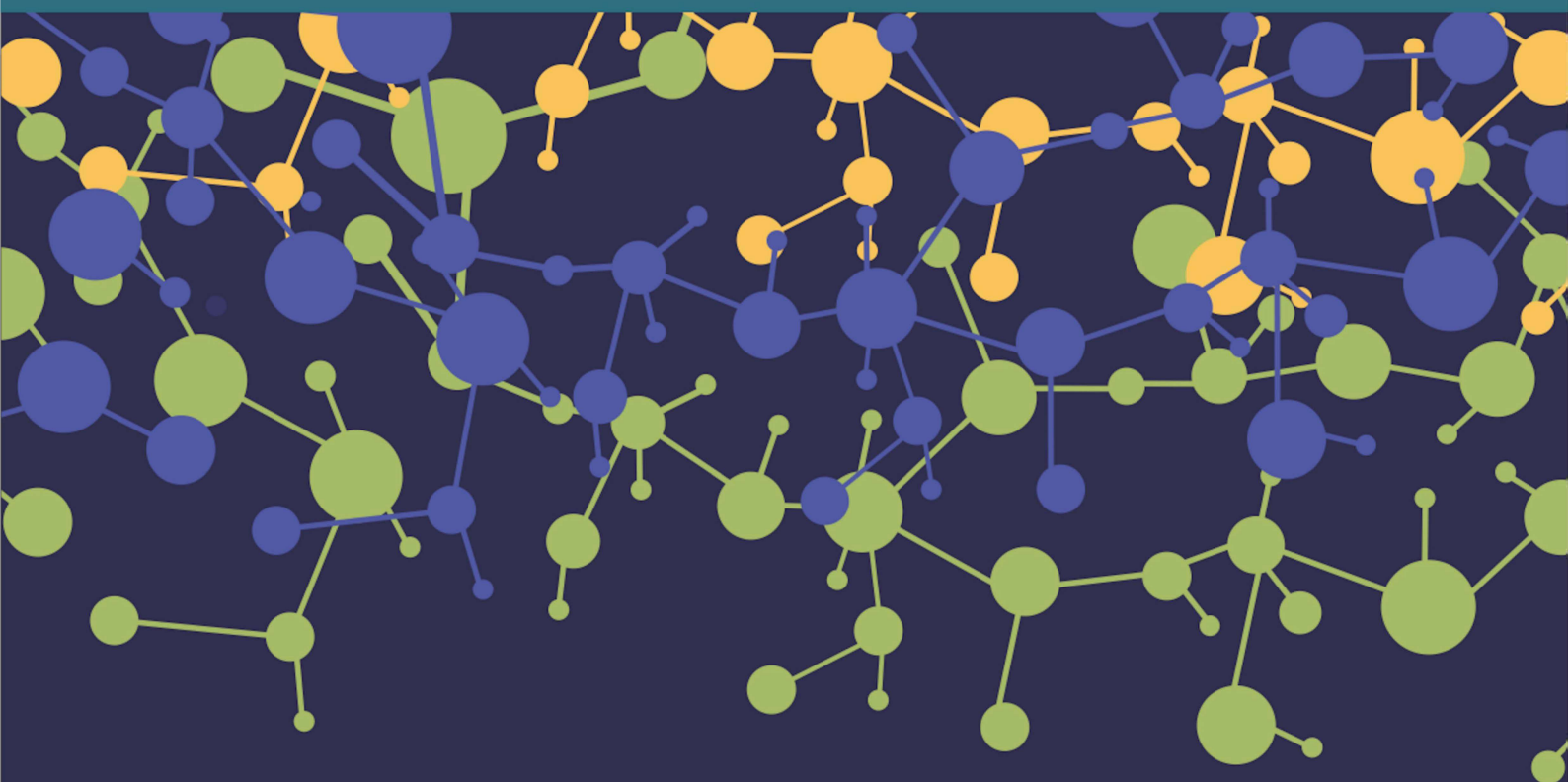


RevICAp

Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas

ISSN 2796-9444 / Vol. 2 Num. 1 - 2022



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE CIENCIAS
APLICADAS A LA INDUSTRIA
1

ÍNDICE

Vinificaciones orgánicas espontáneas del Sur Mendocino: parámetros enológicos y microbiológicos	1
Adaptación de ABP al desarrollo de la totalidad de los contenidos de un espacio curricular universitario: Caso Detectives de Alimentos	7
Calibración del proceso de molienda de maíz bajo el enfoque de modelado por elementos discretos	20
Cristalización isotérmica de poli(ϵ-caprolactona) en copolímeros en estrella y ramificados	30
Curvas de dispersión aplicadas a la propagación de ondas guiadas en estructuras de sección circular hueca.....	38
Síntesis, caracterización y evaluación de la remoción de Arsénico en matrices de quitosano con hierro.....	48
Geometría computacional y análisis biomecánico de una intervención endovascular en aneurismas cerebrales mediante láminas delgadas de Kirchoff-Love de espesor variable	54
Bacterias lácticas nativas de interés industrial aisladas a partir de arándanos frescos (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	62
Caracterización química de vinos Malbec y Cabernet franc provenientes de dos localidades de La Pampa (Argentina), en relación al grado de madurez de las uvas	70

Vinificaciones orgánicas espontáneas del Sur Mendocino: parámetros enológicos y microbiológicos

Spontaneous organic winemaking south of Mendoza: enological and microbiological parameters

Bruno Thomas Álvarez¹, Elisa Sepúlveda¹, Sergio Adrián Sini¹, Raúl Chernikoff¹, Néstor Alonso^{1,2}, Marcela Johana Villalón Olivares², Cecilia Adriana Flores¹, María Silvina Cabeza^{1,3}

1. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael (5600), Mendoza, Argentina.
2. Solandes S.A, Iriarte S/N, Villa Atuel (5622), Mendoza, Argentina.
3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (C1425FQB), Buenos Aires, Argentina.

E-mail: mscabeza@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

El vino orgánico está en auge impulsado porque la población reconoce que distintas prácticas agrícolas influyen en el medio ambiente; y la pandemia actual que generó en los consumidores preocupación por mejorar su salud, eligiendo alimentos saludables sin sustancias nocivas para la salud. Es extensamente conocida la influencia de la microbiota – variable según numerosos factores: ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, prácticas vitícolas, variedad e integridad de la uva, entre otros – sobre las características organolépticas finales del vino. En uvas orgánicas, se ha demostrado una baja biodiversidad como consecuencia de tratamientos antifúngicos permitidos (cobre y azufre). Se presenta el estudio de los parámetros enológicos – según metodología INV – y microbiológicos – recuento en cámara y células viables en placa – de vinos orgánicos del sur de Mendoza (Malbec y Cabernet Sauvignon) elaborados mediante fermentación espontánea. Se analizó la evolución de la vinificación espontánea por pérdida de peso y temperatura de fermentación. La fermentación presentó demora en el inicio, la velocidad máxima de fermentación se alcanzó el día 4-5, con mayor velocidad fermentativa en Malbec. Se completó la fermentación entre 14 y 17 días, restando menos de 4 g/L de azúcares reductores. Los parámetros enológicos se mantuvieron por debajo de los límites permitidos por el INV. No se pudieron recuperar levaduras ya que no resistieron el tiempo de congelación de las muestras hasta su evaluación, aunque si sobrevivieron bacterias (mayormente bacilos y algunos cocos). Se concluye que vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria logran completar la fermentación, alcanzando grado alcohólico elevado y sin alteraciones organolépticas en los mismos.

Palabras clave: vinos orgánicos, vinificación espontánea, microbiota vinica

Abstract

Organic wine is booming, driven because the population recognizes that different agricultural practices influence the environment; and the current pandemic that generated in consumers concern about improving their health, choosing healthy foods without substances harmful to health. The influence of the microbiota – variable according to numerous factors: geographical location of the vineyard, climatic conditions, viticultural practices, variety and integrity of the grape, among others – on the final organoleptic characteristics of the wine is widely known. In organic grapes, low biodiversity has been shown as a consequence of permitted antifungal treatments (copper and sulfur). The study of the oenological parameters – according to INV methodology – and microbiological – cell count and viable cells on plate – of organic wines from southern Mendoza (Malbec and Cabernet Sauvignon) made by spontaneous fermentation are presented. The evolution of spontaneous vinification was analyzed by weight loss and fermentation temperature. The fermentation was delayed at the beginning, the maximum fermentation speed was reached on day 4-5, with the highest fermentation speed in Malbec. Fermentation was completed between 14 and 17 days, with less than 4 g / L of reducing sugars remaining. The oenological parameters were kept below the limits allowed by the INV. Yeasts could not be recovered since they did not withstand the freezing time of the samples until their evaluation, although bacteria survived (mostly bacilli and some cocci). It is concluded that wines made spontaneously

from organic grapes in good phytosanitary condition manage to complete the fermentation, reaching a high alcoholic degree and without organoleptic alterations in them.

Keywords: organic wine, spontaneous winemaking, wine microbiome

1. Introducción

La producción y venta de vino orgánico en todo el mundo ha mostrado una tendencia positiva considerable. Es el producto de tendencia en la industria de bebidas, específicamente en los países bebedores de vino, incluidos Francia, Italia, Australia y Argentina. El pronóstico del mercado global de vino orgánico indica una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 10,6% para un período 2021-2027. La epidemia de COVID-19 tuvo un efecto bastante positivo en el mercado del vino orgánico. La propagación de COVID-19 impulsó la conciencia sobre un estilo de vida saludable que incluye ejercicio físico, una dieta saludable y el cuidado personal entre las personas. Además, la demanda de alimentos y bebidas nutritivos aumentó entre los consumidores para fortalecer su inmunidad. Se cree que los productos químicos artificiales utilizados en alimentos y bebidas tienen efectos negativos sobre la salud. Por lo tanto, los consumidores evitaron los alimentos con productos químicos sintéticos. Muchos consumidores recurrieron a alimentos y bebidas orgánicos debido a la percepción de sus ventajas sobre los productos tradicionales. Además, muchos gobiernos de todo el mundo ofrecieron estímulos monetarios para el sector agrícola durante la pandemia. Esto, a su vez, alentó a los agricultores a cultivar uvas orgánicas, impulsando el mercado del vino orgánico. Por otra parte, varios restaurantes y cafés ofrecen ahora productos orgánicos, aumentando la demanda (Infinium Global Research, 2021).

El área de cultivo de uva orgánica en el mundo aumentó de 87.655 ha en 2004 a 403.047 ha en 2017 (Willer y Lernoud, 2019). Al mismo tiempo, el consumo mundial de vino orgánico aumentó en un 48,3% durante el período de 2012 a 2017 (IWSR, 2018). Los países con el mayor consumo mundial de vino orgánico son Alemania (con una participación del 23,9%), Francia (16,4%) y el Reino Unido (10,2%). Italia ocupa una posición inferior en este ranking con una participación del 2,4%.

Durante 2020, hubo un incremento del 24% de las exportaciones de vinos orgánicos argentinos (SENASA, 2021).

El término vino orgánico no significa lo mismo que elaborado con uvas orgánicas. Para comercializar un vino orgánico hace falta certificar además del cultivo de la uva, el proceso de vinificación. Hay límites en el uso y contenido de anhídrido sulfuroso y en

muchos casos se exige utilizar levaduras autóctonas en vinificación. El uso de productos enológicos está también regulado (Pino Torres, 2013).

La calidad del vino se ve influenciada por las levaduras, que además de transformar el azúcar en alcohol etílico durante la fermentación son las responsables de otorgar al vino características tales como cuerpo, viscosidad, color, flavor y el perfil aromático, entre otros. Se ha estudiado ampliamente que la variedad y proporción de diferentes levaduras en las bayas de uva y en los mostos depende de muchos factores como son ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, variedad de uva, tecnología de vinificación e integridad de la uva (Tofalo et al., 2011).

Diferentes estudios han demostrado la baja biodiversidad de levaduras y organismos tipo levadura presentes en los viñedos orgánicos es consecuencia de los tratamientos antifúngicos permitidos a base de cobre y azufre (Grangeteau et al., 2017). Sin embargo, los microorganismos nativos están mejor adaptados a las condiciones químico-ambientales de la uva/mosto del área de proveniencia, por lo que son capaces de dar características distintivas a los vinos (Capozzi et al., 2015). Por otra parte, la microflora nativa también puede jugar un rol de detrimento por acumulación de compuestos indeseables o formación de velo en la interfase líquido-aire. Las técnicas de vinificación también influyen en la aparición de levaduras de deterioro, especialmente en los vinos orgánicos, donde algunas legislaciones establecen usos estrictamente regulados de aditivos y adyuvantes (Perpetuini et al., 2020).

A pesar del dominio de cepas de *S. cerevisiae* durante la vinificación, en las fermentaciones espontáneas se desarrollan típicamente levaduras no-*Saccharomyces* durante la vinificación, lo que implica una diversidad de levaduras más alta, un incremento del aroma, determinándose perfiles de flavor diferentes a los vinos convencionales por la síntesis de metabolitos de interés. Sin embargo, un crecimiento excesivo, incontrolado o por parte de determinadas cepas de estas especies no-*Saccharomyces*, puede suponer claramente una alteración del vino y la producción de aromas desagradables como excesiva producción de acidez volátil (Guillamón, 2016).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad enológica y la biodiversidad de microorganismos de

vinos orgánicos elaborados por fermentación espontánea.

2. Materiales y métodos

Uvas y fermentación espontánea

Las uvas tintas empleadas en este estudio fueron cosechadas en 2019 de viñedos orgánicos certificados desde 2010 por la Organización Internacional Agropecuaria (OIA), pertenecientes a la empresa Solandes S.A., ubicados en Villa Atuel, San Rafael, al sur de la provincia vitivinícola de Mendoza, Argentina. Estos viñedos cumplen los estándares de la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM). Las variedades elegidas fueron: Malbec y Cabernet Sauvignon.

Se molió la uva en la bodega, se adicionó nutriente complejo (100% componentes naturales derivados de levadura) y metabisulfito de potasio (12 mg/L). Se prosiguió con la fermentación espontánea, en tanques de 20 L, en la Bodega Solandes S.A., dedicada a producir vinos orgánicos (certificada bajo Norma Orgánica Argentina / Unión Europea + IFOAM (NOA), National Organic Program (NOP), Japanese Agricultural Standard (JAS) y Canada Organic), según sus protocolos de vinificación. Se realizaron 3 ensayos en paralelo para cada variedad.

Se estudió la evolución de la fermentación por pérdida de peso diaria, controlándose a su vez, la temperatura.

En vino terminado, se estudiaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: densidad, alcohol, extracto seco, azúcares reductores, acidez total y volátil y SO₂ total, según metodología oficial del INV. Todas las mediciones fueron tomadas por triplicado.

Para el ensayo microbiológico, se tomaron muestras todos los días durante la fermentación, y se congelaron para ser analizadas en conjunto posteriormente. Se utilizó el método de extensión en placa en agar YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 2% agar) para el recuento de células viables en placa y cámara de Neubauer y azul de metileno para distinguir las levaduras muertas con microscopio (aumento: 400 x) para el recuento directo de levaduras vivas.

Los datos se analizaron estadísticamente para determinar si existen diferencias significativas entre las variedades (ANOVA).

3. Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra los tanques en donde se realizaron las fermentaciones espontáneas, cuya evolución fue medida por diferencia de peso provocado por la pérdida de CO₂, producto de la fermentación alcohólica.



Figura 1. Tanques de fermentación espontánea de uvas orgánicas, variedad Cabernet Sauvignon.

Como se puede observar en la Figura 2, las fermentaciones espontáneas se extendieron 14 y 17 días, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. La velocidad máxima de fermentación se observó al día 4 en el caso de Malbec y 5 en Cabernet Sauvignon, siendo un 50% mayor para Malbec. Sin embargo, la velocidad de fermentación en Cabernet Sauvignon fue más sostenida.

Al ser una fermentación espontánea, no se inocularon levaduras, y por ello es notable el comienzo retrasado de la fermentación (Figura 2), presentando una mayor fase de latencia de las levaduras fermentativas, donde no se evidenció prácticamente diferencia de peso por pérdida de CO₂.

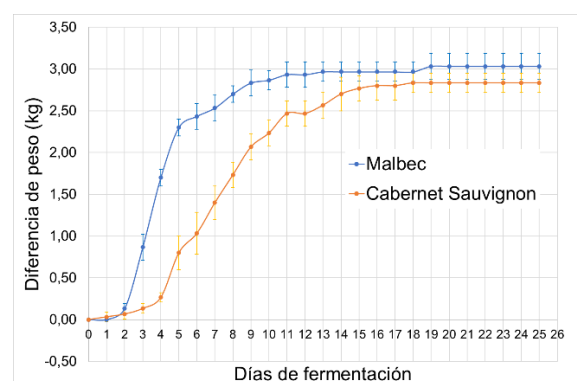


Figura 2. Evolución de la fermentación espontánea de uvas orgánicas.

Las temperaturas de fermentación variaron entre 17 y 18°C de mínima, y 24°C y 23,5°C de máxima, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente.

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos obtenidos (Tabla 1), ambas variedades pudieron

completar la vinificación, obteniendo vinos secos (con azúcares reductores residuales inferiores a 4 g/L), partiendo de 24,8 y 25°Bx, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. Se alcanzó un grado alcohólico proporcional a los azúcares iniciales, lo que indica que no se produjeron desviaciones durante la fermentación alcohólica.

El extracto seco determinado en ambos varietales es alto, con valores similares a los encontrados en vinos elaborados con producción orgánica de los Valles Calchaquíes de Salta, Argentina (Pérez et al., 2015).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de vinos orgánicos.

Parámetro	Malbec	Cabernet Sauvignon
Densidad (g/L, 20°C)	0,9943 ± 0,0002 ^a	0,9957 ± 0,0003 ^b
Alcohol (% vol, 20°C)	14,7 ± 0,1 ^a	14,8 ± 0,2 ^a
Extracto seco (g/L)	33,8 ± 0,2 ^a	37,5 ± 0,1 ^b
Azúcares reductores (g/L)	3,05 ± 0,09 ^a	1,7 ± 0,05 ^b
Acidez total, en ácido tartárico (g/L)	4,5 ± 0,16 ^a	5,3 ± 0,1 ^b
Acidez volátil, en ácido acético (g/L)	0,65 ± 0,03 ^a	0,79 ± 0,03 ^b
SO ₂ total (mg/L)	30 ± 0,5 ^a	30 ± 0,3 ^a

^{a, b} – letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos en las filas ($p < 0,05$).

El ácido acético tiene un impacto negativo en la performance fermentativa, es inductor fisiológico de la apoptosis de *S. cerevisiae* y afecta la calidad de ciertos tipos de vino cuando se encuentra presente en un nivel dado. Este ácido puede tener diversos orígenes en el vino. Puede provenir del mosto: bacterias acéticas (*Gluconobacter* y *Acetobacter*) especialmente en uvas afectadas con hongos; bacterias ácido lácticas, particularmente en uvas maltratadas pueden crecer rápidamente *Lactobacillus*; y levaduras contaminantes como *Hansenula*, en uvas sin sulfitar o mosto no inoculado. Durante la fermentación alcohólica: algunas bacterias acéticas pueden sobrevivir y causar daño; algunos *Oenococcus* pueden producirlo incluso con pequeña cantidad de azúcares residuales; *S. cerevisiae* produce 0,1-0,3 g/L en uvas sanas con concentración moderada de azúcar (<220 g/L), algunas cepas producen más de 1 g/L, y se conoce que desvía su metabolismo hacia mayor generación ante condiciones de estrés; levaduras de deterioro como *Pichia anomala*, *Candida krusei*, *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*/*Kloeckera apiculata*, *Saccharomycodes ludwigii* producen altos niveles de acético antes y durante el inicio de la fermentación. En la fermentación maloláctica también se puede incrementar la acidez volátil. Ya en la etapa de vino,

se puede generar un aumento sustancial de ácido acético por bacterias acéticas (*A. pastorianus*), bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*) y *Dekkera/Brettanomyces* (Vilela-Moura et al., 2011). En este estudio, la acidez volátil se mantuvo en valores inferiores a lo permitido por el INV (0,80 g/l en ácido acético, vinos tintos para la libre circulación). Podría relacionarse la mayor concentración presente en Cabernet Sauvignon con la demora en el inicio de la fermentación, dando lugar a la posible acción de microorganismos de deterioro hasta la aparición de las levaduras fermentativas y el correspondiente ambiente alcohólico.

El SO₂ total fue ajustado a 30 mg/L finales, según protocolo de vinificación de la empresa para sus vinos orgánicos.

Para determinar la microbiota presente en el mosto/vino orgánico y realizar el recuento de células viables se analizaron las muestras diarias congeladas. Lamentablemente, por la epidemia de COVID-19, las muestras permanecieron congeladas por un largo período (18 meses), lo que provocó que las levaduras que estaban presentes en los mostos-vinos murieran, visualizadas en color azul en la cámara de recuento (Figura 3). En total concordancia con lo observado microscópicamente, no se obtuvo crecimiento de levaduras en las placas de recuento de células viables. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4, algunas bacterias permanecieron viables, gracias a la baja dosificación de SO₂.

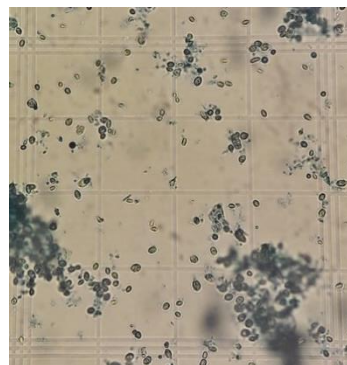


Figura 3. Recuento en cámara de Neubauer, muestra teñida con azul de metileno.



Figura 4. Recuento de células viables: Día 5 de fermentación, Malbec Orgánico, Dilución 10^{-1} , YEPD.

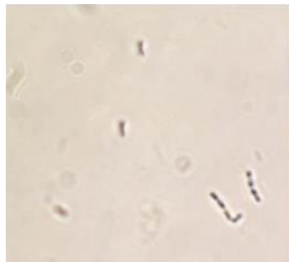
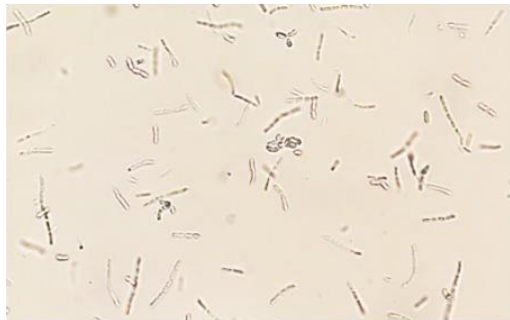
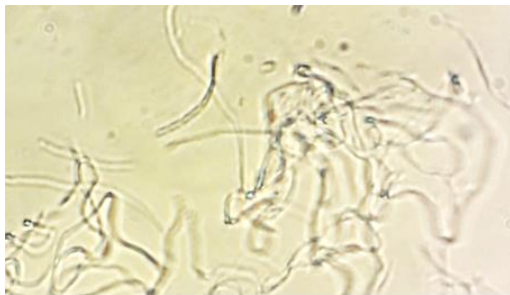


Figura 5. Observación microscópica de microorganismos vínicos: a) y b) Bacilos en cadena; c) cocos en cadena; d) cocos en pares, tétradas y agrupaciones.

Por microscopía, se pudo determinar la presencia de bacilos (Fig. 5) móviles y no móviles, algunos en cadena y en otros casos aislados, de diferente tamaño (largo y ancho). También se encontraron muy pocos cocos o coco-bacilos en cadena o en tétradas.

4. Conclusiones

Los vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria lograron completar la fermentación, alcanzando un grado alcohólico elevado y no detectándose alteraciones organolépticas en los mismos. Todos los parámetros enológicos se encontraron por debajo de los límites establecidos por el INV.

La duración de la fermentación fue más prolongada en comparación con una fermentación inoculada (datos no mostrados), ya que la fase de latencia se extendió y la velocidad de fermentación no es tan elevada.

No se pudieron rescatar las levaduras nativas a partir de las muestras congeladas, posiblemente debido al tiempo que transcurrió entre la toma de las mismas hasta el análisis microbiológico.

Se propone retomar el estudio en una nueva cosecha, a fin de seleccionar levaduras de interés para su estudio enológico y posibilitar una futura inoculación de vinos orgánicos con microorganismos autóctonos adaptados a las condiciones propias de estas uvas.

5. Referencias

Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., and Spano, G. (2015). *Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine*. *Microbiol Research*, 181, 75-83.

Grangeteau, C., David, V., Hervé, A., Guilloux-Benatier, M., and Rousseaux, S. (2017). *The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards*. *FEMS Yeast Research*, 17(8).

Guillamón, J. M. (2016). *Diversidad microbiana y alteraciones durante la fermentación alcohólica: el yin y el yang para el enólogo*, ACE: Revista de enología, 154.

Infinium Global Research (2021). *Organic Wine Market: Global Industry Analysis, Trends, Market Size, and Forecasts up to 2027*. <https://www.infiniumglobalresearch.com/food->

[beverage/global-organic-wine-market](#). Acceso: 8/12/2021.

IWSR (2018). *The global organic wine market 2012-22*.

[https://www.vinavisen.dk/vinavisen/website.nsf/pages/IWSR.pdf/\\$file/IWSR.pdf](https://www.vinavisen.dk/vinavisen/website.nsf/pages/IWSR.pdf/$file/IWSR.pdf). Acceso: 8/12/2021.

Pérez, N., Di Carlo, B., Salomón, R., Moyano, F., Peñaranda, S.S., y Zerpa, G. (2015). *Caracterización físico-química de vinos tintos regionales*. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bs. As., Argentina.

Perpetuini, G., Tittarelli, F., Battistelli, N., Suzzi, G., and Tofalo, R. (2020). *Contribution of Pichia manshurica strains to aroma profile of organic wines*. European Food Research Technology, 246(7), 1405-1417.

Pino Torres, C.A. (2013). *Manual de Vitivinicultura Orgánica*. Trama Impresores S.A., Curicó, Región Del Maule, Chile.

