pero no en los atributos de apariencia externa, textura y flavor, con un 95 % de significancia.

La escala de evaluación utilizada fue:

5. Concordancia con el requisito sensorial preestablecido.
4. Mínima desviación del requisito sensorial preestablecido.
3. Desviación perceptible del requisito sensorial preestablecido.
2. Desviación considerable del requisito sensorial preestablecido.
1. Desviación muy considerable del requisito sensorial preestablecido.

MUESTRAS	ATRIBUTO			
	Apariencia externa	Apariencia interna	Textura	Flavor
SIV	68	148	134	193
TRADICIONAL	62	122	126	180

Tabla 2. Resultados del panel de evaluación sensorial.

La evaluación sensorial manifiesta diferencia en la apariencia interna de los quesos según el proceso de salado. Los ojos de los quesos impregnados son de menor tamaño y en un número mayor

y se encuentran homogéneamente distribuidos en relación al queso tradicional. A continuación se presentan imágenes (Figuras 1 y 2) en las que se aprecian las diferencias detalladas.



Figura 1. Queso salado tradicionalmente.



Figura 2. Queso salado por impregnación en vacío.

## Conclusiones

No se apreciaron diferencias significativas en la extensión de la proteólisis, el pH y en la evolución de las bacterias del fermento estudiados en la maduración de los quesos salados tradicionalmente y por impregnación en vacío.

Se hallaron diferencias en la concentración del cloruro de sodio en la cáscara. La concentración del cloruro de sodio en agua de los quesos salados por impregnación en vacío fue menor a la de los quesos salados tradicionalmente, resultado coincidente con otros trabajos científicos (Pavia, 2000).

En lo sensorial no se observaron diferencias en el flavor, en textura, ni en la apariencia externa, aunque se apreciaron ciertas diferencias en el tamaño y distribución de los ojos.

## Reconocimientos

- Programa de Desarrollo Tecnológico. Ministerio de Educación y Cultura de Uruguay, por su financiamiento para el desarrollo de las experiencias.
- Téc. Lech. Pablo Wurth, Jefe de Planta de Elaboración, Naturalia S.R.L.
- Bach. Quím. M. Inés Dios, analista de laboratorio, por su apoyo analítico.
- Departamento de Microbiología, Departamento de Análisis químicos de productos Lácteos, Cárnicos y de la Colmena y Departamento de Biotecnología del LATU.

## Referencias

- CHIRALT, A.; FITO, P. Salting of Manchego type cheese by vacuum impregnation. En: FITO, P.; ORTEGA, E.; BARBOSA, G. *Food Engineering 2000*. New York: Chapman & Hall, 1997. pp.214-230.
- CROSA, M.J.; HARISPE, R.; REPISO, L.; SILVERA, C.; WURTZ, P. *Mejoras para el tiempo de salado de quesos en más de un 50 % del tiempo total*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31312. 2008-08-28.
- CROSA, M.J.; HARISPE, R.; REPISO, L.; SILVERA, C.; WURTZ, P. *Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos*. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620. 2009-01-30.
- ECK, A. *El Queso*. Barcelona: Omega, 1990.
- FUENTES, C. *Salado de quesos tipo Manchego: Aplicación de la impregnación a vacío y evolución de los compuesto volátiles durante la maduración*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia, 1999. (Tesis Doctoral).
- GAUNA, A. Elaboración de quesos de pasta semidura con ojos. En: *Cuaderno Lactológico*. 2005, (3):1-81.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; FUENTES, C.L.; CHIRALT, A.; ANDRÉS, A.; FITO, P. Effectiveness of vacuum impregnation brining of Manchego type curd. En: *International Dairy Journal*. 1999, (3):143-148.
- GUAMIS, B.; TRUJILLO, J.A.; FERRAGUT, V.; CHIRALT, A.; ANDRÉS, A.; FITO, P. Ripening control of Manchego type cheese salted by brine vacuum impregnation. En: *International Dairy Journal*. 1997, (7):185-192.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 4A: *Cheese and processed cheese: determination of the total solids content (Reference Method)*. Brussels: IDF, 1982.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 99C: *Sensory evaluation of dairy products by scoring: reference method*. Brussels: IDF, 1997.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 20B: *Milk: determination of nitrogen content*. Brussels: IDF, 2001.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). IDF 88: *Cheese and processed cheese products - Determination of chloride content: potentiometric titration method*. Brussels: IDF, 2004.
- PAVIA, M.; TRUJILLO, J.A.; GUAMIS, B.; CAPELLAS, M.; FERRAGUT, V. Changes in microstructural, textural and colour characteristics during ripening of Manchego type cheese salted by brine vacuum impregnation. En: *International Dairy Journal*. 1999, (9):91-98.
- PAVIA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Proteolysis in Manchego type cheese salted by brine vacuum impregnation. En: *Journal of Dairy Science*. 2000, 83(7):1441-1447.
- VÁZQUEZ, S.; LOPRETTI, M. *Estudio de cepa nativa y genéticamente modificada en microorganismos de la industria láctea*. Montevideo: Facultad de Ciencias, 2004. (Tesis de Grado).

# Composición química y calidad sensorial de jamones curados provenientes de cerdos alimentados con una dieta rica en ácido oleico y pasturas\*

Echenique, A. <sup>(1)</sup>, Repiso, L. <sup>(2)</sup>, Capra, G. <sup>(3)</sup>

Contacto: anaechenique@adinet.com.uy

<sup>(1)</sup> Granja La Familia - <sup>(2)</sup> Gerencia de Proyectos Alimentarios. Investigación, Desarrollo e Innovación. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA).

Recibido: 1/7/2009 - Aprobado: 5/10/2009

\*Fragmento de la ponencia presentada en el V Mundial del Jamón, (Huelva 6-8 de mayo de 2009). Huelva: Jamón de Huelva<sup>DOP</sup>, 2009.

## Resumen

La dieta animal es uno de los factores que más incide sobre la calidad de los productos porcinos. En este trabajo se evaluó el efecto de la utilización de semilla de girasol de alto oleico (SGAO) y pasturas sobre la calidad química y sensorial del jamón curado. Se analizaron jamones provenientes de 60 cerdos faenados a los 145 kg. Éstos fueron sometidos a cuatro tratamientos, consistentes en el suministro de dietas con diferente aporte lipídico en cantidad y composición química, con y sin acceso a pasturas: i) ración estándar, sin pasturas; ii) ración estándar, con pasturas; iii) ración con SGAO, sin pasturas, y iv) ración con SGAO, con pasturas. Se evaluaron parámetros físico-químicos y sensoriales de jamones obtenidos luego de un curado tradicional de nueve meses. La ración con SGAO dio lugar a jamones con una mayor proporción de C18:1( $\omega$ 9) y menor de ácidos grasos saturados en relación a la estándar. Las pasturas incidieron sobre el color y determinaron una mayor proporción de C18:3( $\omega$ 3) y C22:6( $\omega$ 3). Se concluye que con una dieta compuesta por SGAO y pasturas se obtienen jamones con mayor proporción de ácidos grasos oleico y  $\omega$ 3 y relaciones  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 más favorables para la salud humana, sin que se vean afectados atributos sensoriales.

Palabras clave: Porcinos, sistema de alimentación, ácidos grasos, calidad.

## Abstract

One of the most important factors that determine the quality of pork products is the pig's diet. This study was performed to evaluate the use of sunflower seed with high oleic acid (HOSS) and the use of pastures on the chemical and sensorial quality of dry-cured ham. Dry-cured hams from 60 pigs slaughtered at 145 kg were analyzed. These animals were fed with two diets with different lipid content and chemical composition, and with and without access to pastures: i) standard diet without pastures; ii) standard diet with pastures; iii) diet with HOSS without pastures and iv) diet with HOSS with pastures. Dry-cured hams obtained after nine months of curing were analyzed in their physical, chemical and sensorial parameters. Dry-cured hams with higher proportion of C18:1( $\omega$ 9) and lower of saturated fatty acids were obtained with the HOSS diet versus standard diet. Access to pastures had a positive effect on the colour and resulted in a higher content of C18:3( $\omega$ 3) and C22:6( $\omega$ 3). It is concluded that a diet including HOSS and pastures produced dry-cured hams with a highest level of oleic and  $\omega$ 3 fatty acids and the most adequate  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio for human health, without any change in sensory properties.

Keywords: Pigs, feeding system, fatty acids, meat quality.

## Introducción

Los consumidores en el mundo buscan cada vez con mayor énfasis una dieta saludable y sensorialmente atractiva. En este plano, la preocupación por el contenido y tipo de grasas es creciente, lo que constituye un punto clave para los productores de alimentos cárnicos, incluidos los productos porcinos.

Uruguay no es excepción en estas tendencias globales. En el país se está investigando en la producción de carne de cerdo para consumo fresco con perfiles lipídicos más saludables, mediante la incorporación de pasturas en la dieta animal así como de otros alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, en sistemas de producción al aire libre (Capra et al., 2007; Echenique et al., 2009). La tradición pastoril de Uruguay y sus particulares condiciones agroecológicas permiten avanzar en esta estrategia sin que los costos de producción se eleven significativamente, lo que mejora la competitividad del sector.

Los resultados positivos que han surgido al proseguir esta línea de trabajo alentaron la idea de extrapolar las investigaciones realizadas en carne fresca porcina a productos elaborados de mayor valor agregado, como es el caso del jamón curado.

La alimentación animal es uno de los factores que más incide sobre la calidad de la materia prima y, por ende, del producto final. La alimentación determina, en parte, el contenido y composición química de la grasa de cobertura e intramuscular, el tenor de antioxidantes del músculo y la estabilidad a la oxidación. Por otra parte, origina compuestos que afectan al aroma y el sabor, además de influir sobre el brillo, jugosidad y textura de los productos curados (Virgili et al., 1995; Arnau, 2000). Diversos trabajos realizados en España e Italia (López Bote et al., 1999; Bosi et al., 2000; Daza et al., 2005; Ventanas et al., 2007) establecen que la composición y características de la grasa de los perniles frescos obtenidos luego de la faena de los cerdos son determinantes de la composición química y calidad sensorial de jamones serranos, ibéricos y de Parma.

Los uruguayos descienden mayoritariamente de españoles e italianos, tradicionales productores de jamón curado. A pesar de esas fuertes raíces, la producción de jamón crudo es casi inexistente, importándose más del 95 % del consumo anual (desde Brasil, España e Italia). El desafío, entonces, consiste en desarrollar un producto de calidad, a partir de una materia prima diferenciada por la alimentación y el sistema de producción de los cerdos.

En este marco, el objetivo del trabajo es evaluar el efecto de la

inclusión de semilla de girasol de alto oleico (SGAO) y pasturas en la dieta de cerdos, sobre la composición química y la calidad sensorial del jamón crudo, utilizando una tecnología de curado tradicional.

## Materiales y Métodos

### Tratamiento

Se trabajó con un total de 60 cerdos (30 machos castrados y 30 hembras) híbridos, criados al aire libre entre los 90 y los 145 kg de peso vivo. Éstos fueron sometidos por un lapso de 95 días a dos raciones balanceadas (RB) isocalóricas e isoproteicas, con y sin acceso a pastoreo (AP):

- i) Ración estándar (RE) - Sin acceso a pastoreo (SP) (n=15)
- ii) Ración estándar (RE) - Con acceso a pastoreo (CP) (n=15)
- iii) Ración con semilla girasol alto oleico (SGAO) - Sin acceso a pastoreo (SP) (n=15)
- iv) Ración con semilla girasol alto oleico (SGAO) - Con acceso a pastoreo (CP) (n=15)

La composición química de ambas raciones se presenta en la Tabla 1. La diferencia entre éstas radicó en la incorporación de una fuente rica en Ac. Oleico (semilla de girasol de alto oleico) y 300 ppm de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Rovimix E-50 Adsorbate, DSM) en la ración SGAO. El racionamiento con alimento balanceado fue restringido, suministrándose una cantidad fija por animal de 3.5 kg/día durante todo el período.

	RE	SGAO
Materia seca (%)	87.5	87.9
Energía metabolizable (Kcal/kg)	3100	3080
Proteína cruda (%MS)	16.1	16.2
Fibra cruda (%MS)	3.2	5.4
Cenizas (%MS)	4.2	4.8
Calcio (%MS)	1.0	1.1
Fósforo (%MS)	0.4	0.5
Extracto etéreo (%)	2.33	3.95
Ácidos grasos (g/100 g)		
C16:0	12.51	7.73
C18:0	1.94	2.16
C18:1 (n-7)	25.51	60.92
C18:2 (n-6)	56.85	26.42
C18:3 (n-3)	2.48	1.58

Tabla 1. Composición química de las raciones balanceadas.

La pastura, con dos años de sembrada, estaba compuesta por achicoria (*Cichorium intybus*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). En los tratamientos con pasturas, el acceso al pastoreo fue libre, manejándose una superficie de 2.500 m<sup>2</sup> por medio de franjas diarias de 100 m<sup>2</sup>, delimitadas por cerco eléctrico.

### Elaboración de los jamones curados y obtención de muestras

Los animales se sacrificaron a los 240 ± 11 días de edad y a un peso vivo de 145±5 kg. A los 45 minutos y 24 horas postmortem (p.m.) se realizaron determinaciones de pH con el fin de detectar y descartar pernils PSE o DFD. Dichas determinaciones se efectuaron sobre el músculo *Semimembranosus* del pernil de la media canal izquierda con pHmetro de compensación automática de temperatura (Altronix TPA-IV, USA) provisto de un electrodo de punción con polímero de xerolyt (Mettler-Toledo, LoT406-DKX, USA). Se realizaron dos lecturas sucesivas, tomándose como valor final la media de ambas determinaciones.

A las 48 horas p.m. se extrajeron los pernils de las hemicanales izquierdas y se procedió al pulido y perfilado de las piezas. Se extrajeron pezuña, hueso coxal y una pequeña porción de la musculatura que rodea al último, procediéndose luego al desangrado por presión manual.