SENASA (2021). *Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2020*. https://www.argentina.gob.ar/sites/default/file/1_situ

[acion_de_la_po_en_la_argentina_ano_2020_0.pdf](#)
Acceso: 09/12/2021.

Tofalo, R.; Schirone, M.; Telera, G.C.; Manetta, A.C.; Corsetti, A.; Suzzi, G. (2011). *Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations.*, Ann Microbiol. 61, 57-66.

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J., & Côrte-Real, M. (2011). *The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines*. Applied microbiology and biotechnology, 89(2), 271–280.

Willer, H.; Lernoud, J. (eds) (2019). *The world of organic agriculture. Statics and emerging trends 2019*. Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick and IFOAM-Organics International, Bonn.

Adaptación de ABP al desarrollo de la totalidad de los contenidos de un espacio curricular universitario: Caso Detectives de Alimentos

Adaptation of PBL to the development of total contents of a university curricular space: Food Detective Case

María Esther Balanza¹, María Eugenia Santibáñez¹, Cecilia Adriana Flores¹

1. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael (5600), Mendoza, Argentina.

E-mail: mbalanza@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

Siendo el ABP un eficaz método de aprendizaje de temas complejos basado en el principio de usar problemas como punto de partida para la adquisición de nuevos conocimientos se propone adaptar la metodología y enfoque del ABP para utilizarlo como método de abordaje de la totalidad de los contenidos curriculares de Análisis de Alimentos, desarrollando los mismos en los tiempos asignados para el cursado y evaluar el impacto de dicha metodología en el aprendizaje de los alumnos. Los contenidos curriculares se seleccionaron y reagruparon para ser abordados en nueve problemas o "Casos" a ser resueltos por los "Aspirantes a Detectives de Alimentos" en las catorce semanas de cursado. A cada Caso se le asignó un nombre creativo y motivador y se elaboró el material de guía con la introducción y datos para la resolución del mismo y actividades tanto de recuperación de saberes previos como para el estudio y aplicación de los nuevos contenidos mediante trabajo en grupo, con indicación de los recursos disponibles para ello, incluyendo las clases expositivas. El impacto, medido como percepción de los alumnos mediante una encuesta, resultó muy alto y positivo, destacándose la valoración al hecho de haber trabajado sobre alimentos de uso cotidiano.

Palabras clave: Aprendizaje Basado en Problemas, Análisis de Alimentos, Aprendizaje Significativo, Detectives de Alimentos.

Abstract

Since PBL is an effective method of learning complex subjects based on the principle of using problems as a starting point for the acquisition of new knowledge, it is proposed to adapt the methodology and approach of PBL to use it as a method of approaching all the curricular contents of Food Analysis, developing them in the time allotted for the course and to evaluate the impact of this methodology on the students' learning. The curricular contents were selected and regrouped to be addressed in nine problems or "Cases" to be solved by the "Aspiring Food Detectives" during the fourteen weeks of the course. Each case was given a creative and motivating name and a guide material was prepared with an introduction and data for its resolution and activities both for the recovery of previous knowledge and for the study and application of the new contents through group work, with indication of the resources available for this purpose, including the expository classes. The impact, measured as students' perception by means of a survey, was very high and positive, highlighting the valuation of the fact of having worked on foods of daily use.

Keywords: Problem – Based Learning, Food Analysis, Significant Learning, Food Detectives.

1. Introducción

“Si tuviese que reducir toda la psicología educativa a un solo principio, enunciaría este: de todos los factores que influyen en el aprendizaje, el más importante consiste en lo que el alumno ya sabe. Averíguese esto y enséñese consecuentemente” señalaba Ausubel (1980) planteando que la significatividad del aprendizaje se logra cuando la

nueva información a incorporar pone en movimiento y relación conceptos ya existentes en la mente del que aprende, es decir, conceptos inclusivos o inclusores. Y menciona que para este tipo de aprendizaje debe existir lo que denomina “actitud para el aprendizaje significativo”, que se trata de una disposición por parte del aprendiz para relacionar una tarea de aprendizaje sustancial y no arbitraria, con los aspectos relevantes de su propia estructura cognitiva. También indica que la resolución de problemas es la

forma de actividad o pensamiento dirigido en los que, tanto la representación cognoscitiva de la experiencia previa como los componentes de una situación problemática actual, son reorganizados, transformados o recombinados para lograr un objetivo diseñado; involucra la generación de estrategias que trasciende la mera aplicación de principios.

También Baquero (2002) señala que para que el alumno pueda construir su conocimiento necesita de una motivación por el aprendizaje relacionada con la búsqueda activa y genuina de comprensión, al acceso a fuentes múltiples de información y a formas de interacción también múltiples. Esto conlleva a que la forma de enseñanza debe presentar características ligadas a la necesidad de producir novedad, esto es, que los resultados de la experiencia educativa no sean predecibles de antemano. Por ello, utilizar como objetos de estudio elementos con los que el alumno se encuentra familiarizado, puede resultar motivador.

Muchas veces los contenidos que se trabajan en clase son ajenos a la realidad e intereses de los estudiantes, lo que dificulta un aprendizaje significativo por parte del estudiantado que, al no estar motivado, aprende para obtener una calificación el día del examen y no para su vida. Por ello, la metodología de enseñanza-aprendizaje debería basarse en un enfoque de aprendizaje constructivista que implique a su vez significatividad en los estudiantes. Al trabajar con el ABP la actividad gira en torno a la discusión de un problema y el aprendizaje significativo se adquiere de la experiencia de trabajar sobre ese problema. Este método estimula el autoaprendizaje y la práctica del estudiante al enfrentarlo a situaciones reales y al identificar sus deficiencias de conocimiento, aunque el docente siempre debe tener en claro la oposición entre problemas y ejercicios en cuanto a las maniobras de acción en uno y en otro sentido, ya que el ejercicio conlleva la práctica de la repetición y sirve sólo para automatizar cursos de pensamiento y de praxis. Si se asimila la noción de problema con la ejecución de ejercicios y se plantea el camino de la repetición sin que el alumnado logre descubrir donde reside el problema o la dificultad, se llevará al estudiante a la inhibición del aprendizaje más que a su logro (Cobas-Portuondo, 2019).

El aprendizaje basado en problemas (ABP), desarrollado originalmente en las décadas de los 60's y 70's para carreras de medicina y aplicado en diversas partes del mundo para el aprendizaje de diversas disciplinas desde hace casi 30 años (Morales-Bueno y Landa-Fitzgerald, 2004), se basa en el principio de plantear problemas como un punto de partida para la adquisición e integración de nuevos conocimientos, trabajando en pequeños grupos de alumnos y a través de la facilitación que hace el tutor se analizan y resuelven problemas seleccionados o

diseñados especialmente para el logro de ciertos objetivos de aprendizaje. Es fundamental señalar que las situaciones / problemas deben poseer ciertas características, ya que no todo problema cumple con las condiciones intrínsecas para poder desarrollar lo que se busca en el método ABP, a saber;

- El diseño debe despertar interés y motivación.
- El problema debe estar relacionado con algún objetivo de aprendizaje.
- Debe reflejar una situación de la vida real.
- Los problemas deben llevar a los estudiantes a tomar decisiones basadas en hechos.
- Ser lo suficientemente complejo (pero no imposible) para que suponga un reto para los estudiantes. De esta manera su motivación aumentará y también la necesidad de probarse a sí mismos para orientar adecuadamente la tarea.
- Deben permitir hacerse preguntas abiertas, ligadas a un aprendizaje previo y ser tema de controversia y permitir justificar los juicios emitidos.
- Deben motivar la búsqueda independiente de información (Cobas-Portuondo, 2019).

En la actualidad, el enfoque de ABP no sólo es la base del desarrollo curricular y formación académica en muchas carreras de medicina – entre ellas la de nuestra propia universidad – sino que se ha ido extendiendo en mayor o menor medida a gran parte de las disciplinas, incluidas las ingenierías. De hecho, dentro de los estándares de acreditación de las carreras de ingeniería, se evalúa desde hace años la carga horaria dedicada a la resolución de *problemas abiertos de ingeniería*, según lo acordado con CONFEDI, y en nuestra Facultad debe informarse, si se realiza, como ítem separado dentro de la distribución de carga horaria para cada tipo de actividades, en el apartado 15 de los programas y planificaciones que deben ser presentados anualmente para cada espacio curricular, aunque no son muchas las asignaturas en las que se incluye este tipo de problemas, en ninguna se los utiliza como base para el desarrollo de todos los contenidos temáticos de las mismas.

Así, para la acreditación de cualquier carrera de ingeniería, dentro de las aptitudes que caractericen al graduado de la misma, se encuentran las de:

- Identificar, evaluar y resolver problemas de ingeniería con creatividad o innovación dentro de los límites de su propio conocimiento y;
- Aplicar sus conocimientos de matemáticas, ciencias básicas y ciencias de la ingeniería para

resolver problemas de la ingeniería con capacidad de análisis y síntesis.

También, refiriéndose a los contenidos curriculares se expresa: “Serán motivo de especial valoración las experiencias de laboratorio que estimulen al estudiante para el trabajo creativo y la solución de problemas de resultado abierto que desarrollen su capacidad de comunicación escrita y oral como también el manejo de la herramienta informática a través de la computación en todas las asignaturas del Plan de Estudios”. Y con respecto al proceso de enseñanza – aprendizaje: “Se entiende por proceso de enseñanza – aprendizaje al conjunto de experiencias que se generan a través de la comunicación que se establece entre el profesor y el alumno en forma bidireccional, basándose en contenidos específicos que tienden a desarrollar en el alumno actitudes, aptitudes y valores dirigidos a la construcción del conocimiento mediante el estímulo de la creatividad e innovación, así como la aplicación del ingenio para la solución de problemas” (CONFEDI, 2000).

En otro orden de cosas, los espacios curriculares en los que se desarrolló la propuesta presentada en este trabajo, aunque con diferentes nombres según la carrera a la que pertenecen – Análisis de los Alimentos II, de la carrera de Bromatología o Análisis de los Alimentos para la carrera de Ingeniería en Industrias de la Alimentación – tienen como contenidos comunes el análisis físico químico e instrumental de todo tipo de alimentos para verificar la calidad de los mismos para el consumo y la comercialización, ya sea desde el punto de vista de su genuinidad o pureza como de su estado de conservación o grado de deterioro y del cumplimiento con la reglamentación vigente. Para ello, deben conocer tanto las características de las materias primas y los procesos tecnológicos a los que se someten los alimentos a analizar para su elaboración, los cuales deberían ser conocimientos previos, como los fundamentos teóricos que les permitan seleccionar, aplicar y realizar los análisis de laboratorio que correspondan y no sólo obtener resultados confiables sino también interpretarlos correctamente a la luz de las reglamentaciones vigentes. En relación con los métodos analíticos, si bien se utilizan principios y conocimientos adquiridos en química analítica e instrumental, deben ser adaptados generalmente para cada tipo de alimentos, cuando no son específicos para alguno de ellos, según las características del mismo. Esto convierte estas asignaturas en espacios con gran cantidad de contenidos mínimos, que deben desarrollarse en un tiempo no superior a 13 o 14 semanas de clase, contando con 4 horas de trabajo de aula y 3 de laboratorio semanales. En cuanto al tipo de conocimientos teóricos y de procedimientos a aprender, suelen estar totalmente estandarizados, de modo que el alumno deberá apegarse a ellos tanto

durante el aprendizaje como en la aplicación que haga durante el desempeño de sus actividades profesionales como graduado por lo que, a los fines de lograr aprendizajes duraderos en el tiempo y aplicables en situaciones versátiles, deberían priorizarse conceptos y principios y su forma de aplicación o adaptación a la práctica e interpretación de los resultados antes que el recordar memorísticamente procedimientos que deberán tener escritos y a la vista cuando se realicen en la práctica, así como favorecer el aprendizaje autónomo continuo. Cabe también destacar que, si bien desde hace muchos años se dispone de materiales escritos elaborados por las docentes para el estudio de algunos de los contenidos temáticos y que existen diversos manuales o guías para el desarrollo de los métodos analíticos requeridos, disponibles tanto en biblioteca como en Internet, no existe uno o dos libros que puedan ser utilizados como único recurso bibliográfico y mucho menos que aborde la obtención de conclusiones a partir del análisis de los resultados obtenidos.

Los espacios curriculares referidos pertenecen al último semestre de las respectivas carreras, con una duración de tres años para el caso de Bromatología y de cinco años para la Ingeniería, por lo que los alumnos suelen llegar a cursarlos, si bien habiendo regularizado las asignaturas correlativas previas, no sólo sin posibilidades de poder promocionarlos, ya que no tienen aprobados los correlativos anteriores necesarios para ello, sino con la expectativa o certeza de que no se dedicarán al estudio de Análisis de Alimentos, para poder aprobarlo, hasta pasados varios meses o, tal vez, años. Independientemente de sus estilos de aprendizaje, los estudiantes llegan, además, sin cultura de estudio autónomo metódico y diario de los contenidos vistos en el aula, a menos que se lo exijan para parciales u otro tipo de evaluaciones o deban redactar informes de trabajos prácticos desarrollados y acostumbrados a haber transitado casi la totalidad de sus carreras bajo las modalidades tradicionales de enseñanza, estudiando bajo modelos mayormente conductistas, donde la ejercitación y práctica de laboratorio predominaron sobre la problematización y donde la aprobación del examen final de cada materia y no el aprendizaje de los contenidos para su aplicación posterior fue el objetivo. En general, suelen tender a mantener los aprendizajes logrados en compartimentos casi estancos en lugar de relacionados entre sí y poseer capacidades más bien limitadas para el aprendizaje autónomo y la resolución de problemas. Dadas estas características, pretender aplicar formas de aprendizaje principalmente constructivistas al estudio de todos los contenidos curriculares de las asignaturas en los tiempos disponibles para el cursado puede convertirse en un desafío no menor.

Aún así, y dado que la metodología original de ABP requiere tanto de conocimientos previos como de capacidad de aprendizaje autónomo, no totalmente desarrollados en los estudiantes al comienzo del cursado de las asignaturas, sumado al hecho de que la pandemia no permitió la realización de prácticas presenciales de laboratorio durante 2020, se tuvo como objetivo adaptar la metodología, principios y enfoque de la ABP para lograr una forma de estudio que permitiera a los estudiantes alcanzar el aprendizaje de la totalidad de los contenidos mínimos curriculares de Análisis de Alimentos (incluidos los prácticos) en el tiempo de cursado de las asignaturas, así como evaluar el impacto de la metodología desarrollada en el aprendizaje de los alumnos.

2. Materiales y métodos

Dado que se trató de una metodología en la cual no se disponía de experiencia y que requeriría de la resolución de varios problemas (uno diferente para cada tema) durante el tiempo de cursado de las asignaturas, debía abordarse en primer término la reestructuración de los contenidos y la elaboración de los materiales escritos pertinentes, estableciéndose que la planificación debería contemplar:

- Redistribución de los contenidos programáticos y agrupación de los mismos por temáticas que puedan ser abordadas en forma integral al resolver cada problema que se plantee.
- Limitación del número de problemas abarcando la totalidad de los contenidos mínimos, de modo que puedan ser resueltos dentro del tiempo disponible para el cursado de la asignatura.
- Selección de los temas redistribuidos a incluir en cada uno de los problemas planteados, evitando superposiciones innecesarias y lagunas de contenidos curriculares mínimos obligatorios que pudieran quedar excluidos de ellos.
- Elección de los materiales concretos y/o situaciones reales o ficticias pero familiares para el estudiante, que sirvan de base para la resolución de cada problema y permitan abordar todos los aspectos importantes seleccionados para el mismo (contextualización y aprendizaje significativo).
- Elección de un título o nombre creativo y motivador para la descripción de la unidad temática o temas parciales de forma que provoque curiosidad y/o estimule el interés del alumno (motivación).
- Planteo e introducción del problema a resolver redactados de forma breve, creativa, desafiante y motivadora, que despierte el interés de los

estudiantes por resolver la situación (motivación).

- Provisión del material a examinar y/o resolver aplicando tanto conocimientos previos como los adquiridos mediante estudio guiado y, especialmente, la aplicación a la práctica de todos los aspectos teóricos que deban alcanzarse (integración de los saberes).
- Orientación acerca de los saberes previos que deben ser recuperados y registrados mediante herramientas adecuadas.
- Formulación de preguntas acerca de lo que los estudiantes necesitan conocer para resolver la situación problemática planteada, en forma ordenada para cada uno de los subtemas a abordar (guía para el estudio).
- Indicación de los recursos disponibles para la resolución de la guía de estudio.
- Registro ordenado de los resultados que se van obteniendo.
- Acompañamiento del aprendizaje mediante las clases expositivas de los contenidos teóricos necesarios y discusión y revisión en grupo de los resultados y conclusiones obtenidos, con el apoyo de todos los docentes del espacio curricular.

Preparación de material escrito para el desarrollo de la asignatura

Si bien se contaba con material escrito preparado por las docentes, consistente en guías de trabajos prácticos muy completas y material auxiliar de apoyo teórico para el estudio de los contenidos curriculares, fue necesaria la producción de nuevo material, especialmente la guía de estudio en cada uno de los problemas planteados, de forma que los estudiantes pudieran disponer no sólo de la descripción del problema y los datos básicos del mismo, sino también de los objetivos a alcanzar mediante la resolución del mismo, de las preguntas orientadoras respecto de los aspectos tanto metodológicos como conceptuales importantes a aprender – para facilitar la resolución en los tiempos programados – y de las referencias a algunos materiales bibliográficos de apoyo necesarios para el estudio, no incluidos en los ya existentes en el espacio curricular. El contenido y organización del material resultante se describe más detalladamente en el apartado de Resultados y Discusión.

Evaluación de los aprendizajes durante el cursado

Se realizó mediante portafolios con la resolución de la totalidad de los problemas, presentado por cada grupo alumnos. Al respecto, en la clase de presentación de la asignatura se proporcionaron las

rúbricas a utilizar por las docentes, tanto para la evaluación del desempeño e informe de cada uno de los problemas como de los mapas mentales y el portafolios completo.

Evaluación de los resultados

Se realizó mediante una encuesta a la totalidad de los alumnos de las dos cohortes (2020 y 2021) en las que se aplicó la metodología, con análisis estadístico de los resultados de la misma.

3. Resultados y Discusión

Selección de los problemas a trabajar y preparación de material escrito para el desarrollo de la asignatura

Verificar la falta de genuinidad de un alimento elaborado o demostrar que el mismo ha sufrido alguna adulteración o que contiene o no ingredientes no declarados, permitidos o no, o presentes en calidades o proporciones diferentes a las que declara, suele tener un notable parecido con la labor detectivesca para demostrar la culpabilidad de un acusado ya que, gran parte de las veces se requiere ir más allá de la analítica común para ese alimento, decidiendo qué otros parámetros deben ser evaluados o por relaciones entre algunos de los resultados obtenidos, para lo cual no se encuentran disponibles protocolos específicos preestablecidos. Se requiere en esos casos una fuerte dosis de capacidad de observación, análisis y relación de los resultados, así como un fuerte conocimiento global del producto, sus materias primas y su proceso de elaboración que, aunque en general excederán a los alcanzados en el curso, introducidos en algunos de los casos y con la guía adecuada de los docentes, se convertirá en un fuerte motivador para el estudiante. De allí, pues, el nombre que se eligió para el curso y bajo el que se estructuraron los nueve problemas básicos que incluyen en forma integral y armónica la totalidad de los contenidos de Análisis de Alimentos contemplados en los planes de estudio. A más de ello, a la mayoría de las personas suelen atraernos las historias con un poco de misterio o suspenso, sin importar cuáles sean los estilos de aprendizaje predominantes en cada uno, por lo que la necesaria motivación podría verse facilitada.

Con base en los lineamientos metodológicos planteados en el apartado anterior, se elaboró el material DETECTIVES DE ALIMENTOS. Un enfoque adaptado de aprendizaje del análisis de alimentos basado en problemas que, si bien por la urgencia provocada por la pandemia se fue redactando durante todo el semestre de cursado de 2020, sus contenidos habían sido planificados en su totalidad antes de comenzar el mismo. Durante 2021 el material, con el mismo nombre, se sistematizó

como Manual de estudio para análisis de los alimentos y se pretende, con base en los resultados obtenidos que se detallan más adelante, continuar con su uso en condiciones de presencialidad, ya sea plena o parcial de cursado de las carreras de la FCAI.

En la introducción, cuyos primeros párrafos se transcriben a continuación, se intenta familiarizar al alumno con el problema general planteado para el espacio curricular (ser un detective de alimentos, para resolver diferentes casos de tipo policial para averiguar la culpabilidad o inocencia de diferentes alimentos con posible incumplimiento de alguna reglamentación), así como anticipar cuáles serán las temáticas a abordar en la resolución de los subsiguientes “casos” – problemas – específicos.

“¡¡¡Bienvenidos!!! Por el sólo hecho de haberse inscripto en este curso (Análisis de los Alimentos II, de la carrera de Bromatología o Análisis de los Alimentos para la carrera de Ingeniería en Industrias de la Alimentación) ya han ingresado en la categoría de Aspirantes a Detectives de Alimentos (¡¡¡Guauuuu!!!). Aunque contarán con la guía de sus docentes a cargo del espacio curricular, para llegar a disponer del título al que aspiran (regularizar la asignatura) deberán resolver, al menos, los siguientes Casos:

- El caso de la Banda de las Galletitas Honestas. (Análisis proximal e información nutricional obligatoria).
- El caso de las Gemelas No Idénticas pero... ¡Tan Parecidas! (Diferentes bases de cálculo y expresión de concentraciones. Contenido de azúcares. Aditivos).
- El caso de los “Saludables” Mix. (Cálculo de composiciones de alimentos a partir de sus ingredientes. Aditivos).
- El caso de las Hamburguesas que se Cambiaron de Identidad (Análisis de alimentos cárnicos y afines).
- El caso de las Leches Sospechadas y su Distinguida Parentela. (Análisis de leche y lácteos. Muestreo para análisis microbiológicos).
- El caso de la Máscara de Queso Rallado. (Análisis de quesos y contenidos netos).
- El caso del Jarabe que se Disfrazó de Miel y la Jefa Sacarosa. (Análisis de productos azucarados).
- El caso del Jugo de Naranja PP (Petulante y Provocador) y los Parientes Alcohólicos. (Análisis de bebidas hídricas y alcohólicas fermentadas).

- El caso del Aceite de Oliva que no era Virgen (Análisis de aceites y grasas).

Por supuesto, como en cualquier labor detectivesca, deberán trabajar con orden y método para poder llegar a la resolución satisfactoria de cada Caso”.

Hasta aquí la transcripción de la introducción del nuevo material escrito, aclarando que los contenidos programáticos a trabajar en cada uno de los casos, mostrados entre paréntesis en el párrafo anterior, son sólo aclaratorios para esta presentación y no figuran en el texto original suministrado al alumno. Sigue luego de lo transcripto más arriba, la descripción sucinta de la tarea a realizar y como se organiza la misma, así como la forma de evaluación y las competencias, tanto genéricas como específicas, sobre las que se trabajará durante el desarrollo del curso para su logro.

Cada uno de los casos o problemas a resolver listados para la actuación de los Detectives de Alimentos, fue estructurado según el siguiente esquema:

- Objetivos a lograr durante el estudio necesario para la resolución del Caso, especificando los contenidos a abordar en el mismo.
- Descripción del problema a solucionar mediante una historia ficticia muy corta pero motivadora. Como ejemplo se incluye la correspondiente al Caso # 1 de la Banda de las Galletitas Honestas: “Están en todas partes, tienen multitud de apariencias, componentes y formas distintas, se ponen delante de cualquiera a cualquier hora, sin importar su edad (niños, jóvenes, adultos y hasta mayores) y... ¡¡nadie es capaz de resistirse!! Son las GALLETITAS DULCES. No importa cuántas voces se levanten en su contra (¡¡precisamente por su contenido de azúcares!!) o cuán informado se esté sobre ellas, lo cierto es que cada vez aparecen más y más integrantes de esta gran banda (basta ver las góndolas de supermercados y kioscos). Pero ellas dicen que son HONESTAS, que no engañan a nadie, porque llevan escrito y visible para todos, lo que son y lo que contienen... ¿Será cierto? ¿O sólo mienten con todo el descaro del mundo para que nadie las detenga?