Posteriormente, los jamones se sometieron a un proceso de curado tradicional de nueve meses: salazón por recubrimiento de sal y secado-maduración en cámaras con temperatura y humedad controladas.

Una vez madurados, los jamones fueron deshuesados y prensados. Las muestras se extrajeron seccionando transversalmente la pieza en su parte media, obteniéndose de esta forma dos porciones. Cada una de éstas incluía los músculos *B. femoris*, *R. femoris*, *Adductor*, *Vastus medialis*, *Vastus intermedius*, *Vastus lateralis*, *Semimembranosus* y *Semitendinosus*, fundamentalmente, y la correspondiente grasa intermuscular y de cobertura. De una de las secciones se extrajo el *Biceps femoris*.

Tanto las secciones transversales como las muestras de *Biceps femoris* fueron envasadas al vacío y conservadas a 2 °C hasta la realización de las determinaciones físico-químicas correspondientes.

### Determinaciones físico-químicas

Sobre la sección transversal de la pieza y a nivel de la muestra del músculo *Biceps femoris* se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

**Actividad de agua (Aw):** Con equipo Aqualab Series 3TE (a 25 °C), utilizando protocolo de ensayo PES.CEMIC.CER.501.

**Proteína:** Por metodología PEC QCO QLAC 039, basado en la Norma ISO 937:1978.

**Humedad:** Por metodología PEC QCO QLAC 037, basado en la Norma AOAC 2000, 950.46.

**Cenizas:** Por metodología PEC QCO QLAC 040, basado en la Norma ISO 936:1998.

**Grasa:** Mediante una extracción cuantitativa tipo método de Folch et al. (1957) utilizando una mezcla hexano-isopropanol 3:2 (v/v).

Sobre sección transversal, que incluía los músculos mencionados anteriormente, y grasa de infiltración, intermuscular y de cobertura, se determinó:

**Perfil lipídico de la grasa:** Por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (CG-EM), con preparación de los ésteres metílicos según técnica IUPAC 2.301.

**$\alpha$ -tocoferol:** Por cromatografía líquida (HPLC). En el caso de este análisis se manejó para cada tratamiento una muestra compuesta.

### Evaluación sensorial

Se llevaron a cabo ensayos con paneles de 50 consumidores cada uno. Los atributos evaluados fueron: color, sabor, textura y agrado general, utilizando una escala hedónica de nueve puntos (1-Me disgusta muchísimo a 9-Me gusta muchísimo).

En el primer ensayo se compararon muestras de jamón curado procedentes de cerdos alimentados con ración RE y con ración SGAO, en ambos casos sin acceso al pastoreo. En el segundo ensayo se compararon muestras de jamones provenientes de SGAO con pastoreo y de SGAO sin acceso al mismo.

Finalmente se contrastó el jamón proveniente de la dieta SGAO con acceso al pastoreo vs. el jamón curado de mayor consumo en Uruguay. Este último es un producto importado que participa en más del 60 % del mercado del jamón curado en el país.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos del ensayo fueron analizados utilizando el Procedure GLM del paquete estadístico SAS. El modelo estadístico utilizado incluyó los efectos tipo de ración, acceso al pastoreo e interacción tipo de ración por acceso a pastoreo. Cada pieza individual correspondió a una unidad experimental para el análisis.

Los datos de la evaluación sensorial fueron analizados por Prueba t para dos muestras, suponiendo varianzas iguales.

## Resultados y Discusión

### Propiedades físico-químicas

No se observaron diferencias significativas de pH a nivel del músculo *Semimembranosus* (Tabla 2) ni de la composición química de las secciones transversales de jamón curado y de músculo *Biceps femoris* (Tablas 3 y 4). Los valores obtenidos se hallan comprendidos dentro de los rangos citados por López et al. (2005) y García Regueiro (2006) para el caso de jamones curados españoles.

	RB		AP		Significación		
	RE	SGAO	SP	CP	RB	AP	RB vs AP
pH 45 min. p.m.	6.20	6.18	6.14	6.23	ns	ns	ns
pH 24 hs. p.m.	5.64	5.65	5.64	5.65	ns	ns	ns

Tabla 2. pH a los 45 minutos y 24 hs. p.m. (*Semimembranosus*).

	RB		AP		Significación		
	RE	SGAO	SP	CP	RB	AP	RB vs AP
Aw	0.87	0.87	0.87	0.87	ns	ns	ns
Humedad (%)	51.46	51.50	51.66	51.30	ns	ns	ns
Proteína (%)	30.90	31.23	32.40	30.20	ns	ns	ns
Cenizas (%)	10.40	10.85	10.80	11.00	ns	ns	ns
Grasa intramuscular (%)	7.29	6.88	7.42	6.74	ns	ns	ns

Tabla 3. Parámetros físico-químicos del jamón curado (*B. femoris*).

	RB		AP		Significación		
	RE	SGAO	SP	CP	RB	AP	RB vs AP
Aw	0.85	0.85	0.85	0.85	ns	ns	ns
Humedad (%)	44.59	45.21	44.63	45.18	ns	ns	ns
Proteína (%)	30.64	30.59	30.36	30.71	ns	ns	ns
Cenizas (%)	8.40	9.00	9.00	8.60	ns	ns	ns
Grasa total (%)	16.32	15.09	15.90	15.47	ns	ns	ns

Tabla 4. Parámetros físico-químicos del jamón curado (sección transversal).

Con relación a la composición de  $\alpha$ -tocoferol, si bien no se llevó a cabo un análisis estadístico al manejarse muestras compuestas, la tendencia de los resultados concuerdan con otras fuentes (Monahan et al., 1992; Bosi et al., 2000; Ventanas et al., 2007). Éstas señalan que la deposición de  $\alpha$ -tocoferol en los músculos de los cerdos es dependiente de la concentración de vitamina E en el alimento. Tal es así que la ración suplementada con vitamina E (SGAO) determinó jamones curados con mayor porcentaje de  $\alpha$ -tocoferol. Al mismo tiempo, dentro de la ración RE, aquellas piezas provenientes de animales con acceso al pastoreo promediaron un nivel superior de  $\alpha$ -tocoferol (Tabla 5).

	SP	CP
RE	0.80	1.40
SGAO	2.65	3.26

Tabla 5. Composición en  $\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ ).

### Composición química de la grasa

Según los resultados obtenidos, una proporción importante de las secciones analizadas está constituida por grasa. El tipo de ácidos grasos que la componen tiene una altísima incidencia en la calidad nutricional y organoléptica, ya que determina atributos tales como el sabor, aroma, textura y jugosidad del jamón curado.

Al comparar la composición química de la grasa de jamones curados provenientes de diferentes tratamientos, el perfil de ácidos grasos resultó ser contrastante. Los cerdos cuya dieta se basó en SGAO dieron lugar a jamones curados con un perfil lipídico significativamente superior en Ac. Oleico, además de presentar una relación ácidos grasos monoinsaturados/saturados (MUFA/SFA) más favorable desde el punto de vista nutricional, ya que la proporción de SFA disminuyó y la de MUFA aumentó respecto a la dieta basada en RE (Tabla 6).

Esta situación se explica por la condición de monogástrico del cerdo, ya que la composición de ácidos grasos de los lípidos tisulares refleja de un modo más o menos aproximado el perfil de ácidos grasos de los alimentos ingeridos (Scheeder et al., 2000; Hogberg et al., 2003; Martínez et al., 2007; Capra et al., 2007). Por ello, al diferenciar en forma acentuada las dietas desde el punto de vista de su perfil lipídico, la consecuencia lógica es obtener carne y productos finales con una composición en ácidos grasos contrastante.

El incremento en el contenido de Ac. Oleico por efecto de una dieta animal rica en dicho ácido graso normalmente se traduce en beneficios sensoriales y nutricionales muy importantes en los jamones curados. En primer lugar, el Ac. Oleico tiene un efecto positivo sobre las lipoproteínas de alta densidad (HDL), factor de protección sobre enfermedades cardiovasculares (Bondia, 2007; Wood et al., 2008). En segundo lugar, estas grasas son más resistentes a la oxidación que las poliinsaturadas (Rhee et al., 1988; López Bote et al., 1999), generan productos finales de oxidación con menor proporción de hexanal (Larick et al., 1992) y forman una mayor cantidad de aldehídos y compuestos aromáticos agradables durante el proceso de maduración del producto (García et al., 1991). Al mismo tiempo, para el Ac. Oleico se registró una interacción significativa entre la dieta SGAO y el acceso a la pastura ( $P < 0.05$ ), lo que determinó un porcentaje de dicho ácido graso próximo a 49 % en los jamones provenientes de cerdos alimentados con SGAO y pasturas.

A nivel de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para los ácidos grasos  $\omega 6$  (Ac. Linoleico y Araquidónico, fundamentalmente). Por otra parte, se registraron mayores proporciones de los ácidos grasos DHA y  $\alpha$ -linolénico en el caso de jamones provenientes de cerdos sometidos a pastoreo. En Argentina, Moisés et al. (2007) arribaron a resultados similares al comparar la composición de la grasa intramuscular de carne porcina proveniente de sistemas de producción confinado y con acceso a una pastura de alfalfa y trébol blanco. Las pasturas, dependiendo de las especies que las componen, presentan en su perfil lipídico entre un 33 % y casi un 50 % de Ácido  $\alpha$ -linolénico (Isabel y López Bote, 2000; García Martín, 2001; Pérez et al., 2008), por lo que dicho aporte se ve reflejado en la composición química del tejido adiposo.

Por otra parte, se determinó una interacción estadísticamente significativa ( $P < 0.01$ ) con el tipo de ración, ya que las piezas provenientes de cerdos alimentados con pasturas y SGAO presentaron los mayores porcentajes de Ac.  $\alpha$ -linolénico. Un incremento en la proporción de dicho ácido graso esencial es por demás favorable desde el punto de vista de la salud humana, dado que es precursor de la serie metabólica  $\alpha 3$  y algunas de las dietas occidentales actuales solo cubren un 50 % de la ingesta diaria de Ac.  $\alpha$ -linolénico recomendada (Bondia, 2007).

Con respecto a las relaciones entre los  $\omega 6/\omega 3$  los valores más bajos y, por ende, favorables se obtuvieron con jamones provenientes de los tratamientos con acceso a pastoreo (Tabla 6). Fue registrada una interacción entre el tipo de ración utilizado con la pastura ( $P < 0.05$ ), determinando que los jamones curados provenientes de cerdos con acceso al pastoreo y dietas basadas en girasol de alto oleico presentarían las relaciones  $\omega 6/\omega 3$  más beneficiosas desde el punto de vista nutricional.

Ácidos Grasos (%)	RB		AP		Significación P<		
	RE	SGAO	SP	CP	RB	AP	RB x AP
C6:0	0,03	0,02	0,03	0,03	Ns	ns	ns
C8:0	0,01	0,05	0,01	0,05	0,05	ns	ns
C10:0	0,07	0,06	0,06	0,06	Ns	ns	ns
C12:0	0,09	0,06	0,07	0,07	0,05	ns	ns
C14:0	1,43	1,15	1,40	1,18	0,05	ns	0,05
C15:0	0,07	0,03	0,05	0,05	0,05	ns	ns
C16:0	24,94	21,51	24,15	22,31	0,05	ns	ns
C16:1	1,89	2,29	2,01	2,18	0,05	ns	ns
C17:0	0,42	0,29	0,37	0,34	ns	ns	ns
C17:1	0,19	0,19	0,19	0,19	ns	ns	ns
C18:0	14,00	12,45	13,41	13,04	0,05	ns	ns
C18:1	41,54	47,69	43,76	45,46	0,0001	ns	0,05
C18:2	11,21	10,54	10,95	10,79	ns	ns	ns
C18:3	0,59	0,57	0,35	0,80	ns	0,0001	0,01
C19:0	0,03	0,02	0,03	0,02	ns	ns	ns
C20:0	0,16	0,12	0,15	0,13	ns	ns	ns
C20:1	0,62	0,70	0,66	0,66	ns	ns	ns
C20:2	0,69	0,47	0,56	0,61	ns	ns	ns
C20:3	0,08	0,08	0,06	0,10	ns	0,05	ns
C20:4	0,23	0,17	0,19	0,21	ns	ns	ns
C22:3	0,10	0,02	0,06	0,06	0,01	ns	ns
C22:4	0,09	0,02	0,06	0,05	ns	ns	ns
C22:5	0,09	0,12	0,05	0,08	ns	ns	ns
C22:6 (DHA)	0,09	0,10	0,04	0,15	ns	0,001	ns
ω3	0,74	0,77	0,45	1,03	ns	0,001	0,01
ω6/ω3	16,74	14,76	26,39	11,52	ns	0,001	0,01
ΣSFA	42,53	36,90	40,92	38,51	0,05	ns	ns
ΣMUFA	44,23	50,86	46,61	48,48	0,0001	ns	ns
ΣPUFA	13,13	12,06	12,33	12,83	ns	ns	ns
MUFA/SFA	1,07	1,42	1,17	1,30	0,01	0,05	ns

Tabla 6. Perfil lipídico del jamón curado (sección transversal).

## Evaluación sensorial

Al someter a evaluación muestras de jamones provenientes de dietas con RE y SGAO, no se registraron diferencias significativas, con valores dentro de la escala hedónica en el entorno de 7-7.2 para los atributos estudiados (Tabla 7). Si bien químicamente se obtuvieron diferencias significativas en el perfil lipídico, éstas no fueron detectadas por los consumidores.

	COLOR	SABOR	TEXTURA	AGRADO GENERAL
RE	7.1	7.1	7.2	7.1
SGAO	7.1	7.2	7.0	7.1
Significación	NS	NS	NS	NS

Tabla 7. Evaluación sensorial de jamones provenientes de diferentes dietas.

En cambio, al comparar jamones provenientes de cerdos con diferente acceso al pastoreo, el panel de consumidores pudo determinar una diferencia estadísticamente significativa para el color (Tabla 8).

	COLOR	SABOR	TEXTURA	AGRADO GENERAL
CON PASTURA	7.0 a	7.2 a	7.2 a	7.1 a
SIN PASTURA	6.4 b	6.8 a	6.7 a	6.7 a
Significación	P<0.05	NS	NS	NS

Tabla 8. Evaluación sensorial de jamones de cerdos con y sin acceso a pasturas.

Lo anterior concordaría con lo señalado por Graziotti (2000), quien observó que al realizar el animal una actividad física moderada, como es el caso del pastoreo, se produce un incremento de las fibras rojas oxidativas, lo cual tiene incidencia sobre la intensidad del color por una mayor concentración de mioglobina. A su vez, la actividad antioxidante de los *α-tocoferoles* naturales presentes en las pasturas reduciría la oxidación de dicho pigmento de la carne (Cava y Andrés, 2001).

	COLOR	SABOR	TEXTURA	AGRADO GENERAL
Jamón en estudio	7.1 a	7.2 a	7.2 a	7.1 a
Jamón comercial	6.3 b	6.4 b	6.1 b	6.1 b
Significación	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P<0.05

Tabla 9. Evaluación sensorial de jamones en estudio y comercial.

Finalmente, al comparar el jamón proveniente de la dieta SGAO con acceso al pastoreo (jamón en estudio) con el jamón curado de mayor consumo en Uruguay (jamón comercial), se obtuvo una puntuación más elevada para todos los atributos (P<0.05) en el caso del jamón en estudio (Tabla 9).

## Conclusiones

De los resultados se desprende que es factible modificar por medio de la alimentación y el pastoreo de los animales algunos atributos de la calidad nutritiva y sensorial del jamón curado obtenido.

El suministro de una dieta rica en Ac. Oleico da lugar a jamones curados con un alto porcentaje de dicho ácido graso en su perfil lipídico, al tiempo que reduce la proporción de las grasas saturadas.

La utilización de pasturas en la dieta, además de incidir positivamente sobre el color de los jamones curados (según apreciación de los consumidores), también influye sobre la composición a nivel de los PUFA del producto final. En este sentido, las pasturas determinan una mayor proporción de los Ac.  $\alpha$ -linolénico y Docosahexaenoico (DHA), que son de gran relevancia para la salud cardiovascular, al igual que Ac. Oleico.

Con una dieta compuesta por SGAO y pasturas, se obtienen los jamones curados con mayor proporción de C18:1( $\omega$ 9), C18:3( $\omega$ 3) y C22:6( $\omega$ 3) y las relaciones  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 más favorables desde el punto de vista de la nutrición humana. Sensorialmente, el jamón obtenido a partir de la investigación tiene una mayor aceptación por parte de los consumidores uruguayos que el producto comercial importado con mayor presencia en el mercado nacional.

En síntesis, por medio de la dieta y el sistema de producción es posible modificar la composición en ácidos grasos de la carne porcina –y por tanto del jamón curado– hacia perfiles lipídicos más beneficiosos, al menos desde la perspectiva nutricional, sin afectar otros atributos de calidad.

## Reconocimientos

Este trabajo forma parte del Proyecto de Innovación en Tecnología “Desarrollo de jamones curados de calidad diferenciada”, llevado adelante conjuntamente por Granja La Familia, LATU e INIA, con financiamiento del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

## Referencias

- ARNAU, J. Aspectos tecnológicos que afectan al desarrollo de la textura y el sabor. En: IRTA; EUROCARNE. *II Symposium Internacional del Jamón Curado* (Barcelona 2000). Barcelona IRTA; Eurocarne. pp.27-42.
- BONDIA, I. *Estudio del perfil de ácidos grasos en la evaluación de la dieta mediterránea como patrón de dieta saludable en poblaciones europeas*. Barcelona: Universidad de Barcelona, 2007. (Tesis de Doctorado). pp.5-20.
- BOSI, P.; CACCIAVILLANI, J.; CASINI, L.; LO FIEGO, D.; MARCHETTI, M.; MATTUZZI, S. Effects of dietary high-oleic acid sunflower oil, copper and vitamin E levels on the fatty acid composition and the quality of dry cured Parma ham. En: *Meat Science*. 2000, (54):119-126.
- CAPRA, G.; ECHENIQUE, A.; GROMPONE, M.; BAUZÁ, R.; GONZÁLEZ, A.; SILVA, D. Evaluación de la inclusión de grano de soja desactivado, afrechillo de arroz integral o suero de queso en la dieta de cerdos en engorde. Efecto sobre el perfil lipídico de la grasa subcutánea. En: *Agrociencia*. 2007, (Especial Noviembre):59-63.
- CAVA, R.; ANDRES, A. La obtención de materia prima de una adecuada aptitud tecnológica. Características de la grasa determinantes de la calidad del jamón: influencia de los factores genéticos y ambientales. En: VENTANAS, J. *Tecnología del jamón ibérico*. Madrid: Mundi-Prensa, 2001. pp.99-130.
- DAZA, A.; REY, A.I.; RUIZ, J.; LOPEZ BOTE, C. Effect of feeding in free-range conditions or in confinement with different dietary MUFA/PUFA ratios and alfa-tocopheryl acetate, on antioxidants accumulation and oxidative stability in Iberian pigs. En: *Meat Science*. 2005, (69):151-163.
- ECHENIQUE, A.; CAPRA, G.; PARDO, G.; GROMPONE, A.; URRUZOLA, N. Efecto de las pasturas sobre la composición química de la grasa intramuscular de cerdos producidos al aire libre en Uruguay. En: *AIDA. XIII Jornadas sobre Producción Animal* (Zaragoza 12-14 de mayo de 2009). Zaragoza: AIDA, 2009. pp.622-624.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. En: *Journal of Biology and Chemistry*. 1957, (226):497-509.
- GARCÍA, C.; BERDAGUÉ, J.; ANTEQUERA, T.; LOPEZ BOTE, C.; CORDOBA, J.; VENTANAS, J. Volatile components of dry-cured

- iberian ham. En: *Food Chemistry*. 1991, (41):23-32.
- GARCÍA MARTIN, M. Manejo nutricional del cerdo Ibérico. En: BUXADE CARBO, C.; DAZA, A. *Porcino Ibérico: aspectos claves*. Madrid: Mundi-Prensa, 1999. pp.273-328.
- GARCÍA REGUEIRO, J. Situación del jamón curado en las tendencias nutricionales actuales. En: *Cárnicas 2000*. 2006, (270):36-41.
- GRAZIOTTI, G.; RÍOS, C.; BASSO, L. Las fibras musculares esqueléticas y la producción de carne en el cerdo. En: *Revista Argentina de Producción Animal*. 2000, 20(2):145-159.
- HOGBERG, A.; PICKOVA, J.; ANDERSSON, K.; LUNDSTROM, K. Fatty acid and tocopherol content of muscle in pigs fed organic and conventional feed with different n6/n3 ratios, respectively. En: *Food Chemistry*. 2003, (80):177-186.
- ISABEL, B.; LÓPEZ BOTE, C. Ácidos grasos, antioxidantes naturales y ejercicio: factores que determinan la calidad de los productos del cerdo ibérico. En: CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y GANADERÍA; JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN. *II Jornadas El cerdo ibérico y sus productos* (Salamanca 24 y 25 mayo de 2000). Salamanca: Consejería de Agricultura y Ganadería; Junta de Castilla y León, 2000. pp.2-10.
- LARICK, D.; TURNER, B.; SCHOENHERR, W.; COFFEY, M.; PILKINGTON, D. Volatile compound contents and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet. En: *Journal of Animal Science*. 1992, (70):1397-1403.
- LÓPEZ ANTÓN, N. El jamón curado como alimento saludable para grupos especiales (adolescencia y tercera edad). En: MONFORT, J.M.; GUILLEN PÉREZ, F. *III Congreso Mundial del Jamón* (Teruel 18-20 de mayo de 2005). Teruel: Consejo Regulador de la Denominación de Origen -Jamón de Teruel-, 2005. pp.143-150.
- LÓPEZ BOTE, C. Alimentación del cerdo Ibérico con piensos compuestos. En: BUXADE CARBO, C.; DAZA, A. *Porcino Ibérico: aspectos claves*. Madrid: Mundi-Prensa, 1999. pp.247-272.
- LÓPEZ BOTE, C.; ISABEL, B.; REY, A. Efecto de la nutrición y el manejo sobre la calidad de la grasa de cerdo. En: GARCIA REBOLLAR, P.; DE BLAS, G.; GONZALEZ MATEOS, G. *XV Curso de Especialización FEDNA: Avances en nutrición y alimentación animal*. Madrid: FEDNA, 1999. pp.26.
- MARTÍNEZ, S.; CACHALDORA, A.; FONSECA, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. La grasa del cerdo de raza Celta: perfil de ácidos de los lípidos neutros y polares en distintas localizaciones de la canal. En: *Eurocarne*. 2007, (154):1-13.
- MOISÁ, S.; BASSO, L.; BACCI, R.; BRUNORI, J.; FRANCO, R. Composición de la grasa intramuscular en carne porcina proveniente de diferentes sistemas de producción. En: *Revista Argentina de Producción Animal*. 2007, 27(1):347-395.
- MONAHAN, F. Oxidación de los lípidos de la carne y los productos cárnicos: implicaciones y prevención. En: *Eurocarne*. 2002, (109):1-7.
- PÉREZ, T.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. Perfil de ácidos grasos de la grasa subcutánea e intramuscular de cerdos ibéricos cebados en montañera y con pienso alto oleico. En: *Eurocarne*. 2008, (163):1-10.
- RHEE, K.; ZIPRIN, Y.; ORDONEZ, G.; BOHAC, C. Fatty acid profiles of the total lipids and lipid oxidation in pork muscles as affected by canola oil in the animal diet and muscle location. En: *Meat Science*. 1988, 23(3):201-210.
- SCHEEDER, M.; GLAESER, K.; EICHENBERG, B.; WENCK, C. Influence of different fats in pig feed on fatty acid composition of phospholipids and physical meat quality characteristics. En: *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, (102):391-401.
- VENTANAS, S.; VENTANAS, J.; TOVAR, J.; GARCÍA, C.; ESTÉVEZ, M. Extensive feeding versus oleic acid and tocopherol enriched mixed diets for the production of Iberian dry-cured hams effect on chemical composition, oxidative status and sensory traits. En: *Meat Science*. 2007, 77(2):246-256.
- VIRGILI, R.; PAROLARI, C.; SORESI, C.; VOLTA, R. Effetto della materia prima sulla proteolisi e sulla consistenza del prosciutto crudo tipico. En: *Industria Conserve*. 1995, (70):21-31.
- WOOD, J.; ENSER, M.; FISHER, A.; NUTE, G.; SHEARD, P.; RICHARDSON, R.; HUGHES, S.; WHITTINGTON, F. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality. En: *Meat Science*. 2008, 78(4):343-358.

# Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador

Escobar, D. <sup>(1)</sup>, Sala, A. <sup>(2)</sup>, Silvera, C. <sup>(2)</sup>, Harispe, R. <sup>(3)</sup>, Márquez, R. <sup>(1)</sup>

Contacto: descobar@latu.org.uy

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

Recibido: 1/7/2009 - Aprobado: 4/11/2009

## Resumen

Las películas se elaboraron a partir de soluciones de aislado de proteínas de suero lácteo (WPI), utilizando glicerol como plastificante y con el agregado o no de sorbato de potasio como conservador. Los métodos utilizados fueron el de moldeo por compresión a 140 °C y 1 MPa y el método de casting a 23 °C y 55 % de humedad relativa. El método de moldeo por compresión presenta la ventaja de involucrar menos tiempo y menos incertidumbre para la formación de las películas comparado con el método de casting. Por otro lado, mejora las propiedades mecánicas de las películas aumentando su stress máximo y su elongación y disminuyendo su permeabilidad al vapor de agua y su solubilidad.

Palabras clave: Moldeo por compresión, casting, fuerza, stress, elongación, módulo de Young.

## Abstract

The films were made from whey protein isolate (WPI) solutions using glycerol as plasticizer and with or without the use of potassium sorbate as antimicrobial. The methods used were compression molding at 140 °C and 1 MPa and the casting method at 23° C and 55 % of humidity. The compression molding method has the advantage of involving less time and uncertainty for the film forming than the casting method. On the other hand, it improves the mechanical properties bringing films with higher tensile strength and elongation, and less water vapor permeability and solubility.

Keywords: Compression molding, casting, force, tensile strength, elongation, elastic modulus.

## Introducción

Una película comestible y biodegradable se define como una capa fina de material comestible y biodegradable que puede ser formada sobre un alimento como una cobertura o preformada como una película, y que puede colocarse entre los componentes de un alimento o ser un envoltorio para éste. Sus propiedades le permiten controlar la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas y lípidos, incluir en el sistema ingredientes alimentarios (por ejemplo: antioxidante, antimicrobiano y sabores), y/o mejorar la integridad mecánica y de manipulación del alimento (Krotcha y De Mulder-Johnston, 1997).

El uso de películas por la industria alimentaria es de gran interés por su potencial para incrementar la vida útil de muchos alimentos. Las películas pueden incorporar en sus formulaciones sustancias activas, lo que las hace un ejemplo de envases activos para alimentos (Han y Gennadios, 2005). Tal es el caso del uso de antimicrobianos incorporados en las películas comestibles para extender la vida útil de los alimentos, retardando el crecimiento de hongos, levaduras y bacterias durante el almacenamiento y distribución de los alimentos; uno de los más usados es el sorbato de potasio (Cuppert, 1994).