Y otra cosa... ¡¡Nadie sabe quién es el CABECILLA DE LA BANDA DE LAS GALLETITAS HONESTAS!! Sólo se conocen algunos rumores... ¡¡Los informantes infiltrados no llegan a conocerlo!! Dicen que los miembros de la banda sólo saben que es el más honesto de todos, o sea, ¡el que presenta menor diferencia entre lo que dice ser y lo que realmente es! ¡¡El Departamento de Detectives de Alimentos debe descubrirlo!!!”
- Datos del problema: Información sobre la cual se deberá trabajar y que se requiere para hallar la solución. En todos los casos se proveen en forma de registros fotográficos, de rótulos y/o aspecto de productos alimenticios reales involucrados en el Caso, textos, como declaraciones de posibles testigos y registros de datos numéricos y/o gráficos, como cuadernos de laboratorio ficticios. Estos últimos, si bien contienen todos los datos necesarios, presentan los resultados en blanco de modo que el estudiante deba realizar todos los cálculos correspondientes, a medida que avanza en el estudio, para conocer los mismos, lo que le sirve de práctica en forma integrada con los conocimientos teóricos que va incorporando. En todos los casos se procuró incluir, además de ejemplos de alimentos que cumplieran las condiciones de genuinidad o reglamentarias, otros que no lo hicieran, de modo de facilitar el aprendizaje del análisis crítico de los resultados obtenidos y la elaboración de conclusiones, así como incrementar el anclaje de los nuevos conocimientos mediante la mayor motivación lograda cuando el alumno “descubre” finalmente la prueba de culpabilidad o incumplimiento del alimento investigado.
- Guía para la resolución y el estudio en forma ordenada y metódica primeramente, en forma global y luego en particular para cada aspecto o tema que el alumno deba conocer. Generalmente se suministró en forma de tablas con tres columnas: en la primera, titulada “¿Qué sabemos?” se instó al alumno a recuperar, en forma individual, todos sus saberes previos, adquiridos tanto en espacios curriculares ya transitados como en su experiencia de vida y registrarlos en un mapa mental o conceptual (según su preferencia) de modo que pudieran funcionar como conceptos inclusores de los nuevos aprendizajes. En la segunda columna, encabezada como “¿Qué necesitamos saber?”, prevista para el trabajo grupal, se incluyeron, en forma ordenada y secuencial, preguntas que orientaran a los alumnos acerca de todos los aspectos o conceptos de relevancia para el aprendizaje del tema, aún de aquellos que pudieran ya disponerse dentro de los conocimientos previos. Siendo esta la principal modificación efectuada a la metodología de ABP original para adaptarla al uso pretendido de inclusión de la totalidad de los contenidos mínimos de las asignaturas, se trata en mayor profundidad en los párrafos siguientes. También fue necesario, a fin de evitar pérdidas de tiempo y frustración a los alumnos, incluir una columna de “Recursos” a utilizar para la obtención de las respuestas para cada pregunta o grupo de las mismas, los cuales incluyeron la consulta al Código Alimentario, Guías de Trabajos Prácticos

de Laboratorio y otros materiales didácticos ya existentes, propios de los espacios curriculares, grabaciones, no sólo de las clases expositivas sincrónicas sino también de la discusión realizada durante la puesta en común resultados y/o conclusiones, copias en formato PDF de las presentaciones utilizadas en las clases expositivas, videos de algunos de los métodos de laboratorio que no pudieron realizarse presencialmente durante 2020 debido a la situación de pandemia y materiales complementarios escritos, cuando fueron necesarios. Estos dos últimos tipos de recursos siempre se referenciaron correctamente en cuanto a su procedencia, pudiendo ser utilizados tanto online como descargados offline, indicando la fuente. Una cuarta columna, propia de la metodología ABP original donde los alumnos fueran registrando sus logros, no pudo finalmente ser utilizada debido a que los tiempos que la metodología les demandó utilizar a los alumnos, si bien pudieron ser cumplidos en general, no les permitieron disponer del tiempo adicional necesario para la reflexión sobre el propio proceso y los resultados de su aprendizaje, entendiéndose como uno de los aspectos a mejorar en el futuro.

- En algunos casos en los que se consideró necesario, ya sea por la relevancia o por la dificultad del tema, se incluyó alguna ejercitación adicional a la requerida para la resolución del problema planteado.
- Finalmente, en todos los casos, se orientó a los estudiantes para la elaboración de tablas resumen con los resultados obtenidos, para la disposición sintética y ordenada de los mismos, de modo que permitieran un análisis de datos adecuado y la elaboración de conclusiones pertinentes.

En todos los casos, las preguntas formuladas para guiar el aprendizaje se orientaron a conocer profundamente la matriz alimenticia sobre la que debían trabajar, con relación a:

- La estructura química y bioquímica del alimento en sí y de sus ingredientes declarados en los rótulos.
- Los procesos tecnológicos utilizados para la elaboración.
- Los parámetros o aspectos del alimento se encuentran reglamentados, ya sea en forma general o específica y el significado o implicancias para la calidad del producto alimenticio en caso de no cumplir con los valores reglamentados.

- Otros aspectos o parámetros no reglamentados pero útiles para evaluar la calidad del producto, el por qué de su uso y su posible interpretación.
- Los métodos analíticos disponibles para evaluar los diferentes parámetros y en qué se fundamentan los mismos, así como sus ventajas, desventajas y/o limitaciones.
- La forma de cálculo de los contenidos de los analitos ensayados en cada caso y la obtención de los resultados a partir de los datos obtenidos con la aplicación de cada método analítico.
- La interpretación de los resultados obtenidos, no sólo en forma aislada, sino también en el conjunto de la información.

En cuanto a la forma de trabajo, predominó siempre el trabajo en grupos formados por 3 o 4 estudiantes que debían llevar el estudio al día para poder completar la entrega de lo trabajado en los tiempos asignados. Ante cada nuevo caso, una vez leídos los objetivos y el problema a resolver y completadas las tareas de recuperación de saberes previos y algunas preliminares como la revisión de las reglamentaciones o similares, se ofrecieron clases expositivas con los aspectos teóricos que se requería conocer para avanzar en la resolución de los casos. Dada la necesidad de aplicación inmediata, sumada al hecho de que se dispuso de grabaciones de estas clases, las mismas fueron aprovechadas por el alumnado mucho más ampliamente que en el cursado tradicional que se venía realizando anteriormente. También resultaron de gran valor, una vez obtenidos los resultados, ya sea en forma total o parcial de cada caso, la puesta en común con la totalidad de los grupos para ir controlando tanto resultados como la interpretación de los mismos y de las conclusiones de los mismos. También permitió a los alumnos ir despejando las dudas que se les presentaran, tanto de aspectos teóricos como prácticos, en la resolución de las situaciones planteadas, lográndose aprendizajes verdaderamente significativos de los temas. La disponibilidad de estas clases grabadas, tanto las expositivas como las de discusión, fue valorada luego en forma muy positiva por los estudiantes, ya que les permitían volver a ver las clases y prestar atención a aspectos, incluidos en las preguntas guía, que se les hubieran pasado por alto en el momento de la clase en forma sincrónica o verla en forma diferida en el tiempo si no pudieron asistir a la misma en el momento de la emisión.

Tal como se mencionó, la mayor diferencia entre el método adaptado aquí utilizado y el método ABP original consistió en que las preguntas acerca de lo que deberían saber fueran formuladas por las docentes, en lugar de surgir del análisis del problema realizado por los propios alumnos dentro de cada grupo para encontrar la solución y realizar un

aprendizaje autónomo de mayor significatividad. Si bien las autoras fueron conscientes de la limitación que el cambio podría imponer al potencial desarrollo de habilidades y competencias de los alumnos participantes, debido a la sustitución de estrategias constructivistas por otras más conductistas, la decisión debió tomarse en función de tres aspectos que se consideraron limitantes:

- El tiempo disponible para el desarrollo de todos los contenidos de las asignaturas involucradas y el que podrían disponer los alumnos para satisfacer las demandas de la resolución de todos los casos sin descuidar las actividades de otros espacios curriculares que estuvieran cursando simultáneamente.
- El escaso conocimiento previo que los alumnos tendrían de los contenidos específicos de los espacios curriculares a aprender. Siendo un problema una motivación para el aprendizaje significativo de muchos nuevos conceptos y contenidos programáticos y no el campo de aplicación de los conocimientos adquiridos previamente para su resolución, sería difícil que los propios pudieran hacer las preguntas necesarias.
- El grado de acostumbramiento de los estudiantes a estilos mayoritariamente conductistas a lo largo de toda su carrera, así como su dificultad para el aprendizaje autónomo que requerirían tiempos de entrenamiento no disponibles, para llegar a estar en condiciones de utilizar estrategias netamente constructivistas para su aprendizaje con resultados satisfactorios.

Por ello, el énfasis en la comparación de resultados no debería estar puesto en la reducción o pérdida de capacidades o competencias que podría provocar el uso de la metodología adaptada con respecto a la original de ABP, sino en el aumento o ganancia de significatividad de los aprendizajes que realizaran los estudiantes durante el cursado de los espacios curriculares, con las correspondientes ventajas que ello les reportaría.

En la percepción de las docentes, además de un enorme incremento en la motivación e interés de los alumnos, la metodología produjo un fuerte impacto en su jerarquización conceptual de los contenidos a aprender, lo que se vio reflejado en la calidad de los conocimientos adquiridos a la hora de rendir su examen final de las asignaturas.

Percepción de los estudiantes respecto de los aspectos relevantes de la metodología adaptada de ABP para el cursado de los espacios curriculares

Se evaluó mediante un cuestionario Google aplicado al finalizar el cursado en 2021 a la totalidad de los

alumnos inscriptos en las asignaturas durante 2020, que realizaron las prácticas presenciales de laboratorio en 2021, y los de este último año. También respondieron el cuestionario algunos estudiantes que habían cursado las materias con anterioridad a 2020 y, queriendo estudiar para rendir su examen final cursaron informalmente, sin registrar nueva inscripción, en 2020 aprovechando la virtualidad. Los alumnos de la carrera de Bromatología constituyeron dos terceras partes de los estudiantes que trabajaron con la metodología ABP adaptada. Para lograr sinceridad en las respuestas se explicó previamente a los alumnos, quienes ya habían regularizado las asignaturas, que el único propósito de la encuesta era la evaluación de la metodología. Se transcriben los reactivos utilizados en la encuesta, en su mayoría previstos para obtener respuestas de frecuencia de ocurrencia de diferentes aspectos considerados positivos de la metodología implementada y los gráficos de cuestionarios de Google que sintetizan las respuestas obtenidas.

- I. La presentación del espacio curricular y de cada uno de los Casos me resultó más atractiva que el estudio por temas en la forma tradicional.

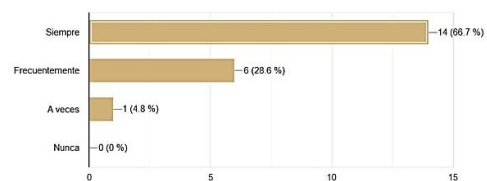


Figura 6. Respuestas de pregunta 1. (Fuente: propia)

- II. La aplicación práctica inmediata de los aspectos teóricos para la evaluación de la calidad de un alimento me facilitó la comprensión y aprendizaje de los aspectos teóricos de los temas.

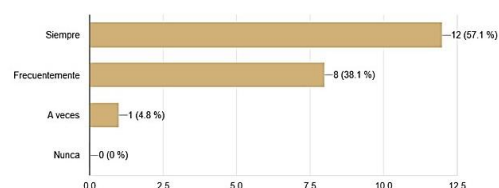


Figura 7. Respuestas de pregunta 2. (Fuente: propia)

- III. El estudio paralelo de la reglamentación aplicable a cada alimento me ayudó a comprender mejor los propósitos del análisis realizado.

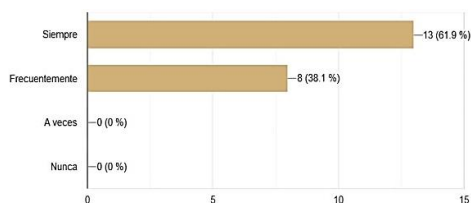


Figura 8. Respuestas de pregunta 3. (Fuente: propia)

- IV. La revisión de mis conocimientos previos y/o de los procesos tecnológicos utilizados para la obtención de los diferentes alimentos me ayudó a comprender mejor el objetivo de los análisis realizados y su interpretación.

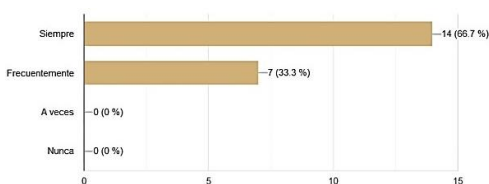


Figura 9. Respuestas de pregunta 4. (Fuente: propia)

- V. El estudio contextualizado de los métodos analíticos y la disponibilidad de videos previo a su realización en el laboratorio me facilitó tanto esa tarea como la interpretación de los resultados que obtuvimos.

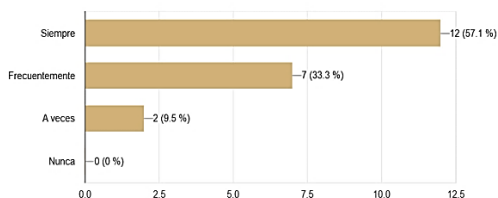


Figura 10. Respuestas de pregunta 5. (Fuente: propia)

- VI. El trabajo en grupos me permitió participar en un trabajo colaborativo / cooperativo y potencié mi aprendizaje de los diferentes temas.

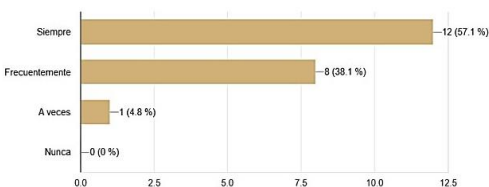


Figura 11. Respuestas de pregunta 6. (Fuente: propia)

Como surge del análisis de los gráficos mostrados en las figuras 1 a 6, casi la totalidad de los estudiantes valoran muy positivamente el impacto de la aplicación práctica inmediata de los conocimientos teóricos, la revisión de los

conocimientos previos, el estudio paralelo de la reglamentación y contextualizado de los métodos analíticos y el trabajo en grupos, sobre su comprensión y aprendizaje de los contenidos curriculares incluidos en cada caso / problema.

- VII. El uso de mapas mentales y/o conceptuales para la síntesis de saberes previos y/o los nuevos contenidos me facilitó el aprendizaje de los temas nuevos.

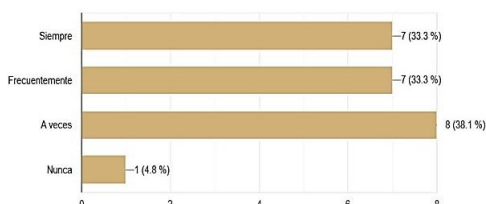


Figura 12. Respuestas de pregunta 7. (Fuente: propia)

- VIII. El uso de mapas mentales y/o conceptuales para la síntesis de saberes previos y/o los nuevos contenidos me ayudó a establecer relaciones con los conocimientos anteriores y con los adquiridos en paralelo.

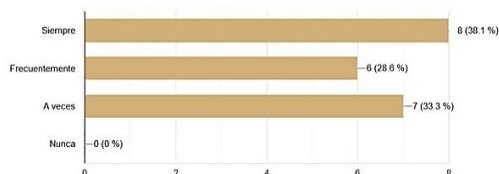


Figura 13. Respuestas de pregunta 8. (Fuente: propia)

Si bien la totalidad de los alumnos valora muy positivamente la recuperación de los conocimientos previos realizada para la comprensión de los objetivos de los análisis a efectuar sobre los alimentos y de su interpretación (figura 3), el uso de los mapas mentales y/o conceptuales como herramientas para ello, si bien apreciado por muchos estudiantes, se valora como ineficaz o de escaso valor tanto para la recuperación de conocimientos previos como para el establecimiento de relaciones entre los conceptos, ya sean anteriores o recientemente adquiridos, por más del 40 % de los estudiantes. Debiendo indicar la causa de una respuesta "nunca" o "a veces" (reactivo 9), las respuestas seleccionadas fueron, mayoritariamente, no estar familiarizados con las herramientas mencionadas y que les insumían más tiempo del disponible para el estudio. Algunos marcaron ambas razones y sólo un alumno dijo que le causaba disgusto o rechazo utilizarlas. Si bien la aceptación o la resistencia al uso de esas herramientas pueden estar relacionados con los

estilos de aprendizaje de cada alumno, aparece como importante para próximas cohortes trabajar en forma más personalizada, permitiendo al estudiante que utilice alguna otra herramienta que le parezca más adecuada para registrar sus saberes previos como base de su aprendizaje significativo. El mayor porcentaje de valoraciones negativas se dio entre alumnos de la carrera de Bromatología y la prueba chi-cuadrado para datos no paramétricos muestra que existe asociación entre las respuestas dadas por los alumnos y las carreras que cursan, para el 95% de nivel de confianza.

- X. Las preguntas de “¿Qué necesitamos saber?” incluidas para el estudio de las diferentes partes de cada “Caso” me ayudaron a comprender mejor cuáles son los aspectos relevantes a tener en cuenta en cada situación.
- XI. Las preguntas de “¿Qué necesitamos saber?” incluidas para el estudio de las diferentes partes de cada “Caso” me incentivaron a la búsqueda de material adicional al sugerido en Recursos para profundizar el estudio de los temas

XIII. La información provista en la columna de Recursos me fue muy útil para el abordaje y resolución de los diferentes temas.

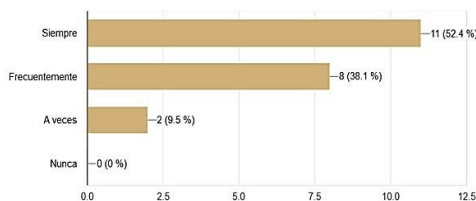


Figura 14. Respuestas de preguntas 10, 11 y 13. (Fuente: propia)

Por razones de espacio y similitud de las frecuencias de las respuestas sólo se incluye un gráfico para los reactivos 10, 11 y 13, el cual muestra que los alumnos percibieron muy positivamente tanto las preguntas guía formuladas por las docentes para el estudio secuencial de los temas y subtemas como la indicación de los recursos a utilizar para la resolución de los casos. El reactivo 12 sólo indagaba las causas de las respuestas “A veces” o “Nunca” al reactivo 11.

Ya que la formulación de las preguntas guía para orientación de los estudiantes de cuáles son los puntos importantes a tener en cuenta en cada tema constituyen la principal modificación introducida a la metodología ABP original para adaptarla al uso previsto del estudio de la totalidad de los contenidos

curriculares, la valoración de su utilidad e importancia para la mejor comprensión de la asignatura por más del 90% de los alumnos, resulta en la confirmación del valor de la metodología adaptada para el logro de un aprendizaje significativo de la misma.

- XIV. Los contenidos trabajados en los Casos me parecieron suficientes y adecuados para la correcta interpretación de los resultados y la formulación de conclusiones pertinentes.

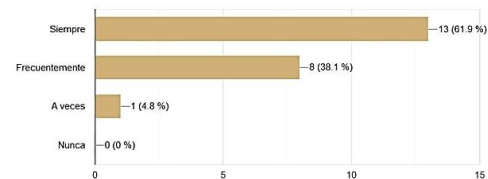


Figura 15. Respuestas de pregunta 14. (Fuente: propia)

- XV. El desarrollo de los contenidos teóricos recibidos en clase me resultó suficiente y adecuado para permitir la resolución eficiente de los Casos en el trabajo grupal independiente.

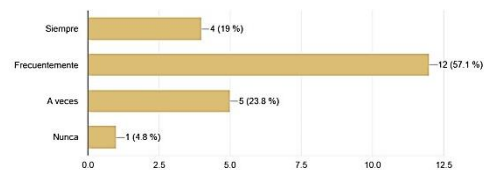


Figura 16. Respuestas de pregunta 15. (Fuente: propia)

Ya que en todos los casos se ofrecieron clases teóricas, bien evaluadas por los alumnos, con los temas específicos y propios de la asignatura, la comparación de estos resultados con los del reactivo 14, parece confirmar la fuerte necesidad de dependencia de muchos de los estudiantes de una guía conductista por parte de las docentes, en desmedro de una actitud constructivista de aprendizaje autónomo. También parece relacionarse con algunos comentarios acerca de que el tener que elaborar mapas mentales o conceptuales les hacía “perder” mucho tiempo, debiendo buscar apuntes de materias anteriores, lo que evidencia la superficialidad de los aprendizajes logrados en las mismas.

- XVI. La revisión de los resultados hallados y la discusión de los mismos en clase contribuyó fuertemente para mi comprensión global del tema involucrado y la elaboración de las conclusiones pertinentes.

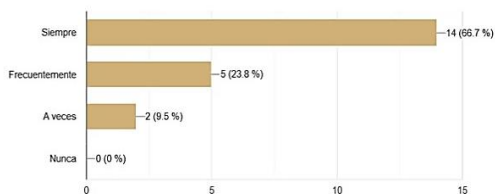


Figura 17. Respuestas de pregunta 16. (Fuente: propia)

Esta revisión se refiere a la puesta en común y análisis de los resultados que habían ido obteniendo, además de aclarar dudas que se les hubieran ido presentando o corregir errores de cálculo o metodológicos, así como a la guía o ayuda para la inferencia de conclusiones objetivas. Desde el punto de vista de las docentes, esta fue una de las actividades más productivas para el aprendizaje significativo de los estudiantes, de modo que a futuro se pretende no sólo mantenerla, sino incluso también profundizarla.

XVII. La metodología de resolución de Casos contribuyó a desarrollar / mejorar mis capacidades / habilidades relacionadas con competencias genéricas del EC.

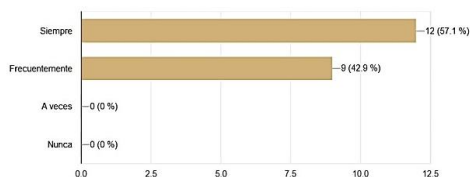


Figura 18. Respuestas de pregunta 17. (Fuente: propia)

XVIII. La metodología de resolución de Casos me permitió tener una visión ordenada y global de los contenidos y conceptos del EC.

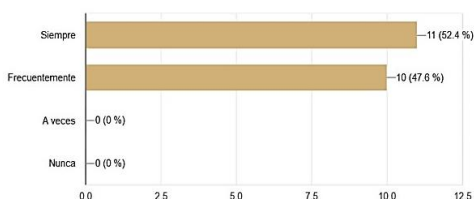


Figura 19. Respuestas de pregunta 18. (Fuente: propia)

XIX. La metodología de resolución de Casos me ayudó a desarrollar en buena medida las Competencias Disciplinarias Mínimas correspondientes al EC durante el cursado del mismo.

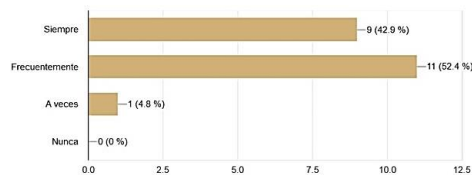
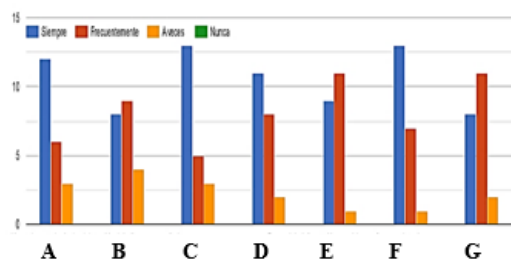


Figura 20. Respuestas de pregunta 19. (Fuente: propia)

XX. Debido a mi propio estilo de aprendizaje me sentí muy cómodo/a realizando las actividades propuestas relacionadas con:



- Analizar la Reglamentación y/o la tecnología de elaboración del alimento estudiado
- Completar los cálculos e información solicitada en los Registros de Laboratorio
- Mirar los videos de los métodos analíticos y analizar el desarrollo de éstos.
- Realizar los prácticos de laboratorio y analizar los resultados obtenidos.
- Resumir la información en tablas en forma ordenada.
- Analizar la información recopilada en forma ordenada
- Interpretar los datos y elaborar conclusiones pertinentes a partir de ellos.

Figura 21. Respuestas de pregunta 20. (Fuente: propia)

Dado el desconocimiento por parte de las docentes y hasta de los propios estudiantes, del estilo de aprendizaje de cada uno de ellos y de los estilos predominantes en cada cohorte, este reactivo tuvo como meta indagar acerca de las actividades con las que los alumnos se sintieron más cómodos. Las tareas marcadas con mayor frecuencia fueron la revisión de la reglamentación pertinente previo a comenzar con el estudio de cada tema, la observación de los videos con la realización de los métodos analíticos y las correspondientes prácticas de laboratorio para ejecutar dichos métodos y el análisis de la información recopilada en forma ordenada. Sin embargo, en relación a esta última actividad, algunos de los alumnos que la habían disfrutado no se sintieron tan cómodos ordenando esa información en tablas, por ejemplo, lo que parece mostrar algún tipo de rechazo a la tarea, similar al ocurrido con el uso de los mapas mentales o conceptuales. Otras dos actividades con las que menos estudiantes se sintieron cómodos fueron, primero la resolución de los cálculos estequiométricos para obtener los resultados de la aplicación de los diversos métodos analíticos, que se interpreta como la presencia de aprendizajes previos más bien superficiales o poco significativos en esa área de vital importancia para el anclaje de los

conocimientos nuevos aprendidos en Análisis de Alimentos, dificultad recurrente y siempre también detectada en grupos anteriores con metodología de cursado tradicional. La segunda de las actividades con la que un menor número de estudiantes se sintió siempre cómodo realizándola fue la de interpretación de los datos obtenidos para la elaboración de conclusiones, que se asocia a escasas o nulas experiencias previas al respecto. En este último caso, el desarrollo de las competencias genéricas necesarias para ello, requieren de práctica y maduración, por lo que se estima que un abordaje más centrado en el alumno en todos los espacios curriculares de las carreras desde el momento del ingreso, así como la incorporación de actividades que tiendan a formar dichas competencias, aún cuando fuera en forma parcial, contribuiría muy fuertemente para que el alumno pueda aprovechar mejor las bondades de la metodología presentada en este trabajo, especialmente teniendo en cuenta que se trata de competencias específicas establecidas en los Planes de Estudio de las carreras involucradas.

XXI. Los tiempos asignados para la entrega de los materiales en el campus virtual me resultaron fáciles de cumplir.

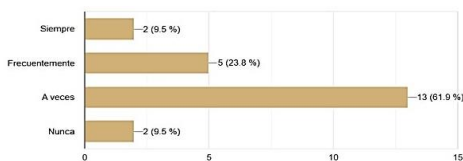


Figura 22. Respuestas de pregunta 21. (Fuente: propia)

XXII. El tiempo extra (adicional a las horas de cursado de teóricos + prácticas de laboratorio) que necesité asignar semanalmente para la resolución de casos e informes de laboratorio fue de:

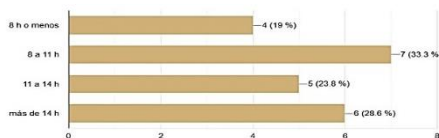


Figura 23. Respuestas de pregunta 22. (Fuente: propia)

En el ítem 21 se observa que sólo el 30% de los estudiantes pudieron frecuentemente completar las tareas semanales autónomas en los plazos asignados, mientras que el resto rara vez lo consiguió, con la consecuente entrega fuera de fecha o de materiales trabajados en forma incompleta, aunque suficiente para la aprobación del caso. Entre las causas de esta dificultad, las cuales se les había pedido especificar

entre cuatro opciones, un 15% manifestó que el material fue demasiado extenso para los plazos propuestos, sin otras aclaraciones, mientras los restantes, cuando marcaron esta opción, también marcaron que resolver todo el material exige tiempo de estudio adicional del cual no disponían, por motivos personales – entre los cuales, aunque no explicitados, se encuentran estudiantes que trabajan además de estudiar o son madres con hijos pequeños – y/o que el tiempo que requiere resolver el material es superior al disponible por la demanda de cursado de las restantes obligaciones curriculares del semestre. Ninguno alegó necesitar tiempo para desarrollo personal además del cumplimiento de las tareas exigidas. Estas respuestas, si bien no muestran asociación con las carreras a la que pertenecen los alumnos, sí lo hacen con los tiempos de trabajo autónomo demandados semanalmente para el estudio de las asignaturas con esta metodología, que se muestran en la figura 15. El 30% de los alumnos manifiesta haber necesitado para ello más del doble del tiempo de cursado, que es lo estimado como necesario, incluso por nuestra Ord 75/2016- CS, para que los alumnos de grado o pregrado adquieran las competencias requeridas en la asignatura, lo que se asocia tanto con la falta de hábito de estudio diario para llevar las materias al día y promocionarlas o aprobarlas inmediatamente que se cursaron, como con la deficiencia de aprendizajes verdaderamente significativos de los contenidos previos.

Los comentarios recibidos en el último ítem de la encuesta, abierto a lo que quisieran aportar en relación a las vivencias durante el cursado o aportes para la mejora de la metodología en futuras cohortes incluyeron mayoritariamente referencias muy favorables como se sintetizan parafraseadas por razones de espacio; “Abordaje novedoso, distinto y forma muy práctica de aprender la materia con cosas de la vida cotidiana”; “Muy buena la forma de aprender y el trabajo en grupos. Divertidos los casos”; “Completo y buenos por ser casos reales. Bueno tener las clases grabadas”; “Metodología dinámica y efectiva y laboratorio y teoría integrados”; “Muy interesante y ayuda a ordenar y dosificar los contenidos en forma accesible y a profundizar conocimientos”; “Cómodo y llamativo ir aprendiendo la materia de esa forma”; “Metodología buena y las puestas en común ayudan a entender cosas que a veces no se advierten”; “Metodología interesante, entretenido y motivante tener que buscar la información. Complejos los cálculos”; “Resolución de casos entretenida y buena la integración de conocimientos. Necesita mayor corrección de los casos en conjunto, para asegurarse que las respuestas están bien”; “Excelente desarrollo de teoría y práctica. Abordaje efectivo para comprender los temas. Costó un poco resolver algunos ejercicios que requieren más práctica y tiempo para mecanizar las habilidades y desarrollarlas”; “Falta teoría o fuentes

confiables para acceder a respuestas concretas”. Además de las ya incluidas en estos comentarios, las observaciones realizadas por aproximadamente la mitad de los alumnos se refieren en su totalidad a aspectos ya analizados en la discusión de los resultados de una mayor intervención conductista por parte de las docentes, de modo de facilitar responder rápidamente las preguntas, sin mayor profundización en los conceptos en los que se basan o disminuir los tiempos para el estudio de cada uno de los temas. También reclaman por más acompañamiento para la resolución de los cálculos estequiométricos aplicados a situaciones concretas que, como ya se ha advertido deberían formar parte de las competencias ya adquiridas antes de comenzar el cursado de los espacios curriculares de referencia. Aún cuando la metodología adaptada pretende fomentar la capacidad de estudio autónomo y la construcción de su conocimiento, se tendrán en cuenta todas las observaciones para el trabajo con próximas cohortes.

4. Conclusiones

La metodología adaptada para el estudio de la totalidad de los contenidos de los espacios curriculares de Análisis de Alimentos mostró alta aceptación y motivación de los estudiantes, aún cuando las deficiencias previas en los hábitos de estudio y competencias genéricas, como capacidad de análisis, síntesis, formulación de conclusiones y aprendizaje autónomo, exigen todavía la instrumentación de acciones de tipo conductista por parte de los docentes. Siendo una situación altamente promisoría, se requeriría que en más asignaturas a lo largo de las respectivas carreras pudieran aplicarse,

en forma habitual, estrategias de enseñanza – aprendizaje más centradas en los alumnos.

5. Referencias

Ausubel, D.P. (1980) *Psicología Educativa. Un punto de vista cognoscitivo*. 2º ed. Español Ed. Trillas, México. ISBN 968-24-0484-3

Baquero, R. (2002). *Del experimento escolar a la experiencia educativa. La “transmisión” educativa desde una perspectiva psicológica situacional*. Perfiles Educativos XXIV (97-98) 57-75

Cobas-Portuondo, J. L., Gómez-Fuentes, H. y González-Reyes, G (2019). *Actividades fundamentadas en el aprendizaje basado en problemas para el desarrollo de los contenidos del área de matemáticas en la universidad*, Revista Atlante: Cuadernos de Educación y Desarrollo (marzo 2019). En línea: <https://www.eumed.net/rev/atlante/2019/03/desarrollo-contenidos-matematicas.html> //hdl.handle.net/20.500.11763/atlante1903desarrollo-contenidos-matematicas

CONFEDI. *Libro verde. Manual de acreditación para carreras de ingeniería en la República Argentina* (2000). Disponible en la página oficial del Consejo Federal de Decanos de Ingeniería <https://confedi.org.ar>

Morales-Bueno, P. y Landa-Fitzgerald, V. (2004) *Aprendizaje basado en problemas. Problem – based learning* Theoria, Vol. 13: 145-157, ISSN 0717-196X

Universidad Nacional de Cuyo. Ord 75/2016 CS; en <https://www.uncuyo.edu.ar/ocs00752016.pdf>

Calibración del proceso de molienda de maíz bajo el enfoque de modelado por elementos discretos

Calibration of the corn milling process under discrete element modeling

Alejandro Gabriel Chiaravalle¹, Jacqueline Claudia Lobos de Ponga¹, Ivana María Cotabarren^{1,2}, Juliana Piña^{1,2}

1. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur (DIQ-UNS), Av. Alem 1253, Bahía Blanca (8000), Buenos Aires, Argentina.
2. Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI-CONICET), Camino La Carrindanga Km7 Bahía Blanca (8000), Buenos Aires, Argentina.

E-mail: achiaravalle@plapiqui.edu.ar

Resumen

En el presente trabajo se realizó la calibración del proceso de molienda de granos individuales de maíz bajo el enfoque de modelado por elementos discretos (DEM), utilizando el modelo de rotura de Tavares, disponible en el software Rocky DEM. Para ello, se realizaron 60 ensayos de compresión controlada sobre granos individuales, empleando un texturómetro (TA instruments). Se registró una cantidad de dos fragmentos generados por rotura, y una energía y potencia de rotura promedio de 0,1013 J y 2,1963 W, respectivamente. Por su parte, la energía y potencia específicas de rotura resultaron en 156,92 J/kg y 3332,66 W/kg, para un grano de maíz cuya forma se aproximó a un paralelepípedo rectangular, de masa promedio de 0,664 g. Estos ensayos fueron replicados en Rocky DEM, implementando el experimento virtual sobre una partícula de forma paralelepípeda generada con la misma masa y forma, previa calibración de los parámetros de rotura correspondientes al modelo. Se logró simular adecuadamente el proceso en DEM, obteniendo los mismos resultados cualitativos de rotura y valores cuantitativos dentro del rango de la distribución de valores experimentales. Los resultados de este trabajo constituyen la base para la posterior implementación del proceso de molienda de maíz en DEM.

Palabras clave: maíz, rotura, calibración, DEM.

Abstract

In the present work, the calibration of individual corn kernels breakage under the discrete element modeling (DEM) approach with the Tavares Breakage model available in Rocky DEM was developed. In order to gather the required experimental information, 60 controlled compression tests were carried out on individual grains, using a texturometer (TA instruments). Two fragments generated by breakage were observed, and an average breakage energy and power of 0.1013 J and 2.1963 W were recorded, respectively. The specific breakage energy and power resulted in 156.92 J/kg and 3332.66 W/kg, for a corn kernel approximated to a rectangular parallelepiped with an average mass of 0.664 g. These tests were replicated in Rocky DEM, implementing the virtual experiment on a particle of parallelepiped shape generated with the same mass and shape, after fitting the corresponding breakage model parameters. The process was adequately simulated in DEM, obtaining the same qualitative breakage results and quantitative values within the range of the distribution of experimental values. The results of this work constitute the base for the subsequent implementation of the corn milling process in DEM.

Keywords: corn, breakage, calibration, DEM.

1. Introducción

La reducción de tamaño o molienda es una operación unitaria fundamental, utilizada en gran variedad de procesos de manufactura en continuo. A pesar de la importancia que reviste, continúa siendo altamente ineficiente debido a la escasez de modelos predictivos adecuados. En este marco, es necesario contribuir a su operación racional mediante el desarrollo de

herramientas de simulación, que combinen el modelado basado en primeros principios con experimentación para su validación.

En la actualidad, resulta relevante abordar la operación en la industria alimentaria, donde la manufactura continua está instalada, pero requiere procesos optimizados. En particular, el maíz constituye uno de los componentes principales de la formulación de diversos alimentos, siendo la

molienda una de las operaciones unitarias de mayor impacto sobre la calidad del producto final.

El tamaño final de las partículas en un proceso de molienda depende de las características del material, el tipo de equipo utilizado y las condiciones operativas (Cotabarren et al., 2008). Por lo tanto, una descripción sistemática de esta operación resulta un desafío.

El método de elementos discretos (discrete element method, DEM) ha alcanzado relevancia para simular operaciones que involucran material particulado (Tavares et al., 2021). En este enfoque, el material se modela como un conjunto de partículas individuales que interactúan entre sí y con los elementos de su entorno, a medida que se mueven a través del espacio y colisionan. Es de naturaleza mecánica y sensible a los parámetros del proceso, la geometría del equipo y las propiedades del material (Barrasso et al., 2015). Si bien los modelos DEM son computacionalmente intensivos y requieren calibración de las propiedades de los materiales, presentan capacidades predictivas más allá que otros enfoques de modelado. La trayectoria y velocidad de cada partícula se calcula en intervalos de tiempo discretos, lo que proporciona información como la frecuencia de colisiones, la duración del contacto y los perfiles de velocidad (Hlosta et al., 2018).

Los primeros estudios de las propiedades de maíz en DEM fueron desarrollados por Coetzee et al. (2009). Los autores replicaron ensayos de compresión y corte, realizados en escala laboratorio, en el entorno de DEM, implementando diferentes modelos con el objetivo de calibrar los coeficientes de fricción intergranulares y entre la partícula y el entorno. González-Montellano et al. (2012) determinaron experimentalmente diversas propiedades del maíz, como los coeficientes de restitución, de fricción, y el módulo de Young. Hlosta et al. (2018) trabajaron exhaustivamente en la medición del coeficiente de restitución intergranular, mediante el ensayo de doble péndulo. Por su parte, Markauskas et al. (2015) implementaron los experimentos sobre granos de maíz en DEM en tres dimensiones, aproximando la partícula a un cúmulo de esferas. Moussaviraad et al. (2017) trabajaron con el flujo de granos de maíz a través de un tornillo transportador, para lo cual determinaron experimentalmente las propiedades físicas y parámetros de interacción. Además, calibraron en el entorno de DEM los correspondientes coeficientes de fricción.

Sin embargo, no se han encontrado a la fecha artículos publicados en los que se describa el proceso de reducción de tamaño del maíz mediante DEM. En el contexto descrito, el objetivo general del presente

trabajo es estudiar el comportamiento de la rotura de granos individuales de maíz en DEM, a partir de ensayos de compresión individuales, registrando la probabilidad de rotura, cantidad de fragmentos generados, y la energía y potencia consumida. Para representar el ensayo de compresión virtual en DEM se utilizó el modelo de Tavares, disponible en Rocky DEM. Los datos experimentales se utilizaron para ajustar los parámetros del modelo y validar las simulaciones.

2. Materiales y métodos

Modelo de contacto en DEM

Las interacciones entre partículas (o entre partículas y su entorno) son evaluadas para cada contacto, modelando el movimiento para cada partícula individual. Fundamentalmente, DEM utiliza las leyes de movimiento de Newton para resolver los balances de fuerza sobre partículas individuales, en intervalos de tiempo discretos (Coetzee et al. 2017). Este método, originalmente propuesto por Cundall y Strack (1979), es capaz de calcular cualquier movimiento mediante la adecuada selección del modelo de contacto, siendo uno de los más utilizados el modelo de Hertz-Mindlin. Descripciones detalladas del mismo pueden encontrarse en la literatura (Coetzee et al., 2017; González-Montellano et al., 2012).

Rocky DEM

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el software Rocky DEM (ESSS). Rocky DEM es un entorno de modelado potente y robusto que cuenta con una serie de herramientas que lo destacan de otros softwares DEM comerciales, tales como el modelado del proceso de rotura basado en fragmentación de poliedros, y la posibilidad de combinar diferentes formas y tamaños de partículas para crear conjuntos muy cercanos a la realidad (de Lima et al., 2021).

Además de la selección del modelo de contacto adecuado, la simulación DEM requiere un conjunto de parámetros de colisión y propiedades del material que deben determinarse cuidadosamente para obtener resultados acertados. Estos incluyen propiedades físicas de los materiales (maíz, y materiales de las superficies de contacto, como metal, madera o plástico), como densidad, módulo de Young, y coeficiente de Poisson; parámetros de interacción entre materiales, como los coeficientes de restitución y de fricción (partícula-partícula y partícula-entorno), macro propiedades, como la densidad a granel, ángulo de fricción interna y ángulo de reposo, utilizados para la posterior calibración de propiedades que no pueden medirse experimentalmente; y

distribuciones de forma y tamaño de las partículas (particle size distribution, PSD). Dichas propiedades fueron determinadas con anterioridad por el grupo de trabajo (Quezada Henry et al., 2020) mediante la realización de ensayos experimentales y su posterior replicación en Rocky DEM.

Modelo de Rotura

Rocky DEM cuenta, entre otros, con el modelo de rotura desarrollado por Tavares et al. (2010). Este modelo comprende una serie de ecuaciones que describen la fragmentación de partículas sujetas a estrés de magnitudes variadas (Rocky DEM, 2021). Específicamente, evalúa la energía asociada a cada contacto para determinar si ocurrirá rotura, comparándola con la energía de fractura particular del material, y genera una distribución de fragmentos en base a al algoritmo de fragmentación de Laguerre-Voronoi (Tavares et al., 2020). Mediante el correcto ajuste de sus parámetros, este modelo es idealmente capaz de representar la rotura de cualquier material.

Cálculos del modelo

Las energías específicas de fractura de partícula en sucesivos eventos de carga sin fractura pueden cuantificarse con la ecuación (1):

$$E_n = E_{n-1} \cdot (1 - D_n^*) \quad (1)$$

siendo D_n^* el daño sostenido en el n-ésimo ciclo de carga, igual a la ecuación (2):

$$D_n^* = [2\gamma / (2\gamma - 5D_n^* + 5) \cdot (E_{k,n} / E_{n-1})]^{(2\gamma/5)} \quad (2)$$

donde γ es el coeficiente de acumulación de daño.

La distribución de tamaño de los fragmentos generados por los impactos de energía específica $E_{k,n}$ sobre partículas de una misma clase, se calcula estimando la fracción del material que pasa a 1/10 del tamaño original de partícula (t_{10}) mediante la ecuación (3):

$$t_{10} = A [1 - \exp(-b \cdot E_{k,n}/E)] \quad (3)$$

donde A y b' son parámetros del modelo, y E es la energía específica de fractura de las partículas que se rompen con una energía de impacto $E_{k,n}$. La PSD completa puede ser expresada mediante la función Beta Incompleta.

Se ha demostrado que al volverse más finas las partículas, se tornan también más duras y se incrementa su energía específica de fractura. La ecuación (4) se utiliza para describir esta variación, calculando la variación en la mediana de la distribución de energías (E_{50}):

$$E_{50} = E_{\infty} \cdot [1 + (d_0/d)^{\varphi}] \quad (4)$$

donde d_0 , E_{∞} y φ son parámetros del modelo que se ajustan con datos experimentales, y d es el tamaño medio de las partículas. Estos parámetros varían significativamente según el tipo de material. La ecuación (5) define la distribución de la energía específica de fractura como:

$$P_0(E) = 1/2 [1 + \operatorname{erf} (\ln(E^*) - \ln(E_{50}) / (2\sigma^2)^{1/2})] \quad (5)$$

Donde σ^2 es la varianza de la distribución normal logarítmica de energías de fractura, E_{50} es la mediana de energía específica media de fractura y E^* es la energía específica relativa de fractura, obtenida mediante la ecuación (6):

$$E^* = (E_{\max} \cdot E) / (E_{\max} - E) \quad (6)$$

donde E_{\max} es la máxima energía específica de fractura de una distribución.

Los parámetros que afectan la rotura son inherentes a cada modelo. Para obtener sus valores, se deben implementar experimentos de rotura sobre partículas individuales, o realizar simulaciones en el entorno de DEM ajustándolos hasta obtener resultados (Tavares et al., 2020).

Ensayos experimentales

Se realizaron un total de 60 ensayos de compresión sobre granos de maíz individuales. El equipo empleado fue un texturómetro (TA Instruments, ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Este equipo consiste en una celda que aplica condiciones controladas de tensión a muestras de alimentos, midiendo su perfil completo de textura. Permite determinar con precisión la fuerza y la posición de la compresión a cada instante de tiempo.

Los ensayos fueron realizados a velocidad constante, modificando su valor en las sucesivas pruebas para determinar su influencia sobre la fracturabilidad del maíz, entre 1 y 10 mm/min.

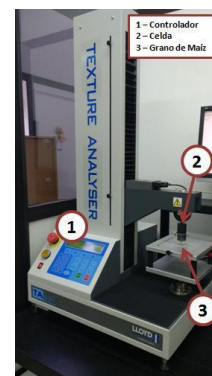


Figura 24. Texturómetro utilizado en los ensayos.

La carga máxima para el equipo se fijó en 500 N para todos los ensayos, mientras que el límite de compresión establecido dependió de la orientación del grano hacia la celda.

La celda utilizada es cilíndrica, de modo de que la superficie de contacto entre la misma y el maíz es plana.

El criterio de selección de los granos de maíz consistió en identificar aquellos de dimensiones similares entre sí, siendo éstas la altura A, longitud B, y espesor E, asemejando la forma del grano a un paralelepípedo rectangular (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). A su vez, estas dimensiones determinan los planos AB, AE y BE, de modo que los ensayos se realizaron orientando uno de estos tres planos de cara a la celda. Las medidas fueron tomadas empleando un calibre digital.

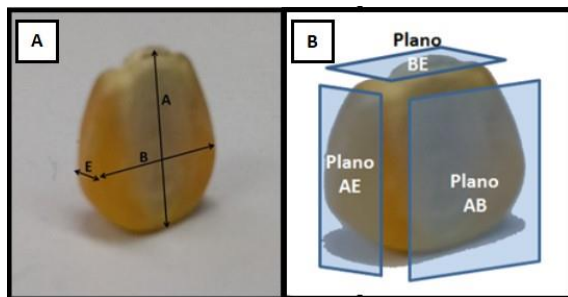


Figura 25. A) Medidas de un grano de maíz. B) Planos de un grano de maíz.

Los granos presentan una parte convexa denominada germen, la cual debió ser tenida en cuenta en los ensayos realizados colocando el plano AB de cara a la celda, debido a que altera la superficie de contacto celda-grano (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).



Figura 26. A) Grano con el germen hacia arriba, de cara a la celda. B) Grano con el germen hacia abajo.

Al aproximar los granos a un paralelepípedo, se determinó su masa mediante la ecuación (7).

$$m = A \cdot B \cdot E \cdot \rho \quad (7)$$

Donde m es la masa del grano aproximado, A, B y E son sus medidas, y ρ es la densidad del maíz. Esta fue determinada mediante picnometría (Quezada Herny et al., 2020), resultando en un valor de 1.231 kg/m³.

Energía y potencia de rotura

La energía de rotura fue calculada multiplicando el desplazamiento de la celda por el correspondiente valor de fuerza registrada en cada intervalo de tiempo, y posteriormente realizando la sumatoria de todos los valores de energía entre el instante de inicio del contacto celda-grano y el instante de rotura, para obtener la energía de rotura acumulada.

Por su parte, para determinar la potencia, se dividió la energía calculada para cada punto por su correspondiente intervalo de tiempo, obteniendo la potencia puntual. De manera análoga a la energía, se procedió a sumar todos estos valores para obtener la potencia acumulada a la primera rotura.

Ajuste de parámetros del modelo

En general (Rocky DEM, 2021), para realizar la estimación de los parámetros de rotura del modelo de Tavares, se debe evaluar la energía de rotura registrada de los ensayos realizados sobre cada clase de tamaño que constituye la muestra, integrando luego la fuerza por el desplazamiento del modo descrito en la sección 2.4.1. (Rocky DEM, 2021). La distribución de energía específica constituye entonces la base de cálculo.

$$\sigma^2 \text{ y } E_{50}$$

En primer lugar, se debe determinar la distribución del logaritmo de la energía específica, a la cual se le calcula la varianza al cuadrado para obtener el primer parámetro, σ^2 . Posteriormente, la mediana de la distribución de energía específica, E_{50} , se obtiene de la ecuación (8):

$$E_{50} = 10^{\text{promedio}[\log(E)]} \quad (8)$$

$$E_{\infty}, d_0 \text{ y } \varphi$$

Realizando este procedimiento para todas las clases, es posible graficar E_{50} vs el tamaño medio de cada clase, con el fin de ajustar la curva descrita por la ecuación (4) y obtener el valor de los parámetros E_{∞} , d_0 y φ . Dado que el maíz seleccionado para este trabajo pertenece a una única clase de tamaño, se decidió establecer d_0 y φ en los valores por defecto (Rocky DEM, 2021) e iguales a 400 mm y 0,45, respectivamente, y se despejó E_{∞} de la ecuación (4).

Por lo tanto, el tamaño d utilizado en la ecuación (4) fue la mayor dimensión de los granos aproximados a paralelepípedos rectangulares, es decir, la diagonal del plano AB, cuyo valor promedio resultó igual a 16,80 mm.

A y b'

En general, el cálculo de A y b' implica la obtención del t_{10} de sucesivas pruebas realizadas sobre la energía de compresión o de impacto creciente, mediante el posterior tamizado de los fragmentos generados. Esto permite generar una curva de t_{10} en función de la relación entre la energía de impacto y la E_{50} ($E_{k,n}/E_{50}$), para ajustar A y b' de la ecuación (3).

Debido a que en este trabajo se realizaron experimentos de compresión de maíz a un único rango de energía, se decidió implementar un método de ajuste más sencillo, que consistió en modificar iterativamente los valores de A y b' en Rocky DEM hasta obtener resultados de rotura similares a la realidad, analizando exclusivamente la PSD generada.

Función Beta Incompleta

La función Beta Incompleta, generalización de la Integral de Euler, es una función que suele utilizarse en aplicaciones probabilísticas para definir densidades de población acumulada en intervalos de clase. Graficar los diferentes t_n (t_2 , t_4 , t_{25} , t_{50} y t_{75}), es decir, la cantidad porcentual de fragmentos que pasan $1/n$ del tamaño original de la partícula, en función del t_{10} , permite obtener los valores de esta función para todos los tamaños necesarios y así construir la PSD completa.

En este trabajo y en función de la PSD obtenida en los ensayos experimentales, se decidió asignar valores a las variables de la función Beta Incompleta para cada uno de los t_n , de modo de obtener la misma PSD al simular los ensayos en Rocky DEM.

Por último, se dejó el parámetro de acumulación de daño γ , en su valor por defecto, igual a 5.

E_{min} , E_{max} y tamaño mínimo

E_{min} es la mínima energía específica que puede causar daño a una partícula, la cual suele definirse en 1 J/kg para aplicaciones como molienda (Rocky DEM, 2021). Por su parte, E_{max} , descrita en la sección Cálculos del modelo, debe determinarse de la distribución de energías.

El tamaño mínimo de fragmentos generables es un parámetro inherente al modelo que no se encuentra en las ecuaciones explícitas de la sección de Cálculos del

modelo, pero que es utilizado en el código de Rocky DEM como límite del tamaño que pueden tener los fragmentos generados tras un evento de tensión. Dependiendo de la operación que se quiera simular, su valor se establece en una fracción del tamaño original promedio de las partículas.

Implementación de los ensayos en Rocky DEM

Se realizaron sucesivas simulaciones en el entorno de Rocky DEM, reproduciendo los ensayos experimentales. Se generó una única partícula de masa igual al promedio de la distribución de masa de los granos aproximados como paralelepípedos rectangulares. Se decidió emplear una partícula virtual poliédrica (polyhedron en Rocky DEM, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), cuyas dimensiones fueron determinadas de modo de conservar las proporciones de los granos reales y de no afectar considerablemente el tiempo de cómputos (Quezada Henry et al. 2020). El tamaño de la partícula definido fue el diámetro de una esfera de volumen equivalente al volumen promedio de los granos aproximados a paralelepípedos rectangulares, siendo este diámetro equivalente la opción de tamaño elegida para representar la partícula en DEM. Este diámetro fue de 10,10 mm, para un volumen promedio de 539,46 mm³.

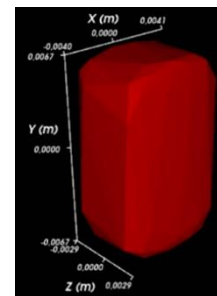


Figura 27. Partícula poliédrica generada en Rocky DEM.

Los materiales definidos fueron el maíz con sus propiedades, y el metal (acero inoxidable) de la celda y la base donde se apoya el grano para su compresión. Se generó una celda de iguales dimensiones y masa que la celda real, y se programó la simulación para que la celda descendiera a una velocidad constante de 10 mm/min.