La formación de las películas puede lograrse a través de dos procesos principales. Uno de ellos es el "proceso húmedo", que involucra la dispersión o solubilización de los biopolímeros en una solución para la formación de la película, seguida por la evaporación del solvente. Un ejemplo es el método casting, en el cual luego de formada la solución de los componentes de la película, se realiza la evaporación del solvente a temperatura y humedad controladas,

formándose así la película. Otro es el "proceso seco", que se fundamenta en la conducta termoplástica que algunas proteínas y polisacáridos muestran a bajos niveles de humedad en moldeo por compresión y extrusión. En el método de moldeo por compresión, luego de formada la masa de los componentes de la película se le aplica una presión y una temperatura determinadas durante un tiempo establecido, para lograr así la formación de la película.

El objetivo de este artículo es comparar dos métodos de elaboración de películas biodegradables y comestibles hechas en base a aislado de proteínas de suero lácteo (WPI), conteniendo o no en su formulación sorbato de potasio como conservador. Los métodos estudiados son el método de moldeo por compresión y el método de casting. Las características a evaluar para la comparación son las propiedades mecánicas de las películas obtenidas, su permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua y humedad.

## Materiales y Métodos

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

Las películas se elaboraron a partir de una mezcla de WPI (PROVON® 290, 90 % p/p, Glanbia Nutritionals, WI, USA), glicerol (J. T. Backer) como plastificante y agua destilada. En las películas donde se incorporó sorbato de potasio como conservador se hizo en una proporción del 10 % p/p en la película final, previamente disuelto en el agua (esta cantidad fue seleccionada de un estudio hecho

en paralelo en el cual se evidenció la actividad fungistática de esta proporción del conservador). Las películas se prepararon manteniendo una relación de WPI/glicerol 2,3/1 y un 18 % (p/p) de humedad. La mezcla se batió en batidora manual a la mínima velocidad durante 15 minutos y luego se almacenó en bolsas de polietileno a 5 °C durante 24 horas para equilibrar sus componentes. Para la formación de las películas se colocaron esferas de 3 g de la mezcla entre las placas de una prensa de laboratorio (Toyoseiki, P2-25T) y se sometieron a una temperatura de 140 °C y una presión de 1 MPa durante 2 minutos. Se retiraron de allí luego de 3 minutos de enfriamiento. Las películas así obtenidas fueron almacenadas a  $23 \pm 2$  °C de temperatura y  $55 \pm 5$  % de humedad relativa durante cinco a siete días previo a la realización de los ensayos.

### Preparación de las películas por método de casting

Las películas se elaboraron a partir de soluciones de WPI (PROVON® 290, 90 % p/p, Glanbia Nutritionals, WI, USA) en agua destilada, utilizando como plastificante glicerol (J. T. Backer). Se prepararon soluciones de 10 % de WPI p/p en la película final, manteniendo una relación WPI/glicerol 2,3/1. El sorbato de potasio se incorporó en estas soluciones en una proporción del 10 % p/p en la película final. Se trataron durante una hora con agitación magnética y se ajustó el pH a 8,0 con solución de NaOH 2N o HCl 2N, según correspondiera. Las soluciones se colocaron en baño de agua a  $83 \pm 1$  °C durante siete minutos para lograr un buen entrecruzamiento, evitando la coagulación de las proteínas. El peso de las soluciones fue ajustado con agua destilada de manera de compensar las pérdidas producidas por evaporación y mantener las condiciones iniciales. Se colocaron 14 g de la solución en cada placa de Petri de poliestireno (Greiner Bio-One) de 14 cm de diámetro interno, utilizando pipeta Pasteur y de manera lenta para evitar la formación de burbujas. Las placas se colocaron en condiciones de temperatura de  $23 \pm 2$  °C y humedad relativa de  $55 \pm 5$  % durante 19 horas para secar las películas, que así obtenidas fueron almacenadas en las mismas condiciones durante cinco a siete días previo a la realización de los ensayos.

### Ensayos realizados

#### • Espesor de las películas

Se midió con micrómetro digital (Digi Thickness Tester, Toyoseiki, Japón), con una resolución de 1 µm. El resultado se expresó como el promedio de 10 medidas tomadas aleatoriamente en las películas ya cortadas y acondicionadas para la realización del ensayo.

#### • Ensayos mecánicos

Se realizaron de acuerdo a la norma ASTM D882. Se cortaron las películas en forma de probetas de 10 mm de ancho con un cortador de muestras neumático (Toyoseiki, Japón). Se midieron los espesores según se mencionó anteriormente y se seleccionaron para estos ensayos aquellas películas cuyo espesor era  $0.140 \pm 0.010$  mm. Posteriormente se realizaron los ensayos de tracción en un equipo Shimadzu Autograph AG-2000A. Se utilizó una separación de mordazas de 50 mm y se aplicó una velocidad de 50 mm/min. De los ensayos de tracción realizados se determinaron los siguientes parámetros: fuerza máxima, stress máximo, porcentaje de elongación y módulo de Young. Se realizaron de seis a ocho ensayos por cada tipo de película elaborada. La comprobación estadística de los resultados se basó en test de hipótesis al 95 % de confianza.

#### • Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua se define como la velocidad de transmisión de vapor de agua por unidad de área del material y por

unidad de diferencia de presión entre dos superficies específicas bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad.

Para la medición de este parámetro se utilizó el método gravimétrico, basado en la norma ASTM E96, con las siguientes condiciones: 0 % HR dentro de la celda y  $100 \pm 2$  % fuera de la misma a una temperatura de 23 °C. Para esto se utilizó una cámara de temperatura y humedad controladas (Tabai espec. Corp., MS-110, Japan). Se hicieron entre tres y cinco ensayos por cada tipo de película elaborada. Los espesores de las películas utilizadas para este ensayo fueron de  $0.120 \pm 0.010$  mm.

#### • Humedad y solubilidad en agua

La solubilidad en agua se define como el porcentaje de materia seca de la película solubilizada luego de 24 horas de inmersión en agua (Gontard, 1994).

El contenido inicial de materia seca (%) y la humedad se determinaron gravimétricamente secando las muestras del film a 105 °C en una estufa con circulación de aire por 24 horas. Se cortaron tres discos de la película de 2 cm de diámetro, se pesaron y se colocaron en un vaso de bohemia que contenía 50 mL de agua. Éste se introdujo en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific Co., modelo G25) a 20 °C y 62 rpm. Luego de la incubación las muestras de películas se quitaron de los vasos y se secaron en una estufa a 105 °C durante 24 horas para determinar la materia seca no soluble en agua. Restando este valor del peso de materia seca inicial, se obtuvo el peso de materia seca que se solubilizó en agua durante 24 horas y se expresó como un porcentaje de la materia seca inicial. Se realizaron entre cuatro y seis ensayos por cada tipo de película elaborada.

## Resultados y Discusión

### Ensayos mecánicos

En los Gráficos 1 al 4 se presentan los resultados de los ensayos mecánicos realizados a las películas elaboradas con y sin sorbato de potasio, utilizando ambos métodos de elaboración.

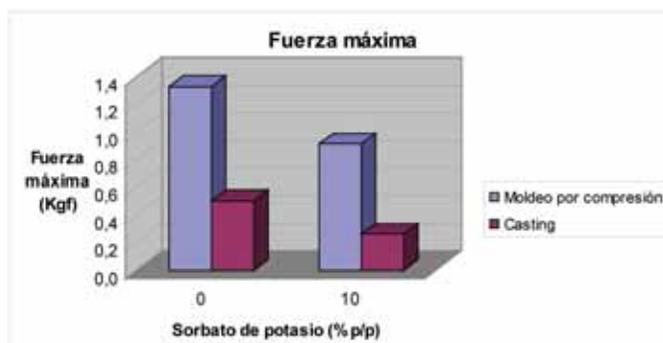


Gráfico 1. Comparación de fuerza máxima de las películas realizadas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

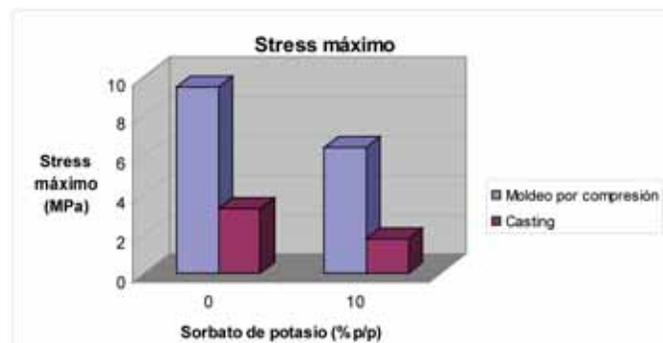


Gráfico 2. Comparación del stress máximo de las películas realizadas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

Las películas obtenidas por el método de moldeo por compresión presentan valores de fuerza y stress máximo entre 2,7 y 3,5 veces mayores que los de las películas elaboradas por el método de casting. Sothornvit et al. (2007) hallaron una disminución del stress en las películas elaboradas por el método casting respecto a las elaboradas por el método de moldeo por compresión, usando películas en base a WPI y glicerol.

En ambos métodos se observa que la incorporación de sorbato de potasio disminuye tanto la fuerza máxima como el stress máximo de las películas. Las disminuciones son mayores cuando se usa el método de casting (48 % para la fuerza máxima y 45 % para el stress máximo), mientras que cuando se usa el método de moldeo por compresión la fuerza máxima disminuye un 32 % y el stress máximo un 33 %.

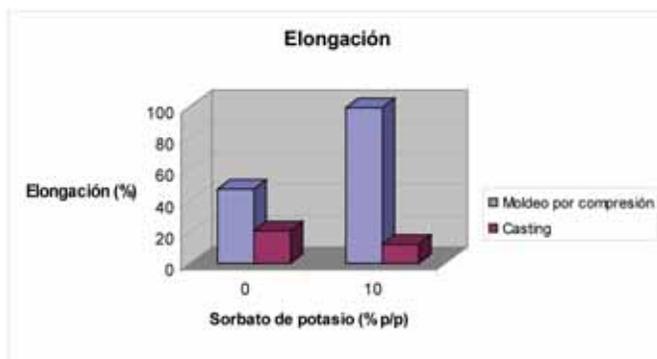


Gráfico 3. Comparación de la elongación de las películas realizadas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

Se observa mayor elongación en las películas realizadas por el método de moldeo por compresión, que aumenta con el agregado de sorbato de potasio. Sucede lo contrario en el método de casting, donde el agregado de sorbato de potasio disminuye la elongación de las películas. La mayor elongación encontrada es de 99 % y se presenta en las películas con un 10 % de sorbato en su formulación y elaboradas por el método de moldeo por compresión.

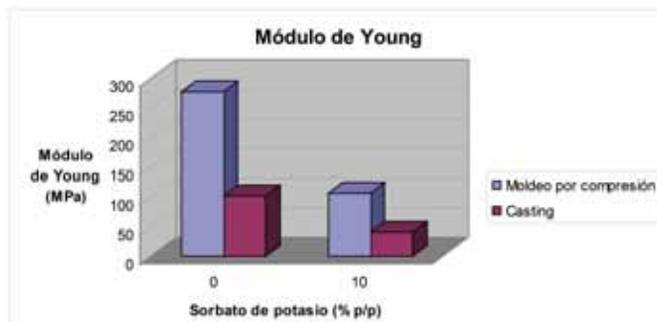


Gráfico 4. Comparación del módulo de Young de las películas realizadas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

El módulo de Young es menor en las películas elaboradas por el método casting. La incorporación de sorbato de potasio hace que dicho módulo sea más de un 60 % menor en las películas, con cualquiera de los dos métodos estudiados.

### Permeabilidad al vapor de agua

En el Gráfico 5 se muestran los resultados de la permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas con ambos métodos y con y sin agregado de sorbato de potasio.

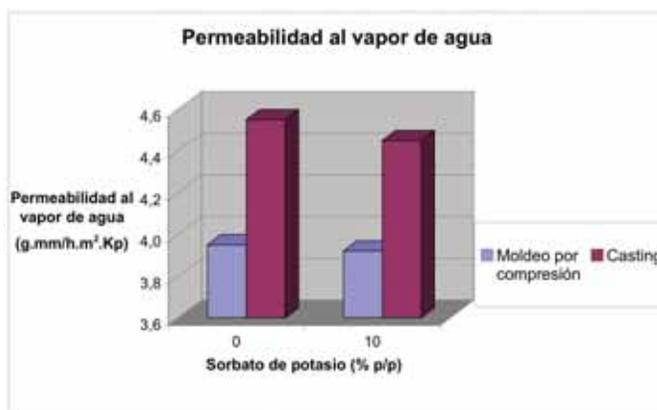


Gráfico 5. Permeabilidad al vapor de agua de las películas elaboradas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

Las películas elaboradas con el método de moldeo por compresión son menos permeables al vapor de agua que las películas elaboradas por el método de casting, no encontrándose diferencias significativas por el agregado de sorbato de potasio en ambos métodos. Sothornvit et al. (2003) justifican este hecho porque la alta temperatura del proceso de moldeo por compresión lleva a un mayor entrecruzamiento de las proteínas, haciendo que la permeabilidad al vapor de agua sea menor.

### Humedad y solubilidad en agua

En la Tabla 1 se expresan los resultados de los ensayos de humedad y solubilidad en agua de las películas elaboradas por el método de moldeo por compresión y por el método de casting, en todos los casos sin incorporar sorbato de potasio en las formulaciones.

Método de elaboración	Humedad (%)	Solubilidad (%)
Moldeo por compresión	19,3	39,0
Casting	22,1	59,5

Tabla 1. Resultados de humedad y solubilidad en agua de las películas elaboradas por los métodos de moldeo por compresión y de casting.

Se observa que la solubilidad de las películas elaboradas por el método de moldeo por compresión es menor que la de las películas elaboradas por casting.

Según indican Sothornvit et al. (2003), las películas elaboradas con el método de moldeo por compresión deberían perder más humedad durante el propio proceso de elaboración, comparadas con las películas elaboradas por el método de casting.

## Conclusiones

La elaboración de películas comestibles por el método de moldeo por compresión permite obtener películas más resistentes a la ruptura. Esto lo demuestran las propiedades mecánicas analizadas, que arrojan como resultado mayores valores de fuerza y stress máximo y mayores elongaciones previas a la ruptura.