Se llevaron a cabo sucesivas iteraciones modificando propiedades de la simulación, como el tiempo neto de descenso de la celda a velocidad constante, el coeficiente de fricción partícula-entorno entre la base metálica y la partícula de maíz (para evitar su deslizamiento ante la presión de la celda), la posición de la partícula al inicio de la simulación, y parámetros

del modelo de rotura inherentes al software, como el tamaño mínimo de fragmentos generables.

Se analizó la fuerza sobre la partícula al momento de rotura, la energía, potencia, energía específica y potencia específica, desde el instante en que se inicia el contacto partícula-celda hasta que ocurre la rotura. Se estudiaron los parámetros y variables a ajustar en el software para alcanzar una distribución de fragmentos igual a la experimental.

Se realizaron un total de 10 réplicas de cada simulación. Del total de 10 corridas, se tomó el promedio de cada resultado como valor final a reportar.

3. Resultados y Discusión

PSD experimental y ensayos de rotura

Se realizaron un total de 60 ensayos de rotura, registrando la ocurrencia o no de la misma. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 2. Probabilidad de rotura.

Ensayos	60	Germen hacia arriba	32
		Germen hacia abajo	28
Rotura	33 / 60	Germen hacia arriba	20 / 32
		Germen hacia abajo	13 / 28

Es posible observar que, de orientar el germen hacia la celda, el grano ofrece una menor resistencia a la compresión. Por otro lado, incrementar la velocidad de descenso de la celda entre ensayos no resultó en una mayor probabilidad de fractura (datos no mostrados).

Los perfiles registrados de fuerza vs tiempo y fuerza vs desplazamiento (Figura 5) permitieron observar que, una vez iniciado el contacto entre la celda y el grano, la fuerza crece siguiendo una tendencia lineal. El punto en el que ocurre la rotura se evidencia como una caída abrupta en la curva, debido a que la presión ejercida rompe el grano y se altera la superficie de contacto. A partir de este instante, la celda continúa ejerciendo presión sobre los fragmentos generados, de modo que la curva de fuerza comienza a crecer nuevamente.

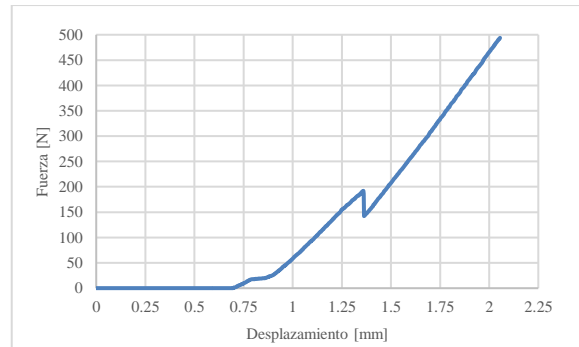


Figura 28. Gráfico de fuerza vs desplazamiento de uno de los ensayos realizados.

Para el análisis de energía y potencia de rotura, se tomó en cuenta el primer evento de rotura exclusivamente. Un 27% de los ensayos presentaron una o más roturas sucesivas, denotadas en el gráfico como sucesivas caídas abruptas en la pendiente de la curva.

La PSD generada fue de dos fragmentos para un 97% de los primeros eventos de rotura. Los granos se rompieron a lo largo de su eje vertical (plano AB) en dos fragmentos simétricos, como se observa en la Figura 6.



Figura 29. PSD generada.

Energía y potencia de rotura

En la Tabla 2 se presentan los valores promedio de energía y potencia de rotura junto con la masa considerada para la determinación de la energía y potencia específica, para los 33 ensayos en los que ocurrió una rotura.

Tabla 3. Resultados experimentales.

Parámetro	Valor
Masa de paralelepípedos [g]	0,664
Energía de Rotura [J]	0,1013
Energía Específica [J/kg]	156,92
Fuerza al momento de rotura [N]	260,46
Potencia de Rotura [W]	2,1963
Potencia Específica [W/kg]	3.332,66

En las Figuras 7 y 8 se presentan las distribuciones normales de energía y potencia específicas obtenidas, respectivamente.

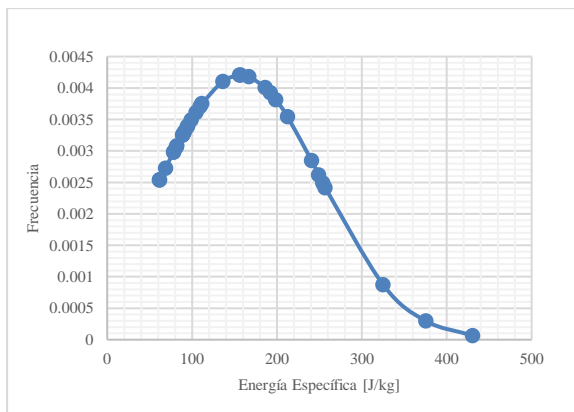


Figura 30. Distribución normal obtenida para la energía específica de rotura.

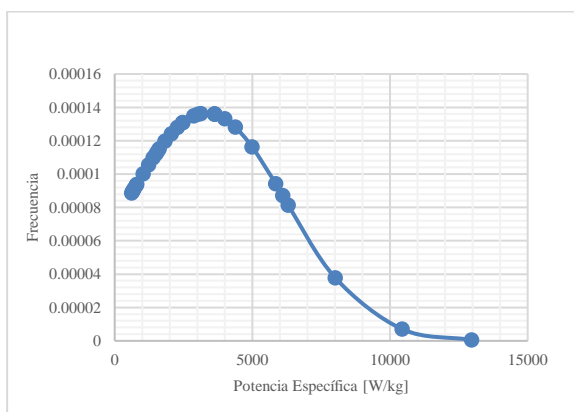


Figura 31. Distribución normal obtenida para la energía potencia de rotura.

Del análisis de las figuras anteriores, se observa que las distribuciones son simétricas, pero cuentan con valores muy por encima del promedio. Por otro lado, el máximo y mínimo valor registrados forman un amplio espectro de valores posibles.

Cabe mencionar que no se registraron tendencias en la fuerza, energía o potencia obtenida según la orientación del germen o entre ellas.

Parámetros de rotura

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del proceso de ajuste experimental de parámetros del modelo de Tavares.

Tabla 4. Parámetros de rotura ajustados.

σ^2 [-]	0,0566	E_{max} [J/kg]	430,56
E_{∞} [J/kg]	26,07	E_{50} [J/kg]	134,63

Φ [-]	0,45	E_{max} / E_{50}	3,20
d_0 [mm]	400	γ [-]	5

Además, los valores para la función Beta Incompleta se presentan en la Tabla 4.

Tabla 5. Valores ajustados para la función Beta Incompleta.

t_n	Alpha	Beta	t_n	Alpha	Beta
1.2	0.001	15	25	5	0.1
1.5	0.001	15	50	5	0.1
2	0.001	15	75	5	0.1
4	0.5	10			

Simulaciones en Rocky DEM

Se implementó el sistema experimental en el entorno de Rocky DEM, generando una única partícula con una celda de velocidad de descenso constante, y asignando los valores obtenidos para los parámetros de rotura. Posteriormente, y para ajustar los parámetros restantes del modelo que no son posibles de determinar experimentalmente, se realizaron sucesivas simulaciones hasta replicar las PSD obtenida en los ensayos. De esta forma, los parámetros restantes del modelo son el tamaño mínimo de fragmentos generables, la mínima energía específica, y los parámetros A y b' de la ecuación (3). Los resultados se presentan en la Tabla 5. En la Tabla 6, se presentan las dimensiones de la partícula generada en DEM.

Tabla 6. Parámetros obtenidos el DEM.

A [-]	0,01	E_{min} [J/kg]	1
b' [-]	0,033	Tamaño mínimo [mm]	4

Tabla 7. Dimensiones de la partícula poliédrica en DEM.

Relación de aspecto vertical	1,60	Número de Esquinas	60
Relación de aspecto horizontal	0,70	Grado súper-cuadrático	10,00

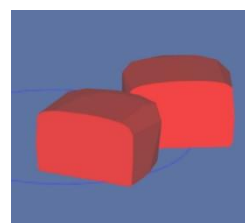


Figura 32. Fragmentos generados en DEM.

Se logró obtener una PSD de dos fragmentos para el primer evento de rotura en todas las réplicas realizadas de las simulaciones, la cual se muestra en la Figura 9. Los fragmentos mostraron dimensiones similares entre sí, al igual que los fragmentos en los ensayos experimentales. Se analizaron la fuerza, energía y potencia del proceso de rotura, de manera análoga a los ensayos experimentales. Se observó que los gráficos de fuerza vs tiempo y fuerza vs desplazamiento siguen una tendencia creciente; no obstante, la curva presenta picos y descensos, en lugar de un crecimiento continuo hasta la fractura. Esto se debe a que la partícula simulada no presenta la concavidad que poseen los granos reales (germen), por lo que es ligeramente desplazada de su posición por la presión de la celda, generando disipación de energía cinética. Esto no se observa en los casos experimentales, en los cuales el grano permanece inmóvil durante todo el ensayo. En la Figura 10 se presenta, a modo de ejemplo, la curva obtenida para una de las simulaciones, y en la Tabla 7 se encuentran los resultados cuantitativos promediados de todas las réplicas de simulaciones realizadas. Por último, cabe destacar que la distribución de energía y potencia específicas obtenidas en DEM son más acotadas que las experimentales, lo cual se observa en las Figuras 11 y 12.

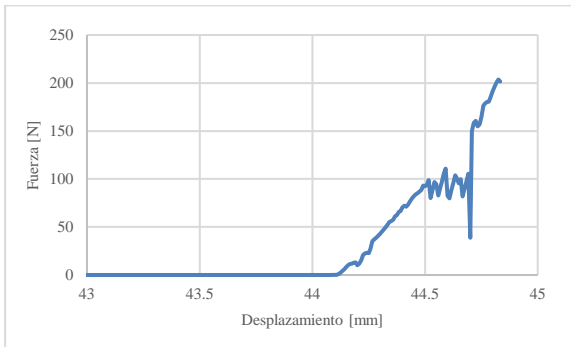


Figura 33. Fuerza vs desplazamiento de una de las réplicas en DEM.

Tabla 8. Resultados en Rocky DEM.

Fuerza al momento de rotura [N]	Energía de Rotura [J]	Potencia de Rotura [W]	Energía específica de Rotura [J/kg]	Potencia específica de Rotura [W/kg]
116,49	0,04479	0,89581	67,46	1349,11

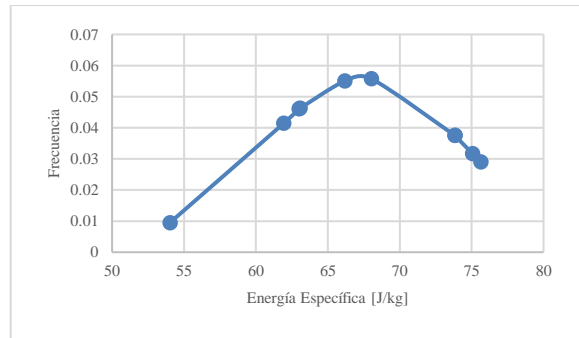


Figura 34. Distribución normal obtenida para la energía específica rotura en DEM.

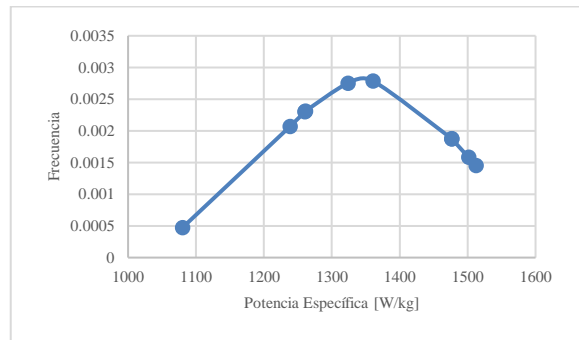


Figura 35. Distribución normal obtenida para la potencia específica rotura en DEM.

La Figura 13 presenta una curva de fuerza vs tiempo experimental junto con una generada en una simulación en DEM. Como se observa, ambas presentan la misma tendencia creciente hasta el momento de rotura, con diferencias en la pendiente que se atribuyen a la disipación de energía cinética que ocurre en la simulación. Consecuentemente, el valor de fuerza alcanzado al momento de rotura es más bajo en DEM que en su contraparte experimental.

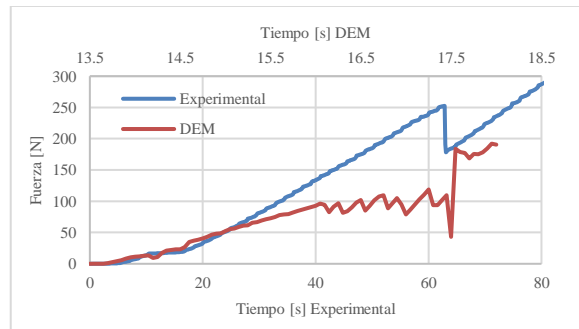


Figura 36. Fuerza vs tiempo experimental y simulado.

Por último, las Figuras 14 y 15 presentan las distribuciones de valores obtenidas experimentalmente para energía y potencia específicas, respectivamente, junto con el valor

promedio obtenido para dichas variables en DEM (Tabla 8). Puede verse que el resultado de DEM se encuentra dentro del rango de distribución de valores experimentales, aunque más cercano al límite inferior. Nuevamente, es posible atribuir la diferencia en el valor promedio obtenido a la disipación de energía por el movimiento de la partícula que se da en las simulaciones, debido a la ausencia del germen cóncavo que poseen las partículas reales.

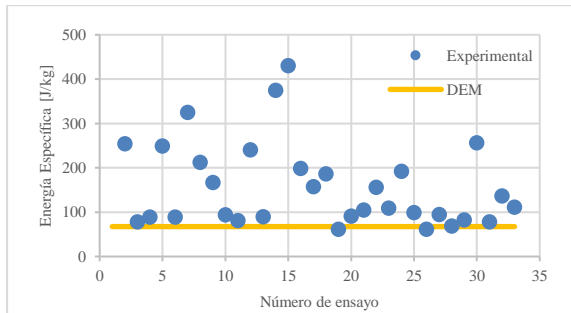


Figura 37. Distribución de energía específica de rotura.

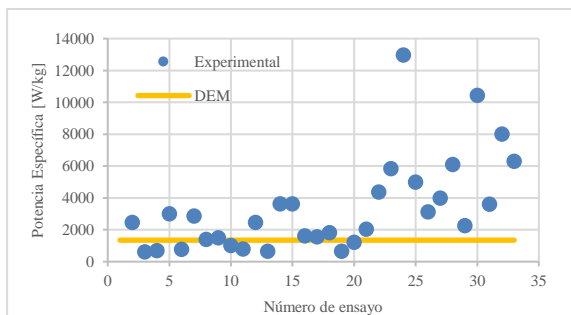


Figura 38. Distribución de potencia específica de rotura.

4. Conclusiones

Se logró ajustar adecuadamente los parámetros de rotura del modelo de Tavares para el maíz, implementando con éxito la fractura de partículas individuales en el software Rocky DEM. El modelo, tradicionalmente empleado para materiales de la industria minera, mostró ser satisfactorio para el modelado de un material de la industria alimenticia.

Se obtuvo una PSD acorde a la experimental, y energía y potencia de rotura dentro del rango de valores de las distribuciones obtenidas experimentalmente.

A futuro, se continuará trabajando en la obtención de datos experimentales en equipos de molienda de maíz a escala laboratorio y piloto, y se procederá a su

simulación en Rocky DEM, a partir de los parámetros ajustados para la rotura en la escala partícula.

5. Referencias

Barrasso, D., Eppinger, T., Pereira, F. E., Aglave, R., Debus, K., Bermingham, S. K., and Ramachandran, R. (2015). *A multi-scale, mechanistic model of a wet granulation process using a novel bi-directional PBM-DEM coupling algorithm*. Chemical Engineering Science, 123, 500–513.

Coetzee, C. J. (2017). *Review: Calibration of the discrete element method*. Powder Technology, 310, 104–142.

Coetzee, C. J., and Els, D. N. J. (2009). *Calibration of granular material parameters for DEM modelling and numerical verification by blade-granular material interaction*. Journal of Terramechanics, 46, 15–26.

Cotabarren, I. M., Schulz, P. G., Bucalá, V., and Piña, J. (2008). *Modeling of an industrial double-roll crusher of a urea granulation circuit*. Powder Technology, 183 (2), 224–230.

Cundall, P., and Strack, O. (1979). *A discrete numerical model for granular assemblies*. Geotechnique, 29 (2), 47–65.

de Lima, G. H., Nogueira, L., and Bharadwaj, R. (2021). *Particle breakage models for predicting comminution process in Rocky DEM*. Rocky DEM. Disponible en: [<https://rocky.esss.co/library/>]. Fecha de acceso: 1-11-2021.

González-Montellano, C., Gómez, Á. R., Fuentes, J. M., and Ayuga, F. J. (2012). *Determination of the mechanical properties of maize grains and olives required for use in DEM simulations*. Journal of Food Engineering, 111, 553–562.

Hlosta, J., Žurovec, D., Rozbroj, J., Ramírez-Gómez, Á., Nečas, J., and Zegzulka, J. (2018). *Experimental determination of particle-particle restitution coefficient via double pendulum method*. Journal of Chemical Engineering Research and Design, 135, 222–233.

Markauskas, D., Ramírez-Gómez, A., Kacianauskas, R., and Zdancevicius, E. (2015). *Maize grain shape approaches for DEM modelling*. Computers and Electronics in Agriculture, 118, 247–258.

Mousaviraad, M., Tekeste, M., and Rosentrater, K. A. (2017). *Calibration and Validation of a Discrete Element Model of Corn Using Grain Flow Simulation in a Commercial Screw Grain Auger*. Agricultural and Biosystems Engineering, Iowa State University.

Quezada Henry, M., Chiaravalle, A. G., Piña, J., y Cotabarren, I. M. (2020). *Modelado mecánico de*

procesos de molienda de maíz: Calibración de parámetros para el modelado por elementos discretos (DEM). International Conference of Production Research – Americas 2020.

Rocky DEM (2021). *Tavares Breakage Model Description & Calibration Guidelines*. Disponible en: [<https://rocky.esss.co/library/>]. Fecha de acceso: 1-11-2021.

Tavares, L. M., and André, F. P. (2020). *Simulating a laboratory-scale cone crusher in DEM using polyhedral particles*. Powder Technology, 372, 362-371.

Tavares, L. M., and Carvalho, R. (2010). *A mechanistic model of batch grinding in ball mills*. XXV INTERNATIONAL MINERAL PROCESSING CONGRESS (IMPC) 2010, 1287-1297.

Tavares, L. M., Rodríguez, V.A., Sousani, M., Pardos, C. B., and Ooi, J. Y. (2021). *An effective sphere-based model for breakage simulation in DEM*. Powder Technology, 392, 473-488.

Cristalización isotérmica de poli(ϵ -caprolactona) en copolímeros en estrella y ramificados

Isothermal crystallization of poly(ϵ -caprolactone) in star-grafted copolymers

María Carolina Giaroli^{1,2}, Franco Leonardo Redondo^{1,2}, Augusto G.O. De Freitas³,
Andrés Eduardo Ciolino^{4,5}, Ninago Mario Daniel^{1,2}

4. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael (5600), Mendoza, Argentina.
5. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (C1425FQB), Buenos Aires, Argentina.
6. Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Rua Luiz Joaquim de Sá Brito, Itaqui, RS 97650-000, Brazil.
7. Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI-CONICET), Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca (8000), Buenos Aires, Argentina.
8. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Sur (DIQ-UNS), Av. Alem 1253, Bahía Blanca (8000), Buenos Aires, Argentina.

E-mail: cgiaroli@fcai.uncu.edu.ar

Resumen

Las propiedades fisicoquímicas en los polímeros semicristalinos dependen, entre otras características, de su estructura química y de las condiciones de cristalización empleadas. Por ejemplo, el tamaño de los cristales, el grado de cristalinidad y la microestructura de las entidades cristalinas formadas pueden modificarse variando las condiciones de cristalización. Por esta razón, el estudio cinético del proceso de cristalización es una herramienta usada para modelar y predecir propiedades físicas finales en polímeros semicristalinos, como así también para cuantificar las barreras de energía asociadas con el proceso de nucleación y crecimiento de cristales. En este trabajo se estudió la cristalización isotérmica de copolímeros en estrella poli(HEMA-*g*-PCL)₃ sintetizados a partir de la combinación simultánea de polimerizaciones por apertura de anillo (ROP) y adición, fragmentación y transferencia reversible de cadena (RAFT), empleando ϵ -caprolactona (PCL) y 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) monómeros. Los poli(HEMA-*g*-PCL)₃ obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente mediante Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y Cromatografía por exclusión de tamaños (SEC). Mediante Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Análisis termogravimétrico (TGA) se determinaron sus transiciones de fase y su estabilidad térmica. Por otra parte, la cinética de cristalización isotérmica se estudió por DSC comparando PCL homopolímero lineal y los copolímeros sintetizados. Mediante la teoría de Hoffman-Weeks (H-W) se obtuvieron parámetros cinéticos de interés tales como: velocidad de crecimiento y constante de nucleación secundaria. Como resultados más importantes, los poli(HEMA-*g*-PCL)₃ sintetizados exhibieron masas molares comprendidas entre 27.700 y 61.100 g mol⁻¹, con dispersiones (\bar{D}) menores a 1,7. Mediante SEC y FTIR se confirmó la presencia de PCL y PHEMA en los materiales finales. En cuanto a los parámetros evaluados mediante la teoría de H-W, los copolímeros presentaron valores de velocidad de crecimiento global y de constante de nucleación secundaria menores a los obtenidos para el PCL homopolímero lineal como consecuencia de la estructura ramificada final obtenida.

Palabras clave: Síntesis controlada, poli(ϵ -caprolactona), poli(2-hidroxietilmetacrilato), cristalización isotérmica.

Abstract

Physicochemical properties of semicrystalline polymers depend, among other characteristics, on their chemical structures and the crystallization conditions used. For example, the size of the crystals, the degree of crystallinity and the microstructure of the crystalline entities formed can be modified by varying the crystallization conditions. In this sense, the kinetic study of the crystallization process is used to predict final physical properties in semicrystalline polymers, as well as to quantify the energy

barriers associated with the process of nucleation and crystal growth. In this work, the isothermal crystallization of poly(HEMA-g-PCL)₃ star-grafted copolymers synthesized by the combination of simultaneous ring-opening polymerization (ROP) and reversible chain addition, fragmentation and transfer (RAFT) polymerization was studied, using ϵ -caprolactone (PCL) and 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) as monomers. Poly(HEMA-g-PCL)₃ copolymers were physicochemically characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Size exclusion chromatography (SEC). By using Differential scanning calorimetry (DSC) and Thermogravimetric analysis (TGA), their thermal transitions and stability were determined. Moreover, the isothermal crystallization kinetics was studied by using DSC technique comparing a linear PCL homopolymer with the synthesized copolymers. By using the Hoffman-Weeks (H-W) theory, kinetic parameters of interest were obtained such as: growth rate and secondary nucleation constant. As more important results, the synthesized poly(HEMA-g-PCL)₃ copolymers exhibited molar masses between 27,700 and 61,100 g mol⁻¹, with dispersion values (\bar{D}) less than 1.7. SEC and FTIR analysis confirmed the presence of PCL and PHEMA in the final materials. Regarding the parameters evaluated using the H-W theory, copolymers presented values of global growth rate and secondary nucleation constant lower than those obtained for the linear homopolymer PCL as a consequence of the final branched structure obtained.

Keywords: Controlled synthesis, poly(ϵ -caprolactone), poly(2-hydroxyethylmethacrylate), isothermal crystallization.

1. Introducción

Las mezclas físicas de polímeros semicristalinos con estructuras químicas diferentes presentan segregación de fases como consecuencia de la escasa o nula compatibilidad termodinámica que existe entre los materiales que la conforman. La síntesis controlada de copolímeros surge como una alternativa efectiva que permite combinar dos o más homopolímeros termodinámicamente incompatibles en una misma molécula, obteniendo materiales con propiedades híbridas finales. Por ejemplo, seleccionando polímeros con diferentes temperaturas de transición vítrea (T_g) y fusión (T_m), se pueden obtener materiales que presenten temperaturas de fusión intermedias y diferentes grados de cristalización, ampliando o modificando sus potenciales usos tecnológicos.

Particularmente, la transformación de un polímero desde su estado fundido a un arreglo semicristalino no es instantánea, y se requieren dos procesos básicos. Primero, la iniciación o nucleación, en la cual aparece una nueva fase que se desarrolla dentro de la fase amorfa fundida en la que se encuentra. El segundo proceso involucra el crecimiento de la nueva fase a expensas de la fase amorfa donde está integrado el núcleo. Para describir el proceso, variables como la velocidad global de cristalización y el tiempo medio pueden calcularse a partir de dos magnitudes: la velocidad de formación de núcleos y la velocidad de crecimiento de tales núcleos hasta formar el agregado cristalino final (Ninago, 2012). Por esta razón, el estudio cinético del proceso de cristalización es una herramienta útil para predecir el comportamiento de polímeros semicristalinos.

La poli(ϵ -caprolactona), PCL, es un poliéster semicristalino alifático e hidrófilo con una temperatura de fusión relativamente baja (~60 °C)

que lo convierte en un excelente candidato para aplicaciones técnicas, tales como el desarrollo de materiales para impresión 3D (Redondo et al., 2018), y de membranas de porosidad controlada (Malikmammadov et al., 2017). Por su parte, el poli(2-hidroxiethyl metacrilato) (PHEMA), es un polímero biocompatible empleado para producir dispositivos oculares debido a su capacidad para formar geles en contacto con el agua (Pamfil, et al., 2017). Los copolímeros en bloque, segmentados o por injerto constituyen una clase particular de macromoléculas capaces de autoensamblar en estructuras supramoleculares complejas por enfriamiento, calentamiento o en presencia de disolventes selectivos (Ninago et al., 2010). Por esta razón, el estudio de los procesos de cristalización isotérmica en polímeros injertados y/o en estrella constituidos por bloques semicristalinos contribuye a la comprensión y predicción de sus propiedades finales.