Adicionalmente, este método de elaboración permite obtener películas con menores valores de permeabilidad al vapor de agua y de solubilidad, propiedades que son deseables cuando las películas se quieren utilizar en contacto con alimentos cuya humedad se pretende mantener constante.

Asimismo, el método de moldeo por compresión presenta la ventaja de insumir menos tiempo para la elaboración de las películas, y las mismas son menos sensibles a las variaciones de las condiciones ambientales durante la elaboración.

Estas características llevan a que este método sea el elegido a la hora de elaborar películas comestibles y biodegradables.

## Reconocimientos

LATU: Centro de Información Técnica, Departamento de Productos Lácteos, Cárnicos, Hortofrutícolas y de la Colmena, Departamento de Microbiología, Departamento de Plásticos.

## Referencias

- ASTM INTERNATIONAL (United States). D882: *Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*. West Conshohocken: ASTM, 2002.
  - ASTM INTERNATIONAL (United States). E96: *Standard test methods for water vapor transmission of materials*. West Conshohocken: ASTM, 1995.
  - CUPPET, S.L. Edible coatings as carriers of food additives, fungicides and natural antagonists. En: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. *Edible coatings and films to improve food quality*. Lancaster: Technomic Publishing, 1994. pp.121-138.
  - GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. En: *International Journal of Food Science and Technology*. 1994, (29):39-50.
  - HAN, J.H.; GENNADIOS, A. Edible films and coatings: a review. En: HAN, J.H. *Innovations in food packaging*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. pp.239-262.
  - HERNÁNDEZ-IZQUIERDO, V.M.; KROTCHA, J.M. Thermoplastic processing of proteins for films formation: a review. En: *Journal of Food Science*. 2008, 73(2):R30-R39.
  - KROTCHA, J.M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. En: *Food Technology*. 1997, 51(2):61-74.
  - SOTHORNVIT, R.; OLSEN, C.W.; McHOUGH, T.H.; KROTCHA, J.M. Formation conditions, water vapor permeability and solubility of compression-molded whey protein films. En: *Journal of Food Science*. 2003, 68(6):1985-1989.
-

# Aplicación de Elastografía por Retorno Temporal a la evaluación de textura en quesos\*

Brum, J. <sup>(1)</sup>, Barrios S. <sup>(2)</sup>, Ares, G. <sup>(2)</sup>, Lema, P. <sup>(2)</sup>, Canetti, R. <sup>(3)</sup>, Negreira, C. <sup>(1)</sup>

Contacto: sbarrios@fing.edu.uy

<sup>(1)</sup> Laboratorio de Acústica Ultrasonora. Instituto de Física, Facultad de Ciencias - <sup>(2)</sup> Instituto de Ingeniería Química -

<sup>(3)</sup> Instituto de Ingeniería Eléctrica, Facultad de Ingeniería. Universidad de la República, Uruguay.

Recibido: 13/11/2009 - Aprobado: 7/12/2009

\*Primer premio de INNOVA 2009: IV Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, (Montevideo 30 de setiembre, 1-2 de octubre de 2009). Montevideo: LATU, 2009.

## Resumen

El objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicación de la técnica acústica Elastografía por Retorno Temporal (TRE) a la evaluación de la textura de distintos tipos de queso. Se evaluaron ocho muestras comerciales de diferente textura mediante las técnicas de TRE y Análisis de Perfil de Textura (TPA). Ambas metodologías permitieron detectar diferencias en la textura de las muestras, aportando resultados concordantes. De acuerdo a la regresión de mínimos cuadrados parciales realizada (PLS), el ancho de focalización obtenido por TRE se correlacionó positivamente ( $R^2=0.89$ ) con los parámetros dureza y rigidez del TPA. Esto indica que la técnica de TRE sería un método adecuado para evaluar la textura de los quesos de forma no destructiva. Palabras clave: Técnicas acústicas, parámetros elásticos, evaluación no destructiva.

## Abstract

The aim of this work was to study the application of the acoustic technique Time Reversal Elastography (TRE) for texture evaluation of different types of cheese. Eight commercial cheese samples were evaluated using TRE and Texture Profile Analysis (TPA). Both methodologies were able to identify differences in the texture of the evaluated cheese samples, providing similar results. According to the partial least squares regression performed, the focalization width determined by TRE was positively correlated ( $R^2=0.89$ ) to hardness and stiffness. This indicates that TRE could be considered as an adequate method for the non destructive evaluation of cheese texture.

Keywords: Acoustic techniques, elastic parameters, non destructive evaluation.

## Introducción

La aplicación de técnicas de monitoreo y control de calidad que permitan la evaluación de propiedades de alimentos de manera rápida y no destructiva es de gran interés para la industria alimentaria. En los últimos años se ha verificado el gran potencial que poseen las técnicas acústicas para la evaluación de distintas propiedades en alimentos como queso, carne, frutas y aceites (Benedito et al., 2002; Benedito et al., 2006a). La aplicación de estas técnicas constituye una alternativa no destructiva y fácilmente automatizable. En particular, la aplicación de técnicas acústicas permite la evaluación de la textura de diferentes tipos de queso (Benedito et al., 2006b).

La velocidad de propagación del ultrasonido se utilizó como parámetro ultrasónico para el seguimiento de los cambios de textura que se dan a lo largo de la maduración en quesos Manchego, Cheddar y Mahon (Benedito et al., 2000a, 2000b, 2006a). Los resultados de estos trabajos muestran que la medida de textura por ultrasonido es posible, verificándose la correlación entre la velocidad de ultrasonido y parámetros de textura tales como dureza y rigidez. Sin embargo, se verificó una influencia importante de la atenuación en las medidas de ultrasonido realizadas sobre hormas de queso entero, por lo cual las medidas sólo resultaban adecuadas en muestras de 2 cm de largo (Benedito et al., 2006b). Esto convierte al ensayo en destructivo, debiéndose buscar alternativas que permitan la evaluación de muestras de queso sin cortar.

Benedito et al. (2006b) evaluaron la aplicación de una técnica de pulso – respuesta que consistió en golpear una horma de queso Manchego y evaluar la respuesta a dicha excitación a lo largo del proceso de maduración. La técnica resultó adecuada para la evaluación de los cambios en la textura de la superficie del queso, pero no dio

buenos resultados en la parte interna del queso.

La técnica de Elastografía por Retorno Temporal (TRE) se ha desarrollado en los últimos tres años en el Laboratorio de Acústica Ultrasonora del Instituto de Física, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (Brum et al., 2008; Catheline et al., 2008; Benech et al., 2009). La técnica de TRE fue concebida para la evaluación de las propiedades mecánicas de tejidos biológicos y ha sido utilizada en la evaluación de ternera en carne, control de temperatura en músculo esquelético y evaluación de textura en quesos. Consiste en la generación de una señal acústica mediante una excitación externa. Una vez adquirida esta señal, se reconstruye numéricamente el proceso de focalización espacio-temporal (Brum et al., 2008). El ancho a -6dB del pico de la focalización espacial en la reconstrucción del proceso de focalización permite evaluar la longitud de onda del pulso. La misma está relacionada con la elasticidad del medio, es decir, el ancho de focalización varía en función de su textura. Una ventaja que presenta esta técnica es que puede ser aplicada a una horma entera de queso sin necesidad de cortar muestras, por lo cual podría ser aplicada a la evaluación no destructiva de la textura de quesos. Además, es una técnica de bajo costo y fácil implementación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la aplicación de la técnica acústica de baja frecuencia Elastografía por Retorno Temporal (TRE) a la evaluación de la textura de distintos tipos de queso.

## Materiales y Métodos

### Muestras

Se evaluaron ocho muestras comerciales de queso de distintas características de textura: cuatro muestras de Cuartirolo, dos de

Colonia, un Danbo y un Magro. Las muestras, provenientes de empresas lácteas de los departamentos de Colonia y Montevideo, fueron adquiridas en supermercados de la ciudad de Montevideo y transportadas en empaques aislados térmicamente hasta el laboratorio donde se realizaron los ensayos.

### Elastografía por Retorno Temporal

El montaje experimental para las medidas de TRE se muestra en la Figura 1. El dispositivo consta de un martillo de punta de goma montado sobre un eje giratorio que golpea el queso de forma controlada. El golpe del martillo constituye la excitación externa del queso. La adquisición de la respuesta acústica de la muestra de queso a la excitación externa se logró a través de un arreglo de ocho sensores pasivos (Murata PKS1-4A) con un ancho de banda desde los 0.1 Hz hasta los 5 kHz. Este arreglo puede ser colocado en cualquier lugar sobre la superficie del queso. La señal acústica de los ocho sensores se digitalizó con una tarjeta adquisidora de ocho canales, National Instruments *NI USB-6009*, a una frecuencia de muestreo de 5 kHz. Utilizando la técnica de filtro inverso (Tanter et al., 2001), se trataron las señales acústicas para la recreación del proceso de refocalización temporal. Por medio de este proceso se obtuvo el ancho del pico a -6dB de la focalización espacial (ancho de focalización o amplitud).

### Análisis de Perfil de Textura

Se realizó un Análisis de Perfil de Textura utilizando un Analizador de Textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Godalming, UK). Para cada tipo de queso analizado se realizaron 10 ensayos. El ensayo consistió en la doble compresión de cubos de queso de 2 cm de arista. Las condiciones de ensayo fueron las siguientes: velocidad de pre-ensayo: 1 mm/s; velocidad de ensayo: 0,5 mm/s; velocidad de post-ensayo: 1 mm/s; porcentaje de compresión: 50 % (Benedito et al., 2006a). Utilizando los datos adquiridos mediante el software Texture Expert Exceed Version 1.0 (Stable Micro Systems, Godalming, UK), se calcularon para cada tipo de queso los parámetros dureza, rigidez, elasticidad y cohesividad, según Fox et al. (2000).

La dureza fue calculada como la fuerza máxima durante la primera compresión, la rigidez como el área bajo la curva de fuerza vs tiempo durante la primera compresión. La cohesividad se calculó como el cociente entre el área bajo la curva durante la segunda compresión y el área bajo la curva durante la primera compresión; mientras que la elasticidad se calculó como el cociente entre el tiempo necesario para alcanzar el máximo de fuerza durante la segunda compresión y el tiempo necesario para alcanzar el máximo de fuerza durante la primera compresión.

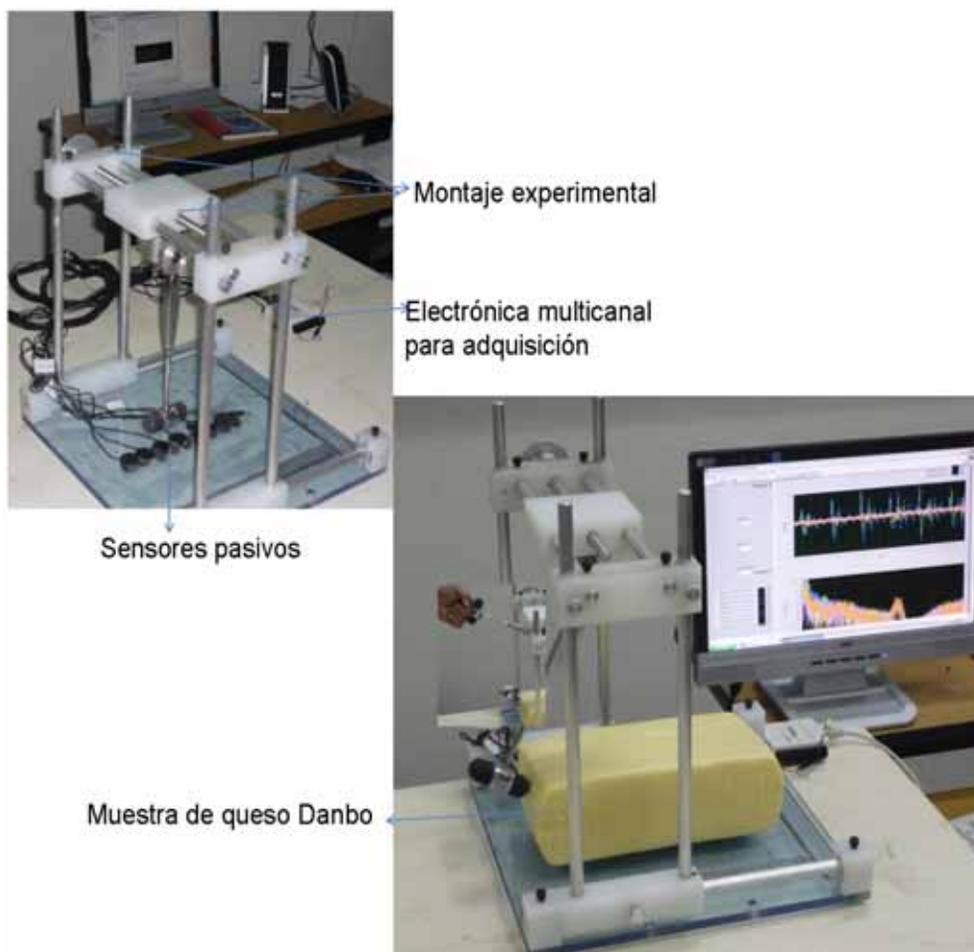


Figura 1. Montaje experimental para la experiencia de TRE.

**Análisis de datos**

• **Análisis de varianza (ANOVA)**

Se realizó un ANOVA con los parámetros de textura instrumental medidos por TPA, considerando el tipo de queso como variable independiente. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico Genstat Discovery Edition 2 (VSN International, Oxford, UK), calculando diferencias significativas por medio del test de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

• **Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS)**

Se realizó un PLS considerando el ancho de focalización como variable dependiente y los parámetros de textura instrumental como variables independientes. Este análisis busca explicar las variaciones en las medidas acústicas a través de las variaciones en las medidas de textura instrumental de los quesos. La técnica de regresión PLS es sumamente útil cuando se trabaja con un alto número de variables, las cuales pueden estar interrelacionadas (Martens & Martens, 1986). La regresión PLS se basa en encontrar un modelo de regresión lineal mediante la proyección de las variables dependientes e independientes consideradas en un nuevo espacio. Este nuevo espacio es creado considerando nuevas variables denominadas factores del PLS, los cuales son generados utilizando combinaciones lineales de las variables dependientes e independientes consideradas en el análisis.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software XL-Stat 2009 (Addinsoft, Inc., Brooklyn, NY, USA).