En este trabajo se empleó la combinación simultánea de polimerizaciones por apertura de anillo (ROP) y por adición, fragmentación y transferencia reversible de cadena (RAFT) para sintetizar copolímeros en estrella y ramificados P(HEMA-g-PCL)₃. Los materiales obtenidos se caracterizaron fisicoquímicamente por cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Su estabilidad térmica y sus transiciones de fase se determinaron mediante análisis termogravimétrico (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC), respectivamente. Finalmente, empleando la teoría de Hoffman-Weeks, se estudió la cinética de cristalización isotérmica en los P(HEMA-g-PCL)₃ sintetizados.

2. Materiales y métodos

Síntesis de copolímeros en estrella y ramificados

Monómeros, reactivos y solventes de grado analítico (ϵ -CL y HEMA monómeros, difenilfosfato DPP, 1,1'-azo bis(ciclohexano-carbonitrilo), VAZO 88 catalizador, tolueno y metanol) se emplearon sin tratamientos previos.

Para la síntesis de los copolímeros ramificados, en un matraz Schlenk seco y equipado con una barra magnética se colocaron HEMA ϵ -CL monómeros, el agente de transferencia CTA y los catalizadores ROP y RAFT (DPP y VAZOTM-88). En la Figura 1 se muestra el mecanismo de síntesis propuesto, el cual ha sido probado con éxito en trabajos previos del grupo (Ninago et al., 2019).

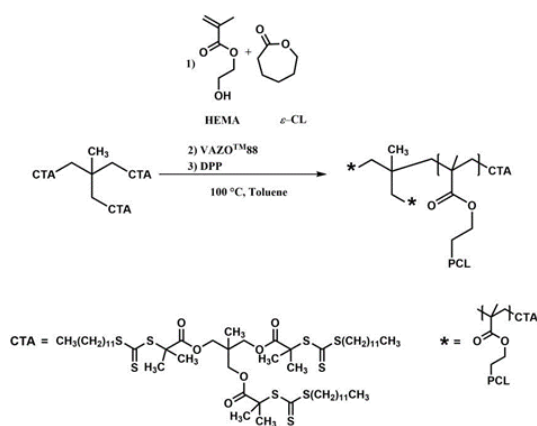


Figura 39. Mecanismo propuesto para la síntesis de copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ en estrella y ramificados.

Todos los reactivos se solubilizaron en tolueno antes de comenzar la reacción, para dar una solución monofásica translúcida. La mezcla se purgó con nitrógeno durante 30 minutos. A continuación, el matraz Schlenk se sumergió en un baño de aceite y la reacción de síntesis se llevó a cabo a 100 °C bajo atmósfera de nitrógeno (Figura 2). El aumento de viscosidad con el tiempo de reacción (ver Tabla 1) es un indicio cualitativo del éxito de la síntesis. Los copolímeros resultantes se precipitaron en metanol frío, se filtraron y se secaron en estufa de vacío durante 24 h, a temperatura ambiente, para su posterior caracterización.



Figura 40. Equipo de polimerización empleado para la síntesis de copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃.

Caracterización de los copolímeros en estrella y ramificados

Las masas molares y la dispersión (\mathbb{D}) de los copolímeros sintetizados se determinaron mediante cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), empleando un sistema construido con una bomba de HPLC Waters 515 y un refractómetro diferencial Waters modelo 410, equipado con tres columnas lineales PLGel de lecho mixto y una pre-columna con un tamaño de perla de 5 μm (PLGel). El disolvente de elución empleado fue tolueno, a una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} a temperatura ambiente. El volumen de inyección fue de 200 μL y se utilizaron estándares de poliestireno (PS) para la calibración. Las constantes de calibración de Mark-Houwink utilizadas fueron: $K_{PS} = 0,012 \text{ mL g}^{-1}$, $\alpha_{PS} = 0,71$ para PS y $K_{PCL} = 1,395 \cdot 10^{-4} \text{ mL g}^{-1}$, $\alpha_{PCL} = 0,786$ para PCL (Gan et al, 1996). Los copolímeros obtenidos se denominaron COP1, COP2 y COP3, ordenados por masas molares crecientes según los valores determinados por SEC (Tabla 1).

Mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se identificaron señales características de los copolímeros. Los espectros FTIR-ATR (con reflectancia total atenuada) se obtuvieron en un espectrómetro Nicolet iS5, (iD5-ATR7) con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 escaneos de acumulación en el rango 550 - 4000 cm^{-1} , empleando un cristal de seleniuro de zinc (ZnSe).

Las transiciones de fase de los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ se determinaron mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), empleando un calorímetro diferencial TA-Instruments (Discovery Series). Los termogramas se obtuvieron bajo atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, para dos

ciclos de calentamiento-enfriamiento para el rango -90 °C a 150 °C. Por otra parte, su estabilidad térmica se determinó mediante el uso de una balanza termogravimétrica (TA Instrument Discovery Series). Las muestras se calentaron desde 30 °C a 700 °C a 10 °C min⁻¹, empleando un flujo de nitrógeno igual a 25 mL min⁻¹.

Cinética de cristalización

El estudio teórico de la cinética de cristalización de polímeros fue desarrollado por Von Göler y Sachs, quienes determinaron que el modo de nucleación podría desarrollarse en forma simultánea y esporádica, entendiéndose por nucleación simultánea aquella en la que todos los cristales nuclean simultáneamente sin considerar el impedimento que ejercen unos núcleos sobre el crecimiento de otros (Mandelkern, 2004). Posteriormente, se desarrollaron expresiones que permitieron predecir la velocidad de crecimiento (G), considerando la influencia de la temperatura de cristalización en el transporte molecular y en la nucleación secundaria. Este efecto es tenido en cuenta por la siguiente expresión (Hoffman, 1982):

$$G(T) = G_0 \exp\left[-\frac{U^*}{R(T_c - T_\infty)}\right] \exp\left[-\frac{K_g}{T_c \Delta T f}\right]$$

$$f = \frac{2 T_c}{T_c + T_m^0}$$

Donde:

U^* : Energía de activación del proceso de transporte

K_g : Constante de nucleación secundaria.

G_0 : Constante empírica, que incluye factores independientes de la temperatura.

T_c : Temperatura de cristalización.

T_∞ : Temperatura a la que cesa el movimiento molecular (usualmente $T_g - 30K$)

ΔT : Grado de subenfriamiento $\Delta T = (T_m^0 - T_c)$

T_m^0 : Temperatura de fusión en el equilibrio.

f : Factor de corrección que considera la variación de la entalpía de fusión con la temperatura.

3. Resultados y Discusión

Caracterización fisicoquímica

Los copolímeros **P(HEMA-g-PCL)₃** sintetizados presentan masas molares comprendidas entre 27.700

y 60.100 g mol⁻¹, con dispersiones (\mathcal{D}) inferiores a 1,7 (Tabla 1).

Tabla 9. Caracterización SEC de copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ en estrella y ramificados.

Muestra	Tiempo ^(a) (h)	M _n ^(b) (g mol ⁻¹)	\mathcal{D} ^(b)
PCL*	--	11000	1,14
COP1	2	27700	1,68
COP2	5	60100	1,32
COP3	8	37900	1,14

^(a)Tiempo de reacción, ^(b)Masa molar promedio numeral (M_n) y dispersión (\mathcal{D}) determinados por SEC. *PCL homopolímero lineal obtenido por síntesis anónica (Ninago et al., 2019).

Los espectros FTIR muestran bandas de absorción correspondientes a bloques de PCL y PHEMA (ver Tabla 2). Se detectaron bandas de absorción de PCL a 1.724 cm⁻¹ (vibración de estiramiento del grupo carbonilo C=O), a 1.240 cm⁻¹ (enlaces O-C=O, Perova y Vij, 1996), y entre 3.500 y 3.100 cm⁻¹ se observó una fuerte banda de estiramiento asociada a la vibración del grupo O-H. Además, se detectaron bandas de estiramiento de C-H alifáticas a 2.985 y 2.854 cm⁻¹, típicas de poliésteres (Sahiner y Demirci, 2017). También se distinguieron bandas de absorción a 1.066 cm⁻¹ asignadas al agente de transferencia (Sun et al. 2006). Finalmente, se observó a 1.713 cm⁻¹ y 3.335 cm⁻¹ señales que corresponden a los grupos éster e hidroxilo. Respectivamente, del HEMA monómero, (Gupta et al. 2015).

Tabla 10. Bandas de absorción FTIR-ATR observadas en los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ sintetizados.

Frecuencia (cm ⁻¹)	Asignado a
1.724	Vibraciones de estiramiento del carbonilo C=O
1.240	Vibraciones de flexión del O-C=O
3.500 y 3.100	Banda de estiramiento asociada a la vibración O-H
2.985 y 2.854	C-H alifáticas
1.066	Bandas de absorción asignadas al agente de transferencia
1.713	Grupo éster R-CO-OR'

Caracterización térmica

Los copolímeros presentaron valores de temperatura de transición vítrea menores a los observados para PCL homopolímero lineal (-66,0 °C), comprendidos entre -62,3 °C y -59,8 °C. Asimismo, se observó una reducción en su temperatura de fusión obteniéndose valores de 35,4 °C, 50,1 °C y 38,3°C para COP1, COP2 y COP3, respectivamente. (Figura 3).

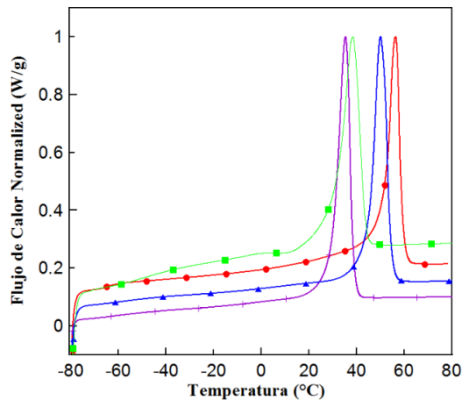


Figura 41. Curvas de DSC para PCL homopolímero lineal y P(HEMA-g-PCL)₃. Símbolos: (●) PCL, (+) COP1, (▲) COP2 y (■) COP3.

Los ensayos de estabilidad térmica mostraron los siguientes valores de temperaturas de descomposición máxima: 412,6 °C, 405,4 °C y 416,3 °C para COP1, COP2 y COP3, respectivamente. Estos valores son similares a los encontrados en PCL y PHEMA homopolímeros (Redondo, 2018). Asimismo, los copolímeros presentaron menores valores de temperatura de inicio de degradación (T_{005}) respecto de PCL homopolímero lineal (Tabla 3), encontrándose todos por encima de 250°C (Figura 4).

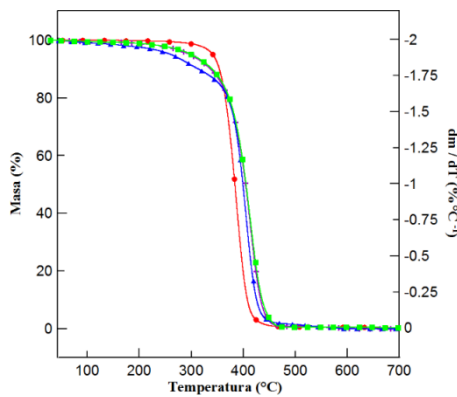


Figura 42. Curvas TGA de PCL homopolímero lineal y P(HEMA-g-PCL)₃. Símbolos: (●) PCL, (+) COP1, (▲) COP2 y (■) COP3.

Cristalización isotérmica

Los ensayos de cristalización isotérmica se realizaron en un calorímetro diferencial de barrido, en el rango de temperaturas de 16 a 22 °C, con incrementos de 2 °C, siguiendo la secuencia experimental que se muestra en la Figura 5.

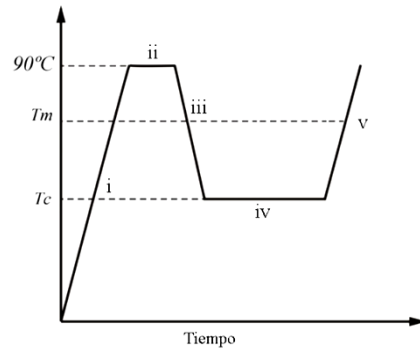


Figura 43. Secuencias de calentamientos, enfriamientos y pasos isotérmicos empleados en el estudio de cristalización isotérmica de los materiales estudiados.

- i. Se calentó la muestra de 15 a 90 °C a una velocidad de calentamiento de 10° C min⁻¹.
- ii. Se mantuvo a temperatura constante (90 °C) durante 5 minutos.
- iii. Se enfrió rápidamente (60 °C min⁻¹) hasta la temperatura de ensayo (T_c) con el propósito de evitar la cristalización del bloque de PCL en los P(HEMA-g-PCL)₃, y así analizar características del proceso de cristalización isotérmica.
- iv. Cristalización isotérmica a T_c .
- v. Una vez finalizada la cristalización del bloque de PCL en los P(HEMA-g-PCL)₃, se calentó la muestra hasta 90 °C a 10 °C min⁻¹ para determinar su porcentaje de cristalinidad.

Para evaluar el efecto de la presencia de ramas en la cristalización isotérmica de los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃, se comparó con PCL homopolímero lineal sintetizado en trabajos previos del grupo (Ninago et al., 2019). En todos los casos, el flujo de calor en función del tiempo se registró para diferentes temperaturas de cristalización isotérmica (T_c). La Figura 6 muestra, a modo de ejemplo, las curvas de cristalización isotérmica a $T_c = 22$ °C para los polímeros estudiados. Como puede observarse, el proceso de cristalización completo en los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ ocurre a tiempos mayores comparados con PCL homopolímero lineal. En este sentido, Wietor et al. 2011 reportaron que la presencia de ramificaciones dificulta la formación de cristalitas, incrementando el tiempo final de cristalización. Como se observa en la Figura 6, los copolímeros desplazan el pico exotérmico a tiempos mayores (la curva se vuelve más plana), aumentando el tiempo necesario para alcanzar el máximo grado de cristalización. Todas las experiencias se realizaron

bajo atmósfera de nitrógeno utilizando 0,01 g de muestra en cada ensayo.

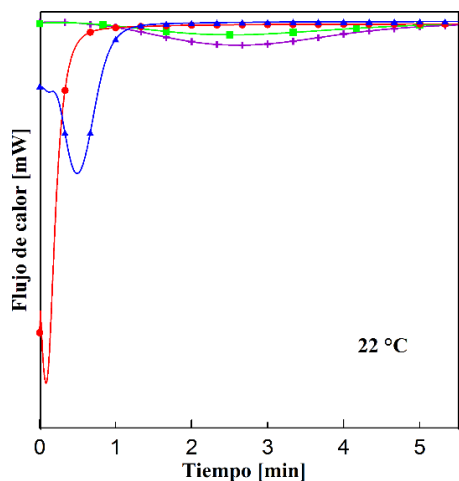


Figura 44. Curvas de cristalización isotérmica para PCL homopolímero lineal y copolímeros a 22 °C. Símbolos: (●) PCL, (+) COP1, (▲) COP2 y (■) COP3.

En la Figura 7 se muestran los datos de temperatura de fusión en el equilibrio (T_m^0) para PCL y los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ sintetizados.

Estos valores son necesarios para el cálculo del factor f (que considera la variación de la entalpía de fusión con la temperatura) para hallar la velocidad de crecimiento global de los cristales.

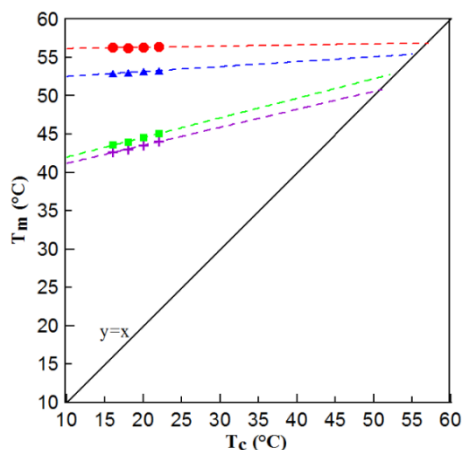


Figura 45. Temperatura de fusión de equilibrio (T_m^0) para PCL y copolímeros. Símbolos: (●) PCL, (+) COP1, (▲) COP2 y (■) COP3.

Los datos experimentales obtenidos se utilizaron para trazar la ecuación de Hoffman-Week linealizada (Figura 8) y calcular los valores de K_g y G_0 . Como puede observarse en la Tabla 3, los valores de velocidad de crecimiento y de K_g para los

copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ resultaron menores a los obtenidos para PCL homopolímero lineal. Esto podría explicarse si se asume que la presencia de ramificaciones disminuye la movilidad global de las cadenas de PCL, reduciendo la capacidad de cristalización final del material en su conjunto.

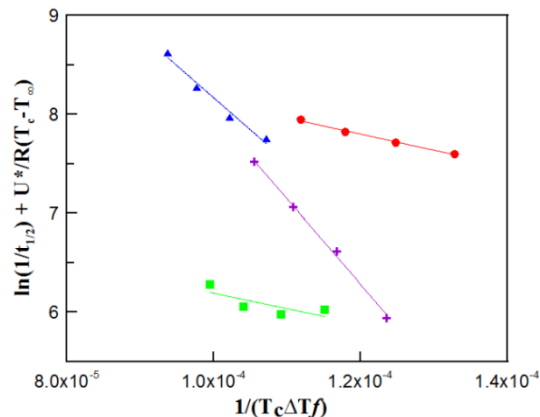


Figura 46. Modelo linealizado de Hoffman-Week para PCL y copolímeros. Símbolos: (●) PCL, (+) COP1 y (▲) COP2.

Tabla 11. Temperaturas de inicio de degradación determinadas por TGA y parámetros cinéticos de la ecuación H-W.

Muestra	$T_{005}^{(a)}$ °C	T_m^0 ^(b) °C	k_g ^(c) K ²	G_0 min ^{-1(c)}
PCL*	341,5	56,9	1,63E+04	1,73 E+04
COP1	297,5	50,8	1,12E+05	8,21 E+07
COP2	261,1	55,4	6,53E+04	2,37 E+06
COP3	299,9	53,0	2,71E+04	8,79 E+03

^(a) Determinado por TGA ^(b) Determinado gráficamente (Figura 7).
^(c) Determinado a partir del Modelo linealizado de Hoffman-Week (Figura 8).

4. Conclusiones

Se sintetizaron con éxito copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ ramificados y en estrella mediante la combinación de técnicas de polimerización ROP y RAFT, obteniéndose macromoléculas con masa molar controlada y valores de dispersión (\bar{D}) inferiores a 1,7. Los ensayos térmicos revelaron que los copolímeros sintetizados presentaron temperaturas de fusión menores a las reportadas para

el PCL homopolímero lineal; sin embargo, su estabilidad térmica no se vio comprometida. De los datos obtenidos por DSC, se observó que los copolímeros P(HEMA-g-PCL)₃ exhiben valores de tasa de crecimiento más altas en comparación con PCL homopolímero lineal, según el análisis de la teoría de Hoffman-Weeks empleada. Estos resultados sugieren que las ramificaciones presentes podrían disminuir la movilidad de las cadenas PCL y afectar la capacidad de cristalización del material en su conjunto.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina), la Universidad Nacional del Sur (UNS, Argentina), el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT, Argentina Grant PICT-2016-0181), y la Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo, Argentina, Beca SIIP 06/L030-B) por el apoyo financiero brindado para la realización de esta investigación.

5. Referencias

- Gan Z., Jianc B., and Zhang J. (1996). *Poly(8-Caprolactone)/Poly(Ethylene Oxide) Di Block Copolymer. Isothermal Crystallization and Melting Behavior*. Journal of Applied Polymer Science, 56(6), 961-67.
- Gupta V.K., Tyagi I., Agarwal S., Sadegh H., Shahryari-ghoshekandi R., Yari M., and Yousefinejat O. (2015). *Experimental study of surfaces of hydrogel polymers HEMA, HEMA-EEMA-MA, and PVA as adsorbent for removal of azo dyes from liquid phase*. Journal of Molecular Liquids, 206, 129-136.
- Hoffamn J. D. (1982). *Role of reptation in the rate of crystallization of polyethylene fractions from the melt*. Polymer, 23, 656-670.
- Malikmammadov, E., Tanir, T. E., Kiziltay, A., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2018). *PCL and PCL-based materials in biomedical applications*. Journal of Biomaterials science, Polymer edition, 29(7-9), 863-893.
- Mandelkern, L. (2004). *Crystallization Kinetics of Homopolymers: Overall Crystallization: A Review*. Biophysical Chemistry, 112 (2-3), 109-116.
- Ninago M. D., Redondo F.L., De Freitas A. G.O., Giacomelli C., Ciolino A. E., and Villar M. A. (2019). *Effects of Branches on the Isothermal Crystallization of Copolymers Based on Poly(ε-Caprolactone)*. Macromolecular Symposia, 383(1), 1-6.
- Ninago, M. D. (2012). *Síntesis y Caracterización de Copolímeros En Bloque Lineales Basados En Siloxano*. Tesis de Doctor en Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Ninago, M. D., Satti A., Ciolino A. E., Valles E. M., Villar M. A., Vega D. A., Sanz A., Nogales A. and Rueda D.R. (2010). *Synthesis and Morphology of Model PS-b-PDMS Copolymers*. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 48(April): 3119-3127.
- Pamfil, D., Vasile, C., Tartău, L., Vereștiuc, L., & Poiată, A. (2017). *pH-Responsive 2-hydroxyethyl methacrylate/citraconic anhydride-modified collagen hydrogels as ciprofloxacin carriers for wound dressings*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 32(4), 355-381.
- Redondo, F. L., Ninago M. D., De Freitas A. G.O., Giacomelli C., Ciolino A. E. and Villar M. A. (2018). *Tailor-Made, Linear, and 'Comb-like' Polyester-Based Copolymers: Synthesis, Characterization, and Thermal Behavior of Potential 3D-Printing/Electrospinning Candidates*. International Journal of Polymer Science, 2018 1-15.
- Redondo, F. L. (2018). *Síntesis y Caracterización de Copolímeros Bloque Biocompatibles*. Tesis de Doctor en Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Shanier, N., and Demirci S. (2017). *The Use of Graphene Oxide-Embedded Superporous Poly (2-Hydroxyethylmethacrylate) Cryogels for p (Aniline) Conductive Polymer Synthesis and Their Use in Sensor Applications*. Materials & Design, 120, 47-55.
- Sun, H., Lin M., Cunxian S. Ā., Xiumin C., and Wang P. (2006). *The in Vivo Degradation , Absorption and Excretion of PCL-Based Implant*. Biomaterials, 27(9), 1735-1740.
- Perova T.S., Vij J. K., . Xu. (1996). *"Fourier Transform Infrared Study of Poly (2-Hydroxyethyl Methacrylate) PHEMA"*. Colloid Polym Sci 17 (4), 319-25.

Wietor, J. L., Van Beek, D. J. M., Peters, G. W.,
Mendes, E., and Sijbesma, R. P. (2011). *Effects of
branching and crystallization on rheology of
polycaprolactone supramolecular polymers with
ureidopyrimidinone end groups*. *Macromolecules*,
44, 1211.

Curvas de dispersión aplicadas a la propagación de ondas guiadas en estructuras de sección circular hueca

Dispersion curves applied to the propagation of guided waves in structures of hollow circular section

Gonzalo Díaz¹, María Emilia Castelló¹, Marcos Amado¹, Javier Idzi¹, Fernando Gutierrez¹, Eduardo B. Groth²

1. UIDET Ingeniería Aplicada en Mecánica y Electromecánica (IAME), Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata. Calle 48 y 116, La Plata (B1900TAG), Argentina.
2. Laboratório de Metalurgia Física LAMEF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Paulo Gama, 110 - Bairro Farrroupilha - Porto Alegre - Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: gonzalo.diaz@ing.unlp.edu.ar

Resumen

El uso de estructuras tubulares largas, como cañerías de transmisión de fluidos o soporte estructural (área civil), son habituales en muchas industrias (petroleras, petroquímicas, plantas de energía). Estas estructuras deben garantizar fiabilidad y ausencia de defectos, necesitando un método de inspección adecuado para asegurarlo.

Su inspección, empleando ensayos no destructivos convencionales es costosa, difícil y a veces imposible por la longitud, inaccesibilidad a las estructuras completas y dependencia de la evaluación exacta de los defectos; motivo por el cual muchos investigadores consideran el uso de ondas guiadas como método de inspección porque permite utilizar ondas con diferentes propiedades para la detección de defectos.

Estas ondas proporcionan una solución atractiva a este problema porque pueden excitarse en un lugar de la estructura y propagarse a muchos metros. Sin embargo, este método se dificulta por la presencia de muchos modos de onda posibles, siendo la mayoría dispersivos.

En el presente trabajo se estudian las características de propagación de ondas guiadas en estructuras metálicas de sección circular hueca, calculando las curvas de dispersión obtenidas por dos metodologías de trabajo empleando elementos finitos, obteniéndose curvas de dispersión para una sección cilíndrica.

Palabras clave: Ondas guiadas, ensayo no destructivo, curvas de dispersión.

Abstract

The use of long tubular structures, such as fluid transmission pipes or structural support (civil area), are common in many industries (oil, petrochemical, power plants). These structures must guarantee reliability and absence of defects, requiring an adequate inspection method to ensure this.

Its inspection, using conventional non-destructive tests, is expensive, difficult and sometimes impossible due to its length, inaccessibility to complete structures and dependence on the exact evaluation of defects; This is why many researchers consider the use of guided waves as an inspection method because it allows the use of waves with different properties for the detection of defects.

These waves provide an attractive solution to this problem because they can be excited in one place in the structure and travel many meters. However, this method is made difficult by the presence of many possible wave modes, the majority being dispersive.

In the present work, the characteristics of guided wave propagation in metallic structures of hollow circular section are studied, calculating the dispersion curves obtained by two work methodologies using finite elements, obtaining dispersion curves for a cylindrical section.

Keywords: Guided waves, nondestructive testing, dispersion curves.

1. Introducción

El área estructural de la ingeniería tiene como foco el diseño y concepción de estructuras que no colapsen, presentando buen desempeño a lo largo de su vida útil sin fallar abruptamente. No siempre es posible estimar la vida de las estructuras reales, debido a una gran cantidad de factores, como la homogeneidad de las propiedades de los materiales utilizados en la construcción y severidad de las acciones actuantes, entre otros, que hacen que sea compleja la estimación de vida estructural. Es por ello que el desarrollo de métodos que revelen la situación de la integridad estructural son de fundamental importancia, razón por la cual se justifica la enorme inversión realizada en la ingeniería moderna en el desarrollo de técnicas de evaluación y monitoreo de las estructuras sin producción de daño de la misma, los llamados ensayos no destructivos (END).

Dentro de los END se encuentran los ensayos por ultrasonido, basados en la medición de la propagación de ondas acústicas en el medio que constituye la pieza a analizar. Las ondas transportan energía en cuanto se propagan por un medio, cuando este medio es físico (no vacío) y la onda a propagar lo deforma, el fenómeno es conocido como acústica, rama de la física que estudia el sonido que no necesariamente es el audible por el hombre.

Estos, son de utilidad para identificar la presencia de posibles discontinuidades en la pieza tanto superficiales como internas y utilizan la reflexión de las ondas que, en función de su comportamiento, podrán detectar la presencia de las discontinuidades y su ubicación.

En estructuras donde una de sus dimensiones es mucho más grande que las otras dos es común la propagación de las llamadas ondas guiadas, teniendo buena relación costo-beneficio debido a la simplicidad y rapidez de inspección. La comparación entre la forma convencional de realizar inspecciones con la utilización de ondas guiadas se muestra en la Figura 1. Las ondas guiadas cubren la totalidad del espesor de la estructura en una distancia mucho mayor comparándola con el área de cobertura localizada de la inspección convencional. Esta metodología permite localizar daños en estructuras inaccesibles (sumergidas, enterradas o aisladas) debido a que solo se requiere una pequeña área de acceso cuando se aplica una vibración que se extenderá como una onda guiada (Rose, 2014). En este caso es posible, con un mismo sensor emisor receptor, obtener información de defectos localizados a distancias considerables en estructuras de acero de difícil acceso (de hasta 100 metros dependiendo el material).

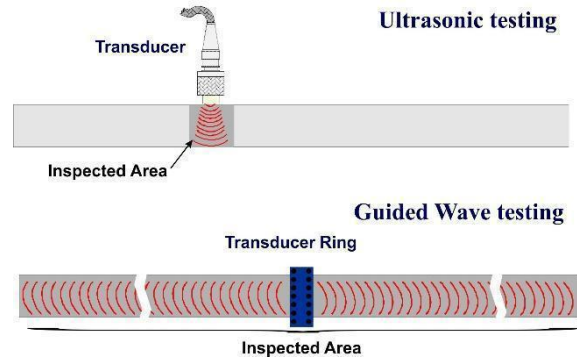


Figura 47. Comparación entre inspección por ultrasonido convencional y de ondas guiadas.

Para el caso de las ondas guiadas que viajan en sólidos, los límites interactúan de una manera muy especial para que se puedan satisfacer las condiciones de borde. Los límites podrían ser la superficie de una estructura de gran espesor donde la estructura se considera como medio, espacio o medio infinito. En este caso, las ondas superficiales de Rayleigh (tipo de onda acústica superficial que viaja a lo largo de la superficie de los sólidos) pueden propagarse sobre la superficie de una placa, por ejemplo, o sobre cualquier estructura donde la frecuencia es tal que la longitud de onda es muy pequeña en comparación con el grosor de la estructura.

Asimismo, las ondas guiadas pueden propagarse en diferentes tipos de estructuras: placas delgadas, varillas, caños y estructuras de varias capas. A medida que las ondas se propagan de un lado a otro, se produce una conversión de modo, por lo que cada vez que se encuentra una interfaz, tanto las ondas longitudinales como las de corte (ondas P y S) se reflejan y/o se refractan como en el caso de los medios de varias capas.

Estructuras tubulares, rieles, recipientes sometidos a presión, y tanques son algunos ejemplos de tipologías estructurales en las que se presenta el característico fenómeno de propagación de ondas en la dirección de las mayores dimensiones. En estos casos el fenómeno de dispersión se caracteriza por la propagación de ondas elásticas que viajan en direcciones longitudinales. Para su estudio resulta fundamental la utilización de las curvas de dispersión que dependen de las dimensiones finitas de la estructura estudiada. Pocas soluciones analíticas que permiten la construcción de estas curvas están disponibles destacándose la propuesta por Lamb para placas (Auld, 1973).

Una eventual discontinuidad en la estructura generaría una interacción que dependerá de las condiciones geométricas y del modo de propagación presente en ese medio. De esta manera, el estudio de los modos en que las ondas elásticas se propagan

puede determinar para cada situación una forma eficiente de caracterizar las discontinuidades presentes en la estructura analizada.

La utilización de las curvas de dispersión permite entender cómo una determinada perturbación que tiene una función temporal y espacial específica se polariza en ondas modales que viajan a velocidades diferentes las cuales producen el fenómeno de dispersión. Estudiar la propagación de ondas sobre una determinada guía de onda con geometría específica utilizando las curvas de dispersión permite entender que frecuencias y modos pueden polarizar.

De esta manera se puede determinar que en perfiles con forma tubular inducir cierto tipo de ondas permite generar perturbaciones que propagan grandes distancias con una baja dispersión o procurar ondas que tengan sus componentes modales mayores en el interior de la guía disminuyendo así el amortiguamiento debido al poder disipativo del revestimiento o contactos con el medio ambiente. Son los anteriores solo algunos ejemplos del tipo de información que la correcta utilización de las curvas de dispersión permite obtener como resultado.

En el caso de la aplicación de la técnica de emisión acústica (Groose y Ohtsu 2009) la perturbación asociada a ruptura es compleja y mucha información puede ser extraída de ella. En el caso de estructuras laminares estas ondas viajan en las direcciones longitudinales y el fenómeno de dispersión permite que la emisión emanada durante la ruptura interna se polarice y disperse siendo posible así interpretar mejor la información incluida en ella.

Existen diversos métodos numéricos para la construcción de curvas de dispersión para una geometría específica. Asimismo, es posible realizar la simulación de una onda propagando una guía de ondas, utilizando elementos finitos para su discretización espacial y algún esquema explícito de integración para resolver el problema en el dominio del tiempo. Registrando información en una región espacial del modelo durante un lapso de tiempo es posible identificar si la dispersión de la excitación aplicada responde a lo predicho por las curvas de dispersión asociadas a la guía de onda estudiada.

En este trabajo se estudiarán los conceptos teóricos relacionados a la propagación de onda guiada en caños metálicos mediante el análisis de curvas de dispersión estudiando su aplicación en métodos de detección temprana de fallas.

Las metodologías de cálculo para hallar las curvas de dispersión consisten en la aplicación de dos modelos diferentes, el modelo axisimétrico y el modelo por condiciones periódicas. Estos modelos se analizan en detalle en la siguiente sección.

2. Materiales y métodos

Materiales y geometría

La selección de materiales para su aplicación en la construcción o fabricación de tubos y caños, es un proceso que requiere ciertas consideraciones de las características del material apropiado para el servicio requerido.

Además, debe considerarse el entorno operativo que rodea la cañería o el componente de la cañería. La degradación de las propiedades del material o la pérdida de una sección transversal efectiva de carga puede ocurrir a través de la corrosión, la erosión o una combinación de ambas. La naturaleza de las sustancias que contiene la cañería también es un factor importante.

También se deben tener en cuenta las características de fabricación de los materiales considerados. La capacidad de doblarse o formarse, la idoneidad para soldar u otros métodos de unión, la facilidad de tratamiento térmico y la uniformidad y estabilidad de la microestructura resultante. El proceso de selección debe conducir al material más económico que cumpla con los requisitos de las condiciones de servicio y los códigos y normas que se aplican.

Para los usos mencionados se puede encontrar que la producción de caños y tubos se basa en acero debido a su gran resistencia y alta fiabilidad, particularmente en aceros al carbono y aceros aleados e inoxidables.

Los aceros al carbono representan los 2/3 de todos los materiales usados en cañerías, excepto los aceros de medio y alto contenido de carbono debido a que su alto contenido de carbono dificulta en exceso la soldabilidad del material.

Desde el punto de vista económico, no es conveniente usar aceros aleados para prolongar la vida de las cañerías, debido a que las instalaciones industriales tienen una duración limitada y su costo es varias veces mayor que los del acero al carbono.

Método de elementos finitos semianalítico (SAFE)

El método SAFE se ha adoptado para la resolución de problemas de propagación de ondas en guías de ondas de sección compleja. Fue desarrollado como un enfoque alternativo a los métodos tradicionales, como el método de matriz global, debido, principalmente, a sus beneficios de resolver problemas arbitrarios de guía de onda de sección transversal (Hayashi, Song y Rose, 2003).

En este método, la guía de onda se discretiza en la sección transversal, mientras que se adopta una solución analítica en la dirección de propagación de

la onda. Basado en un esquema de variaciones, se puede construir un sistema de ecuaciones lineales con la frecuencia y el número de onda como incógnitas, las que pueden resolverse utilizando rutinas estándar de valores propios. De esta manera, se pueden resolver problemas de propagación de ondas en guías de ondas con secciones transversales complejas como, por ejemplo, laminados multicapa y rieles (Gavric, 1995; Hayashi, Song y Rose, 2003), donde frecuentemente es difícil obtener soluciones analíticas.

Para las guías de onda que son infinitamente largas en una dimensión, el método SAFE es superior al método por elementos finitos (FEM) puro en el que se utilizan representaciones analíticas exactas para una o dos dimensiones de la guía de onda, reduciéndose el costo computacional.

El método semianalítico también es ventajoso en comparación con los métodos de matriz analítica, es menos propenso a la falta de raíces en el desarrollo de las curvas de dispersión. El empleo temprano de este método en la resolución de problemas de propagación de ondas guiadas se puede encontrar en el trabajo Dong et al. (1972), donde se observa su utilización en el análisis de modos de onda en un codo de tubería (Hayashi et al., 2004) y en materiales con propiedades viscoelásticas (Bartoli et al., 2006; Matt et al., 2005).

Modelo axisimétrico

El modelo axisimétrico para el cálculo de curvas de dispersión consiste en modelar una guía de ondas a través de un aro de gran radio (Figura 2), en la cual la sección transversal bajo estudio es la sección transversal del aro ($R > 10L$, siendo R el radio adoptado y L una dimensión característica de la sección transversal estudiada).

El aro consiste en un sólido de revolución que, bajo condiciones de contorno de simetría axial, puede resolverse mediante el empleo de un modelo constituido por elementos finitos axisimétricos (Boeraeve, 2010).

En el análisis modal de modelos de esta naturaleza, los paquetes de simulación ofrecen una forma de establecer cuántos nodos y antinodos pueden tener los modos encontrados en el análisis, y cómo aplicar una restricción a los desplazamientos de la sección transversal periódicamente.

En el caso del aro estudiado, la restricción de los desplazamientos perpendiculares a la sección transversal genera los antinodos y la restricción a los desplazamientos paralelos genera los nodos.

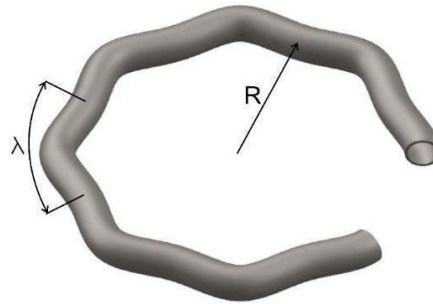


Figura 48. Esquema del método SAFE axisimétrico.

Los softwares comerciales de elementos finitos, que ofrecen un análisis modal a través del modelo axisimétrico, usualmente permiten la entrada de las condiciones de contorno descritas a través de un comando. Este comando, preestablece una cantidad de longitudes de onda λ para las cuales el modelo está sujeto a vibrar.

La cantidad de longitudes de onda son fijadas a través de un parámetro conocido como C_{order} (Celga, 2008). Por consiguiente, resulta de importancia determinar este parámetro, que representa el número por el cual debemos dividir a la longitud de la circunferencia del modelo axisimétrico analizado, para poder determinar la longitud de onda λ definida como:

$$\lambda = (2 \cdot \pi \cdot R) / C_{order} \quad (1)$$

$$\lambda = (2 \cdot \pi) / k \quad (2)$$

De las ecuaciones 1 y 2 es posible establecer una relación entre el parámetro C_{order} y el número de onda k de la siguiente manera:

$$C_{order} = k \cdot R \quad (3)$$

Para la obtención de las curvas de dispersión utilizando el modelo axisimétrico, debe hacerse un barrido para las longitudes de onda de interés. El número de onda se puede modificar variando el valor de C_{order} (o de R), es decir que, los valores de λ y k varían para cada nuevo valor de C_{order} . Por consiguiente, el análisis modal calculará un conjunto de frecuencias naturales donde cada una de ellas pertenece a un modo que se propaga por la guía de ondas en estudio.

Se realiza un análisis modal con el modelo axisimétrico donde los valores de k se varían dentro de los requeridos para el estudio y se fija el valor del radio (R) de la simetría axial, de dimensiones mayores que las dimensiones de la sección transversal ($R > 10L$). De este análisis, se obtienen los valores de las frecuencias naturales de la estructura para cada valor de C_{order} , a partir de la cual se obtendrán los puntos para cada valor de k de la curva de dispersión.

Una vez obtenidos los puntos provenientes del estudio modal para cada valor de k , se los grafica obteniendo, de esta manera, una nube de puntos que generarán las curvas de dispersión.

Para el cálculo de la sección, se utiliza el elemento PLANE83 (Figura 3) que permite automatizar el proceso de formación de las curvas de dispersión (Idzi, 2017). Este elemento, está definido por cuatro nodos que tienen tres grados de libertad cada uno: trasladados en las direcciones x , y , y z nodal. En el caso de coordenadas nodales sin rotar, estas direcciones corresponden a las direcciones tangencial, radial y axial.

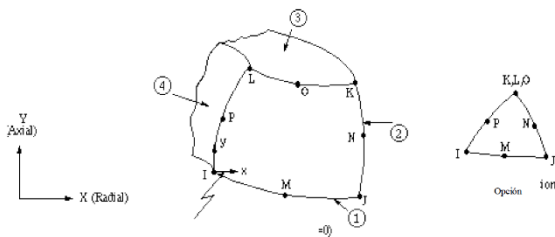


Figura 49. Elemento PLANE83, utilizado en modelo axisimétrico para el cálculo de las curvas de dispersión del caño en estudio (ANSYS®, 2009).

Modelo de elementos finitos tridimensional considerando condiciones periódicas

Este método consiste en modelar una porción de la guía de onda en elementos finitos, como se muestra en la Figura 4, donde sobre las caras A y B son aplicadas las condiciones de contorno periódicas.

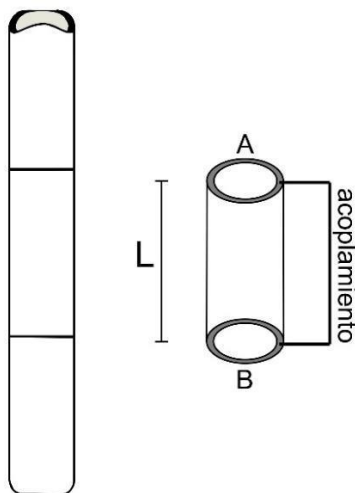


Figura 50. Porción de la guía de ondas utilizada en la elaboración del modelo de longitud L , mostrando en detalle las caras A y B, sobre las cuales se aplican las condiciones de contorno periódicas.

Estas condiciones de contorno hacen posible el acoplamiento de los desplazamientos de las caras, de modo que la cara A tenga un desplazamiento igual a la cara B, o que los desplazamientos de ambas caras tengan sentido contrario pero el mismo valor absoluto.

Las condiciones de contorno periódicas, son aplicadas en el modelo nodo a nodo de manera que cada nodo de la cara A tenga su respectivo par en la cara B y ambos se encuentran acoplados entre sí.

En el presente trabajo, se utiliza un comando que permite aplicar las condiciones periódicas acoplando los nodos entre sí a través de la ecuación 4,

$$\sum_{i=1}^n (u_{Aj}^i C_A + u_{Bj}^i C_B) = 0 \quad (4)$$

donde u_{Aj}^i y u_{Bj}^i son los desplazamientos de los nodos de las caras A y B en la dirección j , y C_A y C_B son los coeficientes escalares que determinan las características de la restricción.

Si se aplican las condiciones de contorno sobre los desplazamientos de las secciones laterales del modelo, su análisis modal proporciona las frecuencias de vibración, es decir, las frecuencias (imágenes) de las curvas de dispersión. El valor de k es inversamente proporcional a la longitud de onda λ , la cual proviene de la expresión 5,

$$\lambda = L/p \quad (5)$$

donde L es la longitud del modelo y su valor arbitrario puede elegirse convenientemente de acuerdo a la región de las curvas de dispersión de interés, y p es la cantidad de veces que el patrón de deslizamiento, perteneciente al modo, se repite dentro del modelo.

En la práctica, la determinación de p depende de un análisis visual de cada uno de los modos calculados.

El objetivo de este método consiste en, con las condiciones periódicas impuestas, hacer que el modelo imite el comportamiento de una guía de ondas durante el pasaje de una propagación, haciendo posible la generación de las curvas de dispersión de una guía de ondas de cualquier geometría.

Esta metodología, permite visualizar el modo de propagación en un modelo de tres dimensiones, pero presenta la dificultad de automatizar el método.

Con este método se obtuvieron, únicamente, puntos característicos de las curvas de dispersión, para poder

visualizar los modos asociados a las curvas obtenidas con el método basado en el modelo axisimétrico anteriormente explicado.

A continuación, se presentan observaciones adicionales sobre la implementación del método por condiciones periódicas:

Es importante entender, que existe una cierta libertad al escoger la relación entre las condiciones de contorno de las caras A y B. La lógica de esta metodología es, a través de las condiciones de contorno reproducir el desplazamiento producto del pasaje de una perturbación por una guía de ondas y, a través de la selección de las condiciones de contorno dar preferencia a los desplazamientos característicos de un modo u otro.

Inicialmente se puede trabajar con condiciones de contorno libres, pero al calcular los modos de vibración por el análisis modal, aparecerían modos que no pertenecen a la guía de ondas, dificultando la identificación de los mismos, motivo por el cual se aplican condiciones periódicas.

En la Figura 5 se representan, esquemáticamente, los desplazamientos debidos a condiciones de contorno simétricas y antisimétricas (periódicas), aplicadas sobre las caras del modelo.

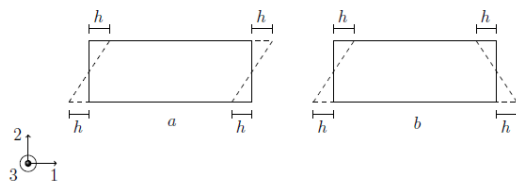


Figura 51. Condiciones de contorno periódicas (a) simétricas y (b) antisimétricas.

Al correr el análisis modal por elementos finitos, se calculan una serie de frecuencias naturales, cada una con su respectivo campo de desplazamientos característico (modo de vibración). Dentro de los modos generados, es posible determinar patrones que se van repitiendo, significando que, a una determinada frecuencia f , el modelo presenta un campo de desplazamientos específico, y a una frecuencia f' ($f > f'$) se obtiene el mismo campo de desplazamientos pero reducido, de manera que el patrón se repite dentro del modelo de tamaño L .

Este fenómeno se repite sucesivamente a medida que se calculan frecuencias mayores durante el análisis modal, los patrones se van repitiendo pero en menor medida. Cada patrón es una curva que representa un modo de propagación, donde las frecuencias en las que aparece el mismo modo pertenecen a la curva.

Curvas de dispersión aplicadas en ensayos no destructivos (END)

La prevención de fallas es muy importante en la industria, además de ser costosa pueden causar enormes daños ambientales y personales. En el área de prevención de fallas se destacan los END, que se utilizan para examinar los defectos en busca de componentes de servicio sin dañarlos. Entre sus diversas técnicas, el más utilizado es el ultrasonido, en el que el uso de ondas guiadas tiene importantes ventajas sobre los END de ultrasonido convencional, donde se propaga una onda mecánica en largas distancias.

Alleyne y Cawley (1996) desarrollaron un sistema basado en un transductor piezoeléctrico de acoplamiento seco para la detección de corrosión, en caños de 3 a 12 in de diámetro, usando ondas cilíndricas de Lamb, utilizando el modo axisimétrico $L(0,2)$ a una frecuencia de aproximadamente 70 kHz. En las curvas de dispersión mostradas en la Figura 6, puede observarse que este modo no presenta un comportamiento dispersivo a ese rango de frecuencia.

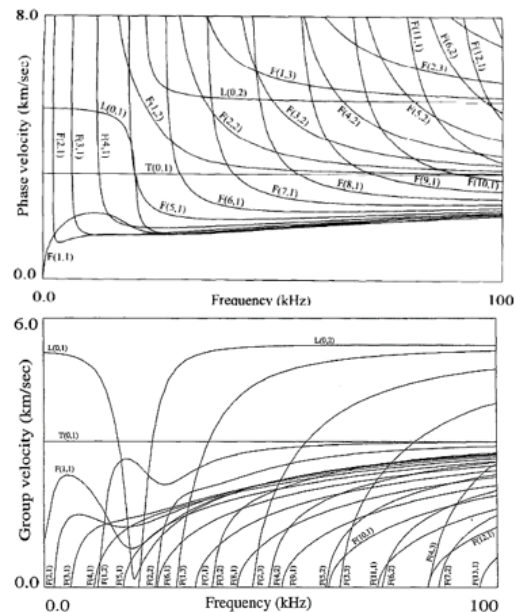


Figura 52. Curvas de dispersión para un caño de 3 in utilizadas por Alleyne y Cawley (1996).

Este método de inspección, proporciona un sistema simple, liviano y fácilmente desmontable para la inspección de grandes distancias de cañería. El inconveniente ocurre que al excitar el modo $L(0,2)$, también se excitan modos no deseados (flexión y altamente dispersivos). En su trabajo, Alleyne y Cawley (1996) llegaron a la conclusión de que, para una óptima inspección por ondas guiadas no solo es necesaria la adecuada lectura de las señales recibidas, sino también la supresión de los modos no deseados producto del ensayo.

3. Resultados y Discusión

Se calcularon las curvas de dispersión de un caño de 3 in de diámetro externo y espesor de pared de 2,225 mm (Figura 7).

En la implementación del método basado en el modelo axisimétrico validado se ha dejado fijo el valor del radio, determinado por los parámetros de cálculo. Para el caso estudiado, $R = 500$ m y los valores de k se variaron entre un valor mínimo de 0,01 rad/m y un valor máximo de 350 rad/m, siendo el intervalo de variación de k de 0,01 rad/m.

Los resultados de las frecuencias encontradas entre las frecuencias máximas y mínimas establecidas para cada valor de k , se grafican en conjunto, permitiendo visualizar las curvas de dispersión.

El contorno del perfil es introducido como output de un archivo neutro, (*.igs). De este modo, a través de este tipo de archivos, se puede importar directamente cualquier perfil que sea requerido para su estudio (Idzi, 2017).

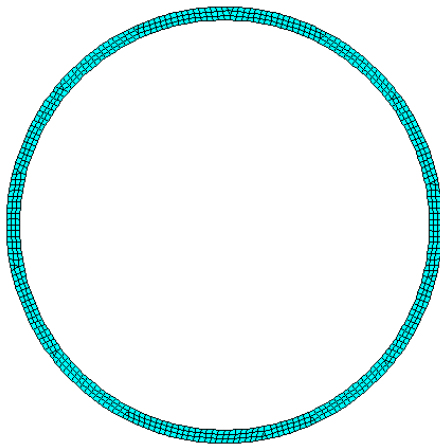


Figura 53. Perfil mallado con el elemento PLANE83.

Los parámetros de cálculo utilizados para la confección de las curvas de dispersión mediante el método axisimétrico se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades y características utilizadas para generar las curvas de dispersión en el perfil del caño

	Valor
Módulo de Young, en N/m ²	2,10 x 10 ¹¹
Coefficiente de Poisson	0,30
Densidad, en N/m ³	7850
Radio de simetría, en m	500
Tamaño característico del elemento, en m	0,001
Cantidad de modos calculados	100
Número de onda mínimo, en rad/m	0,01

Número de onda máximo, en rad/m	350
Intervalo de número de onda, en rad/m	0,01

A partir de los parámetros especificados se construyen las curvas de dispersión para una sección circular hueca de las dimensiones mencionadas. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 8, donde se representa la frecuencia en función del número de onda.

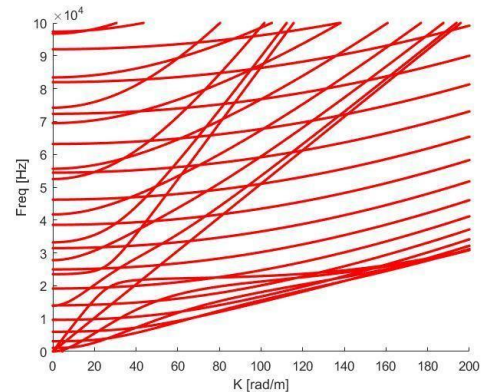


Figura 54. Curvas de dispersión graficadas en frecuencia vs número de onda para la sección estudiada.

A partir de los datos obtenidos, se grafican las curvas representadas por la velocidad de fase en función de la frecuencia (Figura 9), donde cada par de puntos (k , f) se corresponde con un par de valores (C_F , f), siendo C_F la velocidad de propagación en función de la frecuencia para cada uno de los modos que se presentan en la gráfica.