**Resultados y Discusión**

Los resultados de la técnica de TRE fueron comparados con los de la técnica de TPA para estudiar la aplicabilidad TRE a la evaluación de la textura de quesos. En primer lugar, se verificó que los quesos evaluados presentaron diferencias significativas en los parámetros de textura instrumental. Una vez confirmadas estas diferencias, se buscó una correlación entre los parámetros de textura instrumental y el ancho de focalización medido por TRE, utilizando el análisis estadístico de mínimos cuadrados parciales (PLS).

**ANOVA.** El ANOVA mostró que existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ) entre los distintos tipos de queso para los parámetros de textura instrumental, como se muestra en la Tabla 1. Estos resultados indican que los quesos evaluados presentaron diferencias significativas en sus características de textura.

Muestra	Dureza (N)	Rigidez (N.s)	Elasticidad	Cohesividad
1	5.9 <sup>a</sup>	45.5 <sup>a</sup>	0.57 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>
2	7.2 <sup>b</sup>	54.2 <sup>b</sup>	0.60 <sup>b</sup>	0.50 <sup>b</sup>
3	20.9 <sup>c</sup>	168.7 <sup>c</sup>	0.66 <sup>c</sup>	0.52 <sup>b</sup>
4	22.3 <sup>d</sup>	187.8 <sup>d</sup>	0.74 <sup>d</sup>	0.69 <sup>d</sup>
5	35.9 <sup>e</sup>	270.6 <sup>e</sup>	0.76 <sup>e</sup>	0.79 <sup>f</sup>
6	38.6 <sup>f</sup>	283.4 <sup>f</sup>	0.77 <sup>e</sup>	0.58 <sup>c</sup>
7	44.7 <sup>g</sup>	318.4 <sup>g</sup>	0.81 <sup>f</sup>	0.8 <sup>f</sup>
8	46.3 <sup>h</sup>	343.9 <sup>h</sup>	0.77 <sup>e</sup>	0.77 <sup>e</sup>

Tabla 1. Valores promedio de los parámetros de textura instrumental determinados para los ocho quesos evaluados.

Nota: Valores promedio dentro de una misma columna indican diferencias significativas de acuerdo al test de Tukey ( $p<0.05$ ).

**PLS.** Se realizó un PLS para estudiar la relación existente entre el ancho de focalización obtenido por TRE y los parámetros de textura determinados en el TPA. Los dos primeros factores del PLS explicaron el 98,6 % de la varianza de los datos de textura instrumental (variables independientes: X) y el 89,1 % de la varianza de los datos acústicos (variable dependiente: Y). Estos resultados indican que las variables

de textura instrumental y el ancho de focalización pueden representarse en el espacio determinado por los dos factores del PLS, sin perder una cantidad importante de información.

En el Gráfico 1 se representan las variables en los dos primeros factores del PLS. En éste, dos variables perfectamente correlacionadas entre sí estarán representadas por vectores con la misma dirección, mientras que dos variables que no estén correlacionadas estarán representadas por vectores perpendiculares. Como se observa en el Gráfico 1, los cuatro parámetros de textura instrumental estuvieron fuertemente correlacionados entre sí. En particular, la dureza y la rigidez de los quesos fueron los que presentaron la mayor correlación.

Además, se observa que el ancho de focalización se correlaciona positivamente en mayor medida con la dureza y la rigidez de las muestras. Este resultado sugiere que el ancho de focalización depende fuertemente de la textura de los quesos, en particular de los parámetros dureza y rigidez determinados a través del TPA. Debido a la existencia de una correlación positiva entre el ancho de focalización y la dureza y rigidez determinadas en el TPA, puede concluirse que el ancho de focalización determinado por TRE aumentó al aumentar la dureza y la rigidez de las muestras.

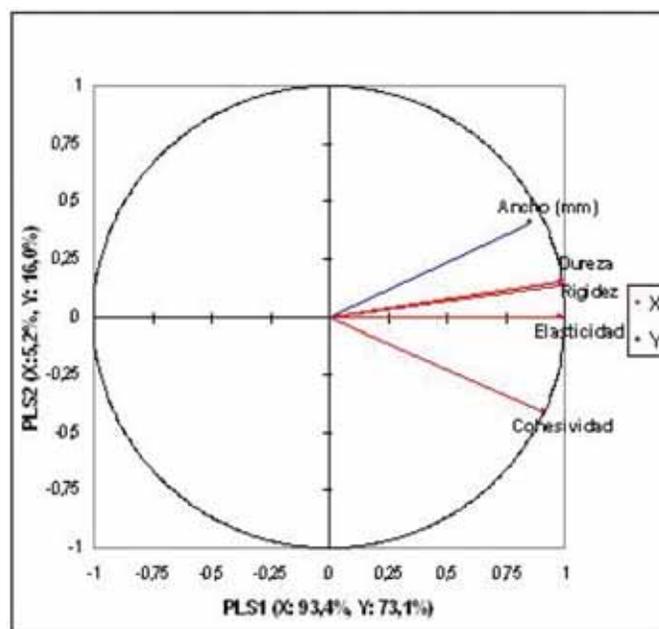


Gráfico 1. Representación de las variables de textura instrumental y acústicas de las muestras de queso evaluadas en los dos primeros factores del PLS.

La regresión PLS permitió obtener una ecuación con la cual puede predecirse el ancho de focalización a partir de una combinación lineal de parámetros de textura instrumental. La ecuación que se obtiene, que explica el 89,1 % de la variación de los datos, es la siguiente:

$$\text{Ancho de focalización (mm)} = 26,4 + 0,176 \cdot \text{Dureza} + 0,023 \cdot \text{Rigidez} + 16,67 \cdot \text{Elasticidad} - 19,98 \cdot \text{Cohesividad}$$

Los coeficientes de la ecuación con sus correspondientes intervalos de confianza se presentan en el Gráfico 2, donde se puede apreciar que la dureza y rigidez presentaron coeficientes significativamente positivos, lo cual indica que influyeron en los valores de ancho de focalización obtenidos. Es decir, este parámetro acústico dependió principalmente de estos dos parámetros de textura de los quesos. Sin embargo, la elasticidad y cohesividad no presentaron coeficientes significativos, lo que sugiere que no afectaron significativamente las medidas acústicas. Por lo tanto el ancho de focalización estuvo principalmente relacionado con la dureza y rigidez de los quesos.

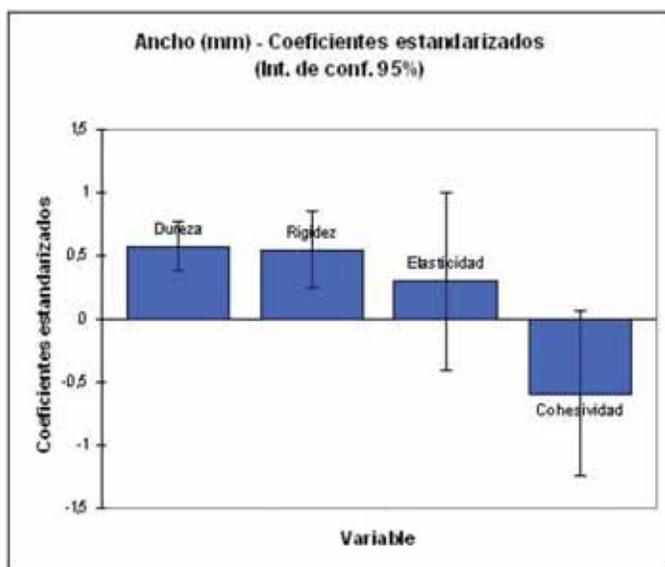


Gráfico 2. Coeficientes estandarizados en la regresión PLS de ancho de focalización en función de los valores de textura instrumental.

Considerando únicamente los parámetros que presentaron coeficientes significativos el modelo se reduce a la siguiente expresión:

$$\text{Ancho de focalización (mm)} = 26,4 + 0,176 \cdot \text{Dureza} + 0,023 \cdot \text{Rigidez}$$

Como se expresa en el Gráfico 3, los anchos predichos por el modelo fueron muy cercanos a los determinados experimentalmente para todos los quesos evaluados. Esto hace posible concluir que el ancho de focalización determinado por TRE permitió predecir la dureza y rigidez de las muestras de queso evaluadas.

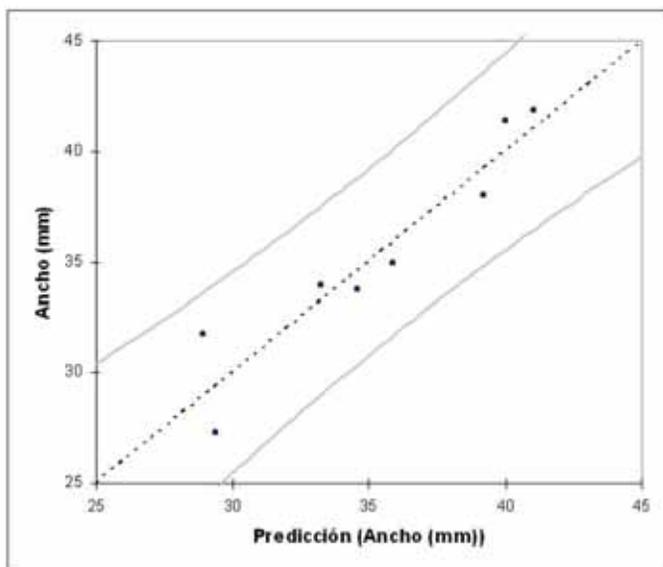


Gráfico 3. Valores de ancho de focalización de las ocho muestras de queso evaluadas en función de los valores predichos a partir de la regresión PLS de los valores de textura instrumental.

## Conclusiones

El método TRE permitió detectar diferencias en la textura de los quesos, reflejando principalmente sus características de dureza y rigidez. Esta técnica posee la ventaja de ser no destructiva, contrariamente a las técnicas que son utilizadas actualmente. Los resultados de este trabajo indican que dicho método resultaría adecuado para evaluar la textura de quesos de forma no destructiva. Se deberían medir otros tipos de quesos por el método TRE para poder confirmar la aplicabilidad de la técnica.

## Reconocimientos

La realización de estos ensayos fue posible gracias al apoyo del Ministerio de Educación y Cultura, a través del proyecto del Programa de Desarrollo Tecnológico PDT 34/09.

## Referencias

- BENECH, N.; CATHELIN, S.; BRUM, J.; GALLOT, T.; NEGREIRA, C. 1-D Elasticity assesment in soft solids from shear wave correlation: the time reversal approach. En: *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control*. 2009, 59(11):2400-2410.
- BENEDITO, J.; CÁRCEL, J.A.; CLEMENTE, G.; MULET, A. Cheese maturity assessment using ultrasonics. En: *Journal of Dairy Science*. 2000a, (83):248-254.
- BENEDITO, J.; CÁRCEL, J.A.; SANJUAN, N.; MULET, A. Use of ultrasound to assess cheese characteristics. En: *Ultrasonics*. 2000b, (38):727-730.
- BENEDITO, J.; CÁRCEL, J.A.; GONZALEZ, R.; MULET, A. Application of low intensity ultrasonics to cheese manufacturing processes. En: *Ultrasonics*. 2002, (40):19-23.
- BENEDITO, J.; SIMAL, S.; CLEMENTE, G.; MULET, A. Manchego cheese texture evaluation by ultrasonics and surface probes. En: *International Dairy Journal*. 2006a, (16):431-438.
- BENEDITO, J.; CONDE, T.; CLEMENTE, G.; MULET, A. Use of the acoustic impulse – response technique for the nondestructive assessment of Manchego cheese texture. En: *Journal of Dairy Science*. 2006b, (89):4490-4502.
- BRUM, J.; CATHELIN, S.; BENECH, N.; NEGREIRA, C. Shear elasticity estimation from surface wave: the time reversal approach. En: *Journal of the Acoustical Society of America*. 2008, 124(6):3377-3380.
- CATHELIN, S.; BENECH, N.; BRUM, J.; NEGREIRA, C. Time reversal of elastic waves in soft solids. En: *Physical Review Letters*. 2008, (100):064301-1-064301-4.
- FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000.
- MARTENS, M.; MARTENS, H. Partial least squares regression. En: PIGGOTT, J. R. *Statistical procedures in food research*. vol. 9. London: Elsevier Applied Science, 1986. pp. 293-359.
- TANTER, M.; AUBRY, J.F.; GERBER, J.; GERBER, J.; THOMAS, L.; FINK, M. Optimal focusing by spatio-temporal inverse filter I. Basic principles. En: *Journal of the Acoustical Society of America*. 2001, 110(1):37-43.

# Las arañas Mygalomorphae del Uruguay: clave para familias, géneros y especies

Montes de Oca, L.<sup>(1,2,3)</sup>, Pérez-Miles, F.<sup>(2,3)</sup>

Contacto: laumdeo@fcien.edu.uy

<sup>(1)</sup> Departamento de Medio Ambiente, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) - <sup>(2)</sup> Sección Entomología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República - <sup>(3)</sup> Laboratorio de Etología, Ecología y Evolución, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.

Recibido: 30/6/2009 – Aprobado: 3/11/2009

## Resumen

En este artículo se presenta una clave para el reconocimiento de familias, géneros y especies de arañas del infraorden Mygalomorphae encontradas en Uruguay. Asimismo, se indica por primera vez la presencia de cuatro especies de Mygalomorphae para el país. Adicionalmente se brinda información biológica sintética acerca de las familias presentes en Uruguay.

Palabras clave: Taxonomía, Chaco, Stenoterommata.

## Abstract

This paper includes a key for the recognition of families, genera and species of spiders of the infraorder Mygalomorphae found in Uruguay. The presence of four species is reported for the first time for the country. Additionally we give brief biological information about the families present in Uruguay.

Keywords: Taxonomy, Chaco, Stenoterommata.

## Introducción

El orden Araneae está compuesto por dos subórdenes, Mesothelae y Opisthothelae, este último subdividido en dos infraórdenes presentes en Uruguay: Araneomorphae y Mygalomorphae. Ambos grupos están filogenéticamente emparentados (grupos hermanos), por lo que el conocimiento de uno brinda datos comparativos importantes para dilucidar aspectos evolutivos del otro.

En Uruguay se ha indicado la presencia de 177 especies y 36 familias (Capocasale y Pereira, 2003), en su mayoría Araneomorphae. Recientemente, Benamú (2007) publicó una clave para la determinación de familias de Araneomorphae de Uruguay. Sin embargo, no existe clave para determinar las Mygalomorphae de Uruguay. El menor número de especies y nuestra continuidad en el estudio de este grupo nos permite presentar una clave a nivel de especies y una breve caracterización de las familias.

El desarrollo de los estudios de Mygalomorphae y el abordaje de muestreos en nuevas zonas en los últimos años, hace posible incrementar sensiblemente el número de especies indicadas para el país, por lo que se hace aquí una puesta a punto de la fauna de Mygalomorphae de Uruguay, indicando nuevos registros de cuatro especies.

## Materiales y Métodos

El presente trabajo está basado en el estudio de todo el material disponible de Mygalomorphae en la Colección Entomológica (Araneae) de la Facultad de Ciencias, Universidad de la República, y la Colección

Aracnológica del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología, Montevideo, Uruguay. Se consideró el material incorporado hasta junio de 2009. Se exceptuaron especies de *Grammostola* (Simón 1892) que no están representadas en colecciones nacionales. Las especies innominadas en esta clave son especies nuevas en proceso de descripción. Los criterios generales de clasificación y nomenclatura siguen a Platnick (2009). La taxonomía de Nemesiidae sigue los criterios de Goloboff (1995).

La clave está diseñada para ser utilizada con ejemplares adultos, debido a que los juveniles usualmente carecen de características fundamentales para la determinación específica, como por ejemplo, estructuras genitales desarrolladas. Algunos caracteres mencionados en la clave se explican en el glosario.

## Resultados

### Nuevos registros para Uruguay

*Chaco* sp. Rocha, Cabo Polonio.

*Stenoterommata palmar* Goloboff, 1995. Rivera, Valle del Lunarejo.

*Stenoterommata platensis* Goloboff, 1995. Río Negro, proximidades de Fray Bentos

*Stenoterommata tenuistyla* Goloboff, 1995. Río Negro, proximidades de Fray Bentos

**Clave de especies**

- 1.- Fóvea longitudinal (Figura 1), 6-8 mm,.....(Mecicobothriidae Holmberg, 1882)  
 ..... *Mecicobothrium thorelli* Holmberg, 1882  
 --- Fóvea transversal ..... 2
- 2.-Con escópulas densas (Figura 2)  
 y fascículos subungueales (Figura 3)  
 ..... (Theraphosidae Thorell, 1869)..... 3  
 --- Sin fascículos subungueales..... 12
- 3.- Labio sin cúspulas (Figura 4), ausencia de  
 setas urticantes en el  
 abdomen (12-15 mm)..... *Catumiri uruguayense* Guadanucci, 2004  
 --- Labio con cúspulas (Figura 5), setas  
 urticantes abdominales presentes..... 4
- 4.- Setas urticantes tipos I y III (Figuras 6 y 7) ..... 5  
 --- Setas urticantes tipos III y IV (Figuras 7 y 8) ..... 7
- 5.- Machos con órgano palpar como en Figura 9. Hembra  
 con las patas IV y el abdomen mucho más oscuro que  
 el cefalotórax y las patas anteriores y los palpos (25-30 mm).  
 Cuando son perturbadas elevan el  
 abdomen como maniobra defensiva (Figura 10) ..... *Eupalaestrus* spp ..... 6  
 --- Machos con el órgano palpar como en Figura 11.  
 Hembras con color uniforme (25-30 mm).  
 Cuando son perturbadas levantan las patas  
 anteriores y abren quelíceros como  
 maniobra defensiva (Figura 12) ..... *Acanthoscurria suina* Pocock, 1903
- 6.- Fémur III engrosado, habitan al  
 norte del Río Negro (Figura 13)..... *Eupalaestrus campestratus* (Simon, 1891)  
 --- Fémur III normal  
 habitan todo el país (Figura 9) ..... *Eupalaestrus weijenberghi* (Thorell, 1894)



Figura 1. Hembra de *Mecicobothrium thorelli*. Vista dorsal, fóvea longitudinal.



Figura 2. Escópula de metatarso y tarso en Theraphosidae.



Figura 3. Fascículo subungueal de Theraphosidae.



Figura 4. Área bucal de *Catumiri uruguayense*. Labio sin cúspulas.



Figura 5. Área bucal de *Plesiopelma longisternale*. Cúspulas maxilares y labiales.



Figura 6. Seta urticante tipo I



Figura 7. Seta urticante tipo III



Figura 8. Seta urticante tipo IV



Figura 9. Órgano palpar izquierdo de *Eupalaestrus weijemberghi*. Vista prolateral.



Figura 10. Hembra de *Eupalaestrus weijemberghi* levantando el abdomen en forma defensiva.



Figura 11. Órgano palpar izquierdo de *Acanthoscurria suina*. Vista prolateral.



Figura 12. Hembra de *Acanthoscurria suina* levantando patas anteriores en forma defensiva.



Figura 13. Hembra de *Eupalaestrus campestratus*.

7.- Grandes (adultos de 40 mm o más), con setas estridulatorias en coxa de la pata I.....	<i>Grammostola</i> spp .....	9
--- Adultos menores de 35 mm sin setas estridulatorias .....		8
8.- Machos con el órgano palpar como en Figura 14. Hembras oscuras con vellosidad roja en el abdomen, bandas de contraste en las articulaciones de las patas poco marcadas (Figura 15) .....	<i>Plesiopelma longisternale</i> (Schiapelli & Gerschman, 1942)	
--- Machos con el órgano palpar como en Figura 16. Hembras castañas con bandas de contraste en las articulaciones de las patas más o menos marcadas (Figura 17) .....	<i>Homoeomma uruguayense</i> (Mello-Leitão, 1946)	
9.- Machos y hembras oscuras .....		10
--- Machos y hembras con patas muy claras (Figura 18).....	<i>Grammostola andreletzi</i> Vol, 2008	
10.- Presentes en sierras y quebradas, tamaño grande (50 mm o más).....		11

--- Viven en cuevas tubulares en praderas, menores de 50 mm, setas abdominales con ápices muy claros (Figura 19)..... *Grammostola burzaquensis* Ibarra, 1946

11.- Setas urticantes localizadas en una mancha con forma de manzana y con brillos metálicos (Figura 20) sólo encontrada en Treinta y Tres ..... *Grammostola iheringi* (Keyserling, 1891)

--- Sin esa coloración (Figuras 21 y 22)..... *Grammostola mollicoma* (Ausserer, 1875)

12.- 8 ojos agrupados en un tubérculo (Figura 23) ..... 13

--- 8 ojos no agrupados en un tubérculo (Figura 24), viven en cuevas con tapa trampa ..... 21

13.- Cefalotórax con 3 bandas claras, abdomen con manchas claras (15 mm), patas muy espinosas (Figura 25)..... (Microstigmatidae Roewer, 1842) ..... *Xenonemesia platensis* Goloboff, 1989

--- Otro diseño ..... 14

14.- Tarsos IV con ITC..... (Nemesiidae Simon, 1889) ... *Stenoterommata* spp ..... 15

--- Tarsos IV sin ITC ..... otras Nemesiidae ..... 18

15.- Escópulas densas (Figura 26) en tarsos I-IV en machos y I-III en hembras. La escópula IV de las hembras es poco densa y lateralizada. Hembras con espermateca 2+2, receptáculo lateral trilobulado (Figura 27). Machos con el ducto del órgano palpar con constricción apical (Figura 28)..... *Stenoterommata platensis* Holmberg, 1881

--- La escópula de algunos tarsos puede ser: poco densa, incompleta (cubre sólo una parte apical) o estar ausente..... 16



Figura 14. Órgano palpar izquierdo de *Plesiopelma longisternale*. Vista prolateral.



Figura 15. Hembra de *Plesiopelma longisternale*.



Figura 16. Órgano palpar izquierdo de *Homoeomma uruguayense*. Vista prolateral.



Figura 17. Hembra de *Homoeomma uruguayense*.



Figura 18. Hembra de *Grammostola andreleetzi*.



Figura 19. Hembra de *Grammostola burzaquensis*.



Figura 20. Hembra de *Grammostola iheringhi*.



Figura 21. Hembra de *Grammostolla mollicoma*, forma sur.



Figura 22. Hembra de *Grammostolla mollicoma*, forma norte.



Figura 23. Área ocular de *Acanthogonatus tacuarensis*. Ojos agrupados en un tubérculo.



Figura 24. Área ocular de *Idiops clarus*. Ojos no agrupados en un tubérculo.



Figura 25. Hembra de *Xenonemesia platensis*. Vista dorsal.



Figura 26. Escópula de *Acanthogonatus tacuarensis*.

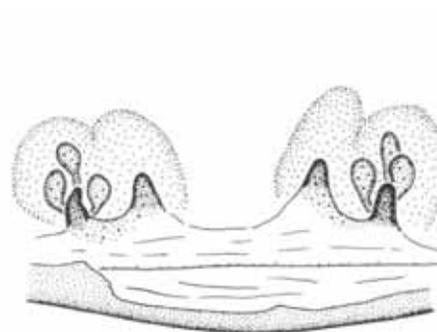


Figura 27. Espermoteca de *Stenoterommata platensis*. Vista ventral.

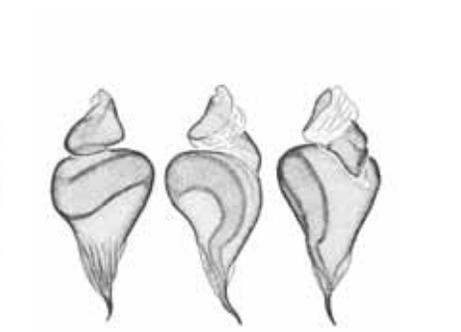


Figura 28. Órgano palpar izquierdo de *Stenotenommata platensis*. Vistas ventral, retrolateral y dorsal (de izquierda a derecha).

- 16.- Tarso I y II con escópula poco densa. Espermateca de hembras con múltiples receptáculos (Figura 29).  
Macho: tibia I con megaespinas retrolateral;  
órgano palpar como en Figura 30 ..... *Stenoterommata crassistyla* Goloboff, 1995  
--- Espermatecas y órgano palpar con morfología diferente ..... 17
17. - Tarsos III y IV sin escópula.  
Espermateca como en Figura 31. Los machos presentan numerosas espinas cortas en la parte ventral del metatarso I. Órgano palpar como en Figura 32 ..... *Stenoterommata tenuistyla* Goloboff, 1995  
--- Tarsos III y IV con escópula.  
Espermatecas como en Figura 33.  
Machos sin espinas cortas en la parte ventral del metatarso ..... *Stenoterommata palmar* Goloboff, 1995
- 18.- Machos con tibia I sin apófisis.  
Hembra con 3 espinas apicales en la patella IV, artejo apical de las hileras corto y redondeado ..... *Pycnothele spp* ..... 19  
--- Machos que presentan una apófisis en la tibia I ..... 20
- 19.- Machos con el ducto del órgano palpar fuertemente curvado en la región apical (Figura 34).  
Hembras con espermatecas con cuello espiralado (Figura 35) ..... *Pycnothele auronitens* (Keyserling, 1891)  
--- Machos con el ducto del órgano palpar suavemente curvado (Figura 36)  
Hembras con cámara supraespermatecal muy desarrollada (Figura 37) ..... *Pycnothele modesta* (Schiapelli & Gerschman, 1942)
20. - Machos con 3 espinas en la apófisis de la tibia I. Hembra con patela IV sin espinas, hileras con el artejo apical redondeado ..... *Chaco* sp.  
--- Machos con 2 espinas en la apófisis de la tibia I. Hileras con el artejo apical agudo ..... *Acanthogonatus tacuariensis* (Pérez-Miles & Capocasale, 1982)
- 21.- Dos ojos en el borde anterior y 6 más posteriores (Figura 24), colores claros. Cueva con una tapa fina de seda. (Idiopidae Simon, 1889) ..... *Idiops clarus* (Mello-Leitão, 1946)  
--- Ojos en dos filas (4-4) ..... 22
- 22.- Fóvea apenas curvada hacia atrás (Figura 38), tibia III con espinas que no forman una fila transversal. Tibia del palpo sin espinas dorsales ni engrosamiento ventral ..... *Neocteniza australis* Goloboff, 1987  
--- Fóvea curvada hacia delante (Figura 39), tibia III con una fila transversal de espinas ..... (Actinopodidae Simon, 1892) ..... 23
- 23.- Cuerpo y patas negras ..... *Actinopus liodon* (Ausserer, 1875)  
--- Metatarso y tarso de las patas y tibia del palpo rojos, resto de los apéndices negros (Figura 40) ..... *Actinopus longipalpis* C.L. Koch, 1842



Figura 29. Espermateca de *Stenotenommata crassistyla*. Vista dorsal.



Figura 30. Órgano palpar derecho de *Stenoterommata crassistyla*. Vista prolateral.



Figura 31. Espermateca de *Stenoterommata tenuistyla*. Vista dorsal.