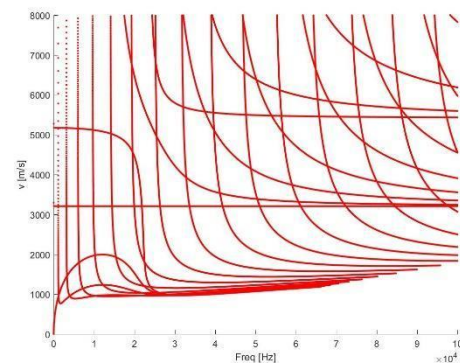


Figura 55. Curvas de dispersión graficadas en velocidad de fase vs frecuencia para la sección estudiada.

Partiendo de los puntos (k , f) obtenidos del método axisimétrico se pueden obtener las gráficas representadas como velocidad de grupo en función de la frecuencia (Figura 10).

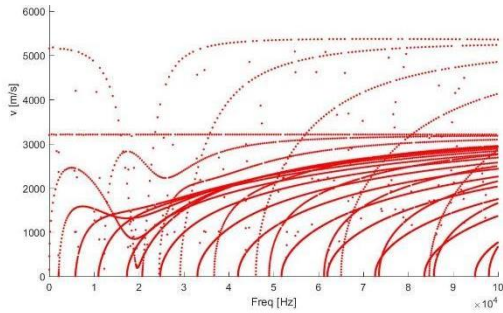


Figura 56. Curvas de dispersión graficadas en velocidad de grupo vs frecuencia para la sección estudiada.

Puede observarse que la velocidad del paquete de ondas está siendo excitada para cada frecuencia.

De lo analizado, se observa que para valores de frecuencia inferiores a los 200 kHz existe un único modo torsional, conocido como T(0,1) y dos modos longitudinales, L(0,1) y L(0,2). Los modos restantes que aparecen en la gráfica se deben a modos de flexión que tienden a alguno de los modos longitudinales o torsional.

Una vez confeccionadas las curvas de dispersión a partir del modelo axisimétrico, se analiza la sección estudiada con el modelo tridimensional por condiciones periódicas. En la Figura 11 se presenta, de manera tridimensional, la estructura estudiada, donde se muestra su comportamiento para los puntos (k, f) estudiados.

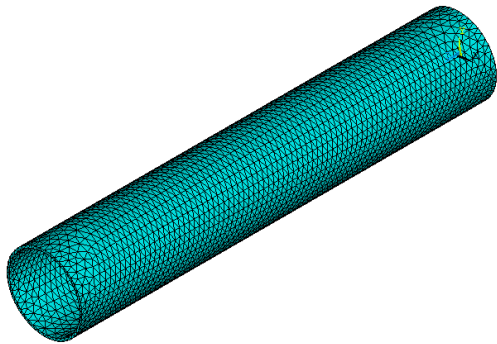


Figura 57. Vista tridimensional del perfil analizado utilizando el método por condiciones periódicas.

En los gráficos anteriores (Figuras 8 a 10) se puede observar la gran cantidad de curvas de dispersión obtenidas para la estructura estudiada.

A continuación, se realiza un estudio para todo el rango (k, f), es decir, k entre 0 y 200 rad/m y f entre 0 y 100 kHz.

El modelo por condiciones periódicas permite obtener las imágenes de los puntos señalados en la

Figura 12, pertenecientes a los modos longitudinales y torsional. La corroboración de esto se muestra en las Figuras 13 a 18, donde se observan las deformaciones de la estructura estudiada.

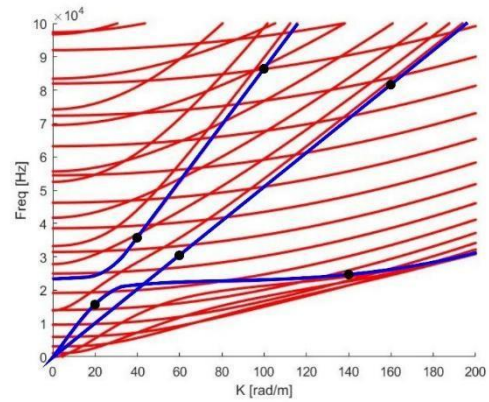


Figura 58. Puntos de control generados por condiciones periódicas.

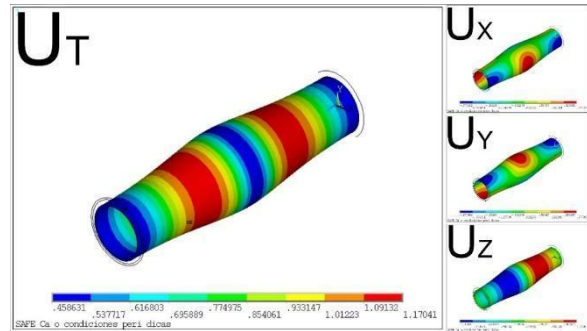


Figura 59. Punto de control por condiciones periódicas modo (k = 20; f = 15,68 kHz).

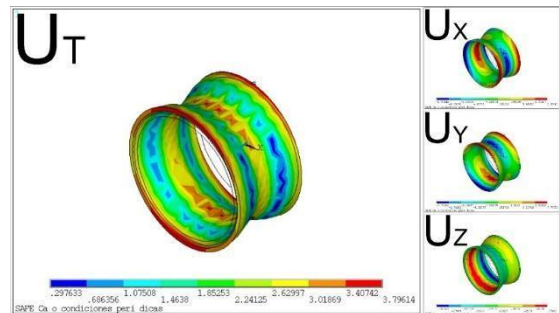


Figura 60. Punto de control por condiciones periódicas modo (k = 140; f = 24,44 kHz).

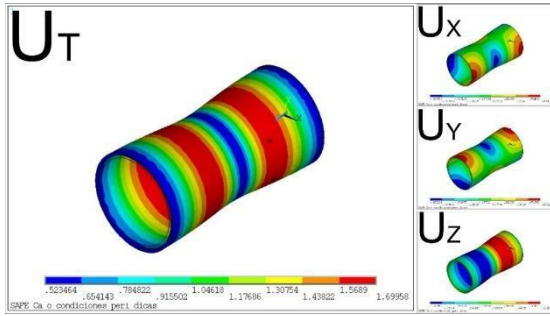


Figura 61. Punto de control por condiciones periódicas modo ($k = 40$; $f = 35,38$ kHz).

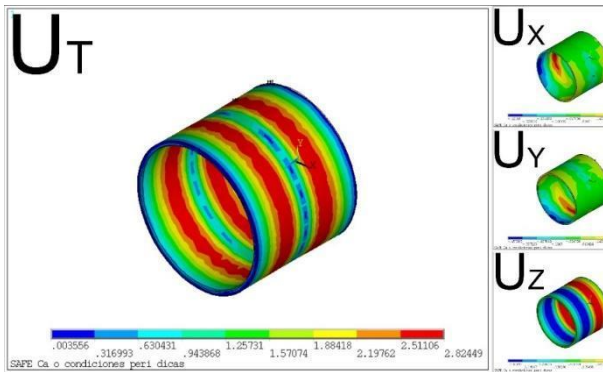


Figura 62. Punto de control por condiciones periódicas modo ($k = 100$; $f = 86,20$ kHz).

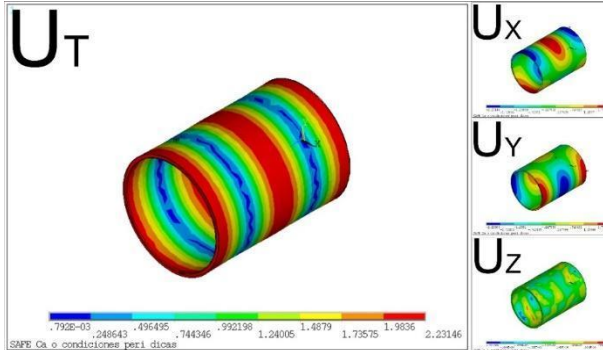


Figura 63. Punto de control por condiciones periódicas modo ($k = 60$; $f = 30,63$ kHz).

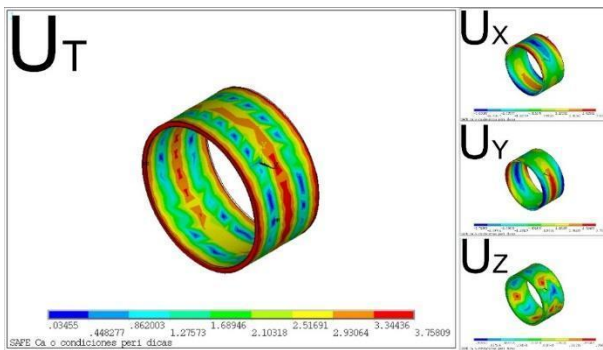


Figura 64. Punto de control por condiciones periódicas modo ($k = 160$; $f = 80,950$ kHz).

De acuerdo a lo analizado anteriormente, se encontraron puntos específicos dentro del rango de la gráfica (k, f) de la Figura 8 que permiten reconocer los modos longitudinales y el modo torsional como se observa en las Figura 19 a Figura 21 en color azul.

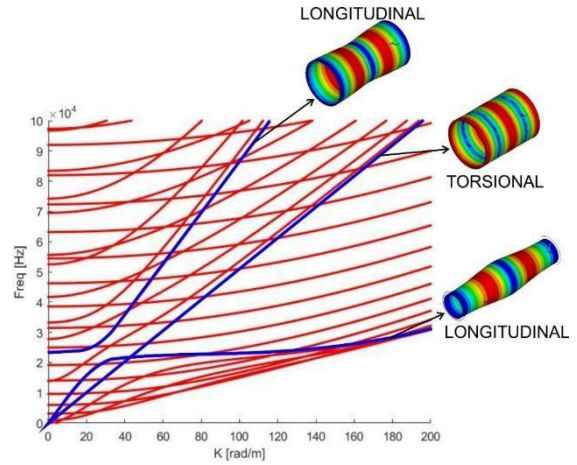


Figura 65. Gráfica (k, f) con los modos de propagación L y T en el caño estudiado.

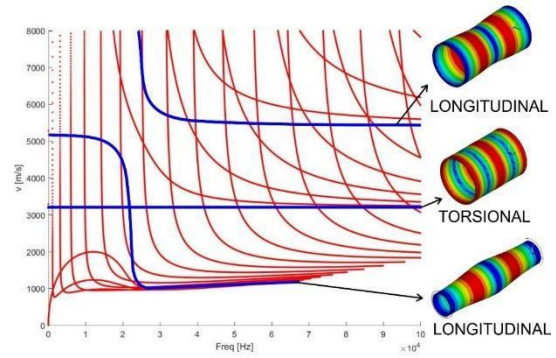


Figura 66. Gráfica (f, C_p) con los modos de propagación L y T en el caño estudiado.

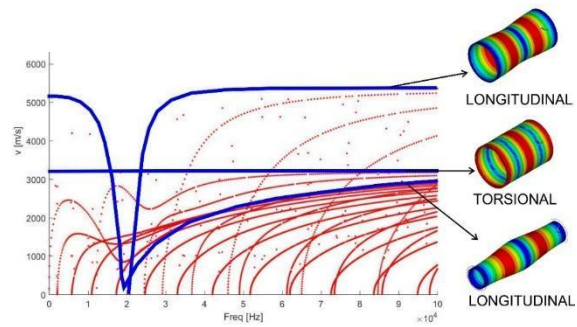


Figura 67. Gráfica (f, C_G) con los modos de propagación L y T en el caño estudiado.

Se puede observar que, ante la necesidad de utilizar ondas guiadas para realizar inspecciones en estructuras cilíndricas, el modo torsional no es dispersivo debido a que su velocidad es constante para todo el rango de frecuencias estudiado, lo que

hace que el procesamiento de los datos recibidos luego de la reflexión y conversión de modo ocurrido en la propagación sea más simple. Esto significa que, definiendo la frecuencia de trabajo al momento de la inspección y la disposición de los transductores, se puede generar una onda puramente torsional que se propaga a lo largo de la estructura con la velocidad correspondiente calculada en las curvas de dispersión. Las señales recibidas generadas en los defectos presentes en la estructura se procesarán de acuerdo al tiempo de arribo, permitiendo estimar la distancia aproximada a la cual se encuentra el defecto.

Se puede observar que, las curvas de dispersión obtenidas, se verifican con las curvas encontradas por Alleyne y Cawley (1996) (Figura 6), quienes también utilizaron una sección circular hueca de 3 pulgadas de diámetro, identificando los modelos longitudinales, de flexión y torsión que se corresponden a lo analizado en el presente trabajo.

4. Conclusiones

Mediante el análisis de los modos presentes en las curvas obtenidas, se logró verificar de manera tridimensional el tipo de excitación que polariza en cada uno de estos modos durante su propagación, pudiendo vincularlos con los modos disponibles en la bibliografía.

La utilización de ondas guiadas como método de inspección es importante debido a su gran utilidad para la predicción de la vida remanente de las estructuras estudiadas, agilizando los tiempos de inspección gracias a su capacidad de ensayar grandes distancias (de acuerdo a las condiciones donde la estructura se encuentre) y brindar datos de posibles defectos y una aproximación de su localización.

El modo torsional es el más útil para realizar una inspección por ondas guiadas, debido a que no es dispersivo para ningún rango de frecuencias visto. Por lo tanto, es primordial el desarrollo de técnicas de inspección en las que este modo pueda ser excitado para su implementación.

Las curvas fueron calculadas con un programa validado para cálculo de curvas de dispersión y verificadas con los resultados de otros autores.

5. Referencias

Alleyne, D. and Cawley, P. (1996). *The excitation of Lamb waves in pipes using dry coupled piezoelectric transducers*. Journal of Nondestructive Evaluation, 15(1), p.11-20.

Anslys, I. (2009). *Programmer's Manual for Mechanical APDL*. Ansys, Inc.

Auld, A. B. (1973) *Acoustic Fields and Waves in Solids*. Vol. I. Jonh Wiley and Sons Inc.

Bartoli, I., Marzani, A., Lanza di Scalea, F., and Viola, E. (2006). *Modeling wave propagation in damped waveguides of arbitrary crosssection*. J. Sound Vib., 295, p 685–707.

Boeraeve, P. (2010). *Introduction to The Finite Element Method*. Institut Gramme. LIEGE.

Cegla, F. B. (2008). *Energy concentration at the center of large aspect ratio rectangular waveguides at high frequencies*. Journal of Acoustical Society of America, vol. 123, p. 4218–4226.

Dong, S. B., & Nelson, R. B. (1972). *On natural vibrations and waves in laminated orthotropic plates*. Journal of applied mechanics, 39(3), 739-745.

Gavrić, L. (1995). *Computation of propagative waves in free rail using a finite element technique*. Journal of Sound and Vibration. 185(3), 531-543.

Grosse, C. U., Ohtsu M. (2008) *Acoustic Emission Testing: Basics for Research - Applications in Civil Engineering*. Springer.

Hayashi, T, Kawashima, K, Rose, J. L. (2004). *Calculation for guided waves in pipes and rails*. Key Engineering Materials Vols 270-273 p 410-415.

Hayashi, T., Song, W, Rose, J. L. (2003). *Guided wave dispersion curves for a bar with an arbitrary crosssection, a rod and rail example*. Ultrasonics Vol. 41 No.3 p 175-183.

Idzi, J. L. (2017). *Estudio Numérico de la Propagación de Ondas Guiadas en Rieles*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Matt, H., Bartoli, I., & Lanza di Scalea, F. (2005). *Ultrasonic guided wave monitoring of composite wing skin-to-spar bonded joints in aerospace structures*. The Journal of the Acoustical Society of America, 118(4), 2240-2252.

Ohtsu & Groose (2009). *The history and development of acoustic emission in concrete engineering*. Magazine of concrete research, 48(177): 321–330

Rose, J. L. (2014). *Ultrasonic Guided Waves in Solid Media*. Vol. I. Cambridge University, Press.

Síntesis, caracterización y evaluación de la remoción de Arsénico en matrices de quitosano con hierro

Synthesis, characterization and evaluation of Arsenic removal on chitosan matrices with iron

Cintia C. Lobo¹, Josefina Castellari¹, Jorge E. Colman Lerner², Nora C. Bertola¹, Noemi E. Zaritzky^{1,3}

1. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET-CIC) Calle 47, La Plata (B1900AJJ), Argentina.
2. Centro de Investigaciones en Ciencias Aplicadas (CINDECA-UNLP-CONICET-CIC), calle 47 N° 257, La Plata (B1900AJK), Argentina.
3. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, calle 47 y 116 s/n, La Plata (1900), Argentina.

E-mail: zaritzkyoemi@gmail.com

Resumen

La contaminación con Arsénico (As) en aguas subterráneas de la llanura Chaco-Pampeana constituye un riesgo potencial por ingesta para 4 millones de personas. Debido a los graves efectos del As sobre la salud la Organización Mundial de la Salud ha recomendado un límite máximo permitido de 0,01 mg/L de As. En el presente trabajo se sintetizaron matrices de quitosano conteniendo iones férricos en concentraciones 0,7 y 11,2 % p/p de Fe⁺³ por gelificación ionotrópica (matrices Q-Fe) y por liofilización (matrices LQ-Fe). Estas matrices presentaron diferencias en su microestructura y el espectro FTIR obtenido post adsorción de As indicó la posible interacción electrostática entre los grupos amino de matrices Q-Fe y LQ-Fe con As. Las matrices sintetizadas fueron efectivas en la remoción de 0,3 mgAs/L obteniéndose valores finales inferiores a la norma establecida por la OMS. Cuando se analizó la capacidad de adsorción se observó un leve incremento para la matriz liofilizada con 11,2 % p/p de Fe⁺³ en la matriz. Finalmente, estas matrices pueden constituir un material adsorbente emergente y sustentable para la remoción de As.

Palabras clave: Matrices, adsorción quitosano, arsénico.

Abstract

Contamination with Arsenic (As) in groundwater of the Chaco-Pampeana plain constitutes a potential risk for ingestion for 4 million people. Due to the serious effects of As on health, the World Health Organization (WHO) has recommended a maximum limit of 0,01 mg/L of As. In the present work, chitosan matrix containing ferric ions (Fe⁺³) in concentrations 0,7 and 11,2% w/w were synthesized, by ionotropic gelation (Q-Fe matrices) and by lyophilization (LQ-Fe matrices). These matrices showed differences in their microstructure and the FTIR spectrum obtained after the adsorption of As, indicated the possibility of electrostatic interactions between the amino groups of Q-Fe and LQ-Fe matrices with As. The synthesized matrices were effective in the removal of 0,3 mgAs/L obtaining final values lower than the limits established by the WHO. When the adsorption capacity was analyzed, the lyophilized matrix with 11,2% w/w Fe⁺³ in the matrix showed higher values. Finally, these matrices could constitute an emerging and sustainable adsorbent material for the removal of As.

Keywords: Matrix, adsorption, chitosan, arsenic.

1. Introducción

La contaminación con Arsénico (As) ocurre por la liberación de As a suelos y acuíferos debido a procesos naturales como fenómenos volcánicos y desintegración de rocas. A su vez, las actividades humanas como la minería, los procesos industriales,

la fundición de metales, la producción de pesticidas y de preservadores de madera aportan una contaminación adicional en suelos y acuíferos (Nicoll et al. 2012). La presencia de As en aguas subterráneas empleadas para consumo es un tema de gran preocupación en varios países tales como: Argentina, Estados Unidos, China, Chile, Taiwán,

México, Argentina, Polonia, Canadá, Hungría, Nueva Zelanda, Japón e India (Paoloni et al. 2009). En Argentina el As se encuentra presente en aguas subterráneas en alrededor de un millón de km² de diferentes áreas de la Puna y la Llanura Chaco-Pampeana (Nicolli et al. 2008). Por lo tanto, en esta región se estima que 4 millones de personas están expuestas a altas concentraciones de As. La presencia de As ha ocasionado la existencia del hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), enfermedad que se manifiesta principalmente por alteraciones dermatológicas, evolucionando hacia patologías graves como cáncer. Por ello, la Organización Mundial de la Salud ha recomendado un límite máximo permitido de 0.010mg/L de As en agua apta para consumo humano (OMS, 2011). Los métodos de remoción de As incluyen: precipitación, oxidación-coagulación, membranas de intercambio iónico y adsorción (Kowalski, 2014). Actualmente, el empleo de biopolímeros como adsorbentes está ganando más atención como un medio simple, eficaz y económico. La quitina (poli-β-(1,4)-N-acetil-D-glucosamina), segundo polisacárido natural en abundancia, se encuentra en paredes celulares de hongos y exoesqueleto de crustáceos e insectos. Mediante la desacetilación de quitina se obtiene quitosano (poli-β-(1,4)-D-glucosamina-N-acetil-D-glucosamina), un polielectrolito catiónico que exhibe características fisicoquímicas de notable interés. El quitosano puede considerarse un material de bajo costo dado que puede obtenerse como subproducto de la industria pesquera. Este biopolímero puede ser moldeado en varias formas tales como: membranas, micro-esferas, perlas de gel, películas, y matrices porosas, con una relación área/masa que maximiza la capacidad de adsorción. Si bien, el quitosano puede utilizarse como adsorbente para la eliminación de As de agua, presenta baja capacidad de adsorción (Kwok et al. 2014). La combinación de quitosano con óxidos de hierro (Fe⁺³) tales como óxido férrico hidratado amorfo y cristalino ha sido propuesta para incrementar la efectividad de remoción de As (Ravenscroft et al. 2011). Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue sintetizar matrices de quitosano con iones férrico mediante gelificación ionotrópica y liofilización, caracterizar su estructura y evaluar la remoción de As en aguas.

2. Materiales y métodos

Síntesis de matrices no porosas de quitosano con iones férrico (Q-Fe) esféricas

El quitosano empleado fue disuelto en la solución de Fe(NO₃)₃·9H₂O y ácido acético a 50°C bajo agitación constante. Se realizaron dos soluciones diferentes de Fe(NO₃)₃·9H₂O 0.1 y 1,6% p/v para formar hidrogeles de quitosano con hierro que contenían 0,7 y 11,2% p/p de Fe⁺³. Las matrices esféricas (Q-Fe) se

formaron por medio de goteo en Na(OH) 0.5 M y se mantuvieron en agitación en la solución de NaOH 2 h para lograr la estabilización de la matriz, luego fueron lavadas con agua destilada varias veces hasta pH=7. Finalmente, se secaron en estufa convectiva (Drying Oven Modelo DHG-9123A) a 40°C hasta peso constante (Lobo et al. 2020). Estas matrices Q-Fe se denominaron 0.7 Q-Fe y 11.2 Q-Fe, de acuerdo al contenido de Fe⁺³ en la matriz.

Síntesis de matrices porosas de quitosano con iones férrico (LQ-Fe)

El hidrogel con 0,7 y 11,2% p/p de Fe⁺³ se obtuvo mediante el procedimiento descrito para matrices no porosas Q-Fe. Una vez obtenido cada hidrogel se colocó en moldes de forma cilíndrica y se mantuvieron 24 h a -18°C. Luego, se colocaron en un liofilizador (Rificor Modelo L-A-B3), por 48 h una vez obtenidas las matrices porosas secas se neutralizaron en Na(OH) 0.5 M por 2 h, por último, fueron lavadas varias veces con agua destilada hasta pH=7. Las matrices porosas obtenidas por liofilización (LQ-Fe) se denominaron 0.7 LQ-Fe y 11.2 LQ-Fe, de acuerdo al contenido de Fe⁺³ en la matriz.

Caracterización de las matrices no porosas Q-Fe y porosas LQ-Fe

La microestructura y composición de matrices Q-Fe y LQ-Fe fue analizada en Microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM, Feiquanta 200) filamento de tungsteno en modo alto vacío con detector de electrones secundarios. Este equipo cuenta con un detector de rayos X dispersivo en energía (EDS, Energy Dispersive Spectrometer Edax Apolo 40). El espectro fluorescente de rayos X se obtuvo a partir de la dispersión de energía de rayos X (EDX) a un voltaje de 20.0 kV. Las muestras fueron recubiertas en oro. Además, las matrices Q-Fe y LQ-Fe, pre y post adsorción de As fueron analizadas por espectroscopía infrarroja con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR Nicolet). El rango de número de onda analizado fue 500 - 4000 cm⁻¹ por medio de 32 escaneos con una resolución espectral de 4 cm⁻¹.

Remoción de Arsénico empleando matrices no porosas Q-Fe y porosas LQ-Fe.

Se analizó la adsorción de As(V) 0,3 mg/L de As inicial, utilizando las siguientes concentraciones de matrices: Q-Fe 0.7 y 11.2 de 1 g/L, 0.7 LQ-Fe de 1,3 g/L y 11.2 LQ-Fe de 1 g/L; pH 5.10 y temperatura 25°C. Los ensayos fueron realizados en un incubador shaker (Barnstead MaxQ4000) a 25°C y 200 rpm. Se determinó el porcentaje de remoción como:

$$\%Remoción = \frac{C_i - C_t}{C_i} * 100 \quad (1)$$

donde C_i y C_t son las concentraciones de As (mg/L) iniciales y en el tiempo t (24h). La cantidad de As(V) (mg) adsorbido por unidad de masa de matriz (g) fue determinado como:

$$q = \frac{C_i - C_t}{m} * V \quad (2)$$

donde q corresponde a la capacidad de adsorción de As(V) a 24 h (mgAs/(gmatriz), C_i y C_t mantienen las definiciones anteriores, m la masa seca del adsorbente adicionado (g) y V (L) el volumen de la solución. La concentración de As fue determinada mediante un espectrómetro de absorción atómica (Shimadzu AA-7000) equipado con una lámpara de cátodo hueco para medir las concentraciones de As. La generación del hidruro se obtuvo tratando la muestra que contenía As con una solución de borohidruro de sodio (NaBH_4) en medio ácido (HCl 6 N). La curva de calibración (2, 10, 20 y 50 $\mu\text{g/L}$) se realizó a partir de una solución stock estándar de As 1000 mg/L (Accustandard).

3. Resultados y Discusión

Síntesis y características estructurales de matrices Q-Fe y L-QFe

La disolución de quitosano en 0,7 y 11,2% p/p de Fe^{+3} permitió obtener hidrogeles homogéneos con una intensidad de color que se incrementó en función de la concentración de hierro. A partir de los hidrogeles obtenidos, se