Figura 32. Órgano palpar izquierdo de *Stenotenommata tenuistyla*. Vista prolateral.

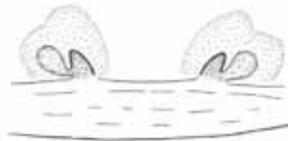


Figura 33. Espermateca de *Stenoterommata palmar*. Vista dorsal.



Figura 34. Órgano palpar derecho de *Pycnothele auronitens*. Vista prolateral.



Figura 35. Espermateca de *Pycnothele auronitens*. Vista ventral.



Figura 36. Órgano palpar derecho de *Pycnothele modesta*. Vista prolateral.



Figura 37. Espermateca de *Pycnothele modesta*. Vista ventral.



Figura 38. Macho de *Neocteniza australis*. Vista dorsal, cefalotórax.



Figura 39. Macho de *Actinopodidae*. Vista dorsal, cefalotórax.



Figura 40. Macho de *Actinopus longipalpis*.



Figura 41. Hembra de *Acanthogonatus tacuariensis*.



Figura 42. Hembra de *Stenoterommata platensis*.



Figura 43. Hembra de *Stenoterommata crassistyla*.

## Comentarios breves sobre las familias presentes en Uruguay

**ACTINOPODIDAE** (arañas albañiles negras; Figuras 39 y 40). Está representada por dos especies en Uruguay, *Actinopus liodon* y *Actinopus longipalpis*. También está indicada *Actinopus tarsalis*, pero el ejemplar tipo de esta especie procede del Noreste brasileño (Piauí) y probablemente se trata de una información errónea (Miglio, 2009). Son arañas con poca pilosidad, negras a marrón muy oscuro, en *A. longipalpis* los machos presentan los metatarsos y tarsos de las patas y las tibias de los palpos rojos. Las hembras viven en cuevas tubulares con tapa/trampa gruesa, la cual disimulan con material del lugar y usualmente pasa inadvertida. Cazan al acecho durante la noche. Los machos adultos son vagabundos y se caracterizan por tener los palpos extremadamente largos.

**IDIOPIDAE** (arañas albañiles marrones; Figuras 24 y 38). Hay dos géneros y dos especies indicadas para Uruguay, *Idiops clarus* y *Neocteniza australis*, esta última sólo conocida en Treinta y Tres. Son arañas con poca pilosidad y coloración castaño clara. Al igual que las Actinopodidae, viven en cuevas tubulares con tapa-trampa, pero, a diferencia de éstas, la tapa de las idiópidas es fina.

**MECICOBOTHRIIDAE** (Figura 1). Es una pequeña familia con tan sólo nueve especies en todo el mundo. Se distinguen de otras Mygalomorphae por poseer la fovea longitudinal. Son pequeñas (5-6 mm), de colores claros, tienen hileras largas y usualmente un par de placas dorsales en el abdomen. Construyen tubos de seda en lugares húmedos, en la costa de arroyos. Esta familia tiene una distribución curiosa, anfitropical, se encuentra en el hemisferio norte en la costa oeste de Estados Unidos y en el hemisferio sur en el Río de La Plata, donde está representada únicamente por *Mecicobothrium thorelli*. Esta especie está presente en Uruguay en Sierra de las Ánimas y en Argentina, en la Provincia de Buenos Aires (Tandil y Sierra de la Ventana).

**MICROSTIGMATIDAE** (Figura 25). Es una pequeña familia con 14 especies en todo el mundo, en Uruguay solo está representada por *Xenonemesia platensis*, encontrada en Lavalleja, en las nacientes del río Santa Lucía. Esta especie fue encontrada en trampas de caída, por lo que ignoramos su biología. La familia se caracteriza por los espiráculos pulmonares redondeados, en general incluye miganomorfos de pequeño tamaño.

**NEMESIIDAE** (Figuras 23, 26-37, 41-43). Está compuesta por 41 géneros y 342 especies en todo el mundo, ocho presentes en Uruguay. Son arañas de tamaño medio, delgadas y con muchas espinas. Viven en tubos de seda densa bajo piedras o en cuevas en el suelo con o sin tapa; cuando hay tapa, puede ser de tipo tapa-trampa. Debido a esta forma de vida, son arañas que suelen pasar inadvertidas, por ello posiblemente haya muchas especies aún no descritas.

**THERAPHOSIDAE** (tarántulas, arañas pollito; Figuras 2-22). Son la familia más diversa de Mygalomorphae, con más de 900 especies en el mundo y la mitad de ellas presentes en el Nuevo Mundo. Incluye las especies de arañas de mayor tamaño, que se caracterizan por su abundante pilosidad. En Uruguay se conocen una decena de especies que viven en cuevas o refugios debajo de piedras. Están presentes en todo el país, en áreas de praderas y sierras. Su ponzoña no es peligrosa para el hombre, pero algunas especies presentan setas urticantes en el dorso del abdomen, que al desprenderlas defensivamente con sus patas producen irritación al contacto con la piel o mucosas.

## Glosario

**Apófisis tibial.** Proyección prolateral o ventral, apical de la tibia de machos. Sirven para sujetar a las hembras durante la cópula.

**Cúspulas.** Pequeños gránulos en forma de globo, con diseño de huella digital si se observa con microscopía de barrido.

**Escópula.** Cepillo de setas cortas que se ubican ventralmente en los tarsos y metatarsos. Puede llegar a ser muy densa. La escópula es entera si las setas son homogéneas, o dividida, cuando hay una fila longitudinal de setas cónicas más largas.

**Espermateca.** Son estructuras internas de las hembras donde se almacena el esperma luego de la cópula. Se encuentran en el abdomen, ventralmente. Se comunican al exterior por una hendidura que puede observarse entre los pulmones.

**Hileras.** Apéndices tubulares ubicados en el extremo del abdomen. Están formadas por 1 a 3 artejos, es por ellas donde se secreta la seda.

*ITC*. Uña tarsal interna, según sus siglas en inglés. Es una tercer uña pequeña que se encuentra en el medio y debajo de las uñas tarsales mayores.

*Fóvea*. Depresión dorsal media en el cefalotórax, internamente se insertan músculos.

*Fascículo subungueal*. Penacho denso de setas ubicadas debajo de las uñas.

*Labio*. Esclerito ventral que se encuentra entre las coxas de los palpos.

*Setas*. Los mal llamados pelos de los artrópodos no son homólogos de los pelos de mamíferos, para distinguirlos se los denomina setas.

*Setas estridulatorias*. Son setas gruesas, ubicadas en artejos basales (coxa o trocánter), usualmente en la cara prolateral de la pata I y retrolateral del palpo. Con el movimiento de la pata podrían generar vibraciones. Su función aún no está claramente dilucidada.

*Setas urticantes*. Son setas especializadas muy pequeñas, ubicadas en la parte trasera dorsal del abdomen. Se utilizan como defensa. Por su forma, se clasifican en tipos I, III, IV y para reconocerlas se necesita de microscopio óptico.

*Órgano palpar*. Es el órgano copulador masculino. Se encuentra sobre el último artejo del palpo y es una estructura esclerificada donde se carga el esperma para luego introducirlo en las espermatecas de las hembras.

## Reconocimientos

Las Figuras 27 a 37 están reproducidas de Goloboff (1995) por cortesía de The American Museum of Natural History, New York, USA. La Figura 42 es cortesía de Álvaro Laborda. Agradecemos a Gonzalo Useta (Departamento de Medio Ambiente, LATU) y Fernando G. Costa (IIBCE) por su apoyo y estímulo para la publicación de la presente clave. A Carlos Perafán por la lectura crítica del manuscrito.

## Referencias

- BENAMÚ, M.A. Clave para la determinación de algunas familias de arañas (*Araneae, araneomorphae*) de Uruguay. En: *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*. 2007, 2ª. época, (16):1-19.
- CAPOCASALE, R.M.; PEREIRA, A. Diversidad de la biota uruguaya, Araneae. En: *Anales del Museo Nacional de Historia Natural y Antropología*. 2003, 2ª serie, 10(5):1-31.
- GOLOBOFF, P.A. A revision of the South American spiders of the family Nemesiidae (*Araneae, mygalomorphae*). Part I: Species from Peru, Chile, Argentina and Uruguay. En: *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1995, (224):1-189.
- MIGLIO, L.T. Taxonomía das espécies brasileiras de *Actinopus Perty, 1833 (Araneae, mygalomorphae, Actinopodidae)*. Belém: *Universidade Federal do Pará*, 2009. (Tesis de Maestría).
- PLATNICK, N. I. *The world spider catalog, version 9.5* [En línea]. New York: American Museum of Natural History, 2009. [Consulta: octubre, 2009]. Disponible en: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.



## ÍNDICE DE AUTORES

Ares, Gastón; 37  
Barrios, Sofía; 37  
Brum, Javier; 37  
Canetti, Rafael; 37  
Capra, Gustavo; 28  
Constantino, Pablo; 15  
Crosa, María José; 10, 22  
Duarte, Gabriel; 5  
Echenique, Ana; 28  
Escobar, Daniela; 33  
Fabretti, Juan Andrés; 15  
Harispe, Rodrigo; 22, 33  
Heijo, Gonzalo; 15  
Lema, Patricia; 37  
López, Ana; 5  
Lopretti, Mary; 5, 10  
Márquez, Rosa; 33  
Montes de Oca, Laura; 41  
Mussio, Paula; 22  
Negreira, Carlos; 37  
Noatsch, Ute; 19  
Pelaggio, Ronny; 22  
Pérez-Miles, Fernando; 41  
Repiso, Luis; 22, 28  
Rey, Fabiana; 10  
Robatto, Ofelia; 19  
Rudtsch, Steffen; 19  
Sala, Angelina; 33  
Santo, Claudia; 15  
Sica, Andrea; 15  
Silvera, Carlos; 22, 33  
Tomasso, Mauricio; 5  
Vázquez, Silvia; 10

# ÍNDICE TEMÁTICO

---

- A**  
Aceite vegetal; 15,16  
Ácido láctico; 10, 11, 12  
Ácidos grasos; 28, 30, 32  
Ácidos orgánicos; 11  
Alcohol; 5, 9  
Alimentación animal; 6, 11, 28  
Arañas; 41, 48  
Azúcares; 5 - 9  
Azúcares reductores; 5 - 9
- B**  
Bacterias lácticas; 10, 11, 22, 23  
Bacterias propiónicas; 22, 23, 26  
Biocombustibles; 5, 6  
Bioetanol; 5  
Biomasa; 10 - 13  
Bioprosesamiento; 6  
**Bioteología**; 5 - 14
- C**  
Calibración; 7, 8, 15 - 21  
Celdas; 19 - 21  
Cepa bacteriana; 11  
Clave; 19, 41  
Combustibles; 5, 6
- E**  
Elastografía por Retorno Temporal; 37, 38  
Elongación; 33 - 35
- Error; 15 - 17, 19, 21, 23  
Escala internacional de temperatura; 19, 20  
Etanol; 5, 6  
Evaluación no destructiva; 37  
Evaluación sensorial; 23, 26, 29, 31  
Evaporación; 15 - 18, 33, 34
- F**  
Fenólicos; 6  
Fermentación; 5, 6, 9, 11 - 13  
Forestal; 5  
FSS; 5, 7
- G**  
Glicerol; 11, 33 - 35  
Gravimetría; 15
- I**  
Impregnación en vacío; 22, 23, 25, 27  
Incertidumbre; 15 - 17, 21, 23, 26, 33  
Industria alimentaria; 10, 33, 37  
Industria láctea; 10  
Interlaboratorio; 19
- J**  
Jamón curado; 28 - 32
- L**  
Lactobacillus Paracasei HA9-2; 10, 11, 13  
Lactococcus; 22, 23, 26

Lignina; 5 - 8

Lignocelulósicos; 5, 6, 9

## **M**

Maduración; 22 - 27, 29, 30, 37

Medida de resistencia; 20, 21

Método de casting; 33 - 35

Método gravimétrico; 15, 34

**Metrología;** 15 - 21

Micro pipetas; 15, 16

Microorganismos ligninolíticos; 5

Módulo de Young; 33 - 35

Moldeo por compresión; 33 - 35

Mygalomorphae; 41, 48,

## **P**

Parámetros elásticos; 37

Pasturas; 28 - 32

Película comestible; 33

Películas biodegradables; 33

PH; 6 - 8, 10 - 13, 22 - 24, 27, 29, 30, 34

Plastificante; 33, 34

Porcinos; 28

Prebiótico; 10 - 13

Presacarificación; 5, 6, 8, 9

Probiótico; 10, 11, 13

Proteínas de suero lácteo; 33

Puntos fijos; 19 - 21

## **Q**

Queso; 10 - 13, 22 - 27, 37 - 40

Queso Colonia; 22, 23

## **R**

Ración; 11, 28 - 30

Residuos de la industria forestal; 5

Residuos lignocelulósicos; 5, 6

## **S**

Sacarificación enzimática; 5, 7 - 9

Sal; 22, 26, 29

Salado; 22, 23, 25, 27

Sorbato de potasio; 33 - 35

Stress; 33 - 35

Suero de queso; 10 - 14

## **T**

Taxonomía; 41

Técnicas acústicas; 37

**Tecnología alimentaria;** 22 - 36

Temperatura; 6, 10, 15, 16, 19 - 24, 29, 33 - 35, 37

Textura; 22, 26 - 30, 32, 37 - 40

## **U**

Ultrasonido; 37

Uruguay; 10, 11, 19, 20, 23, 28, 29, 41, 48





NRO. 15367

Swiss Association for Quality  
and Management Systems



ISO 9001:2000  
NRO. 15367

International  
Certification Network



Centro de Información Técnica  
Avda. Italia 6201 / Montevideo - Uruguay  
Tel.: (598 2) 601 37 24 int. 1364  
[ditec@latu.org.uy](mailto:ditec@latu.org.uy)  
[www.latu.org.uy](http://www.latu.org.uy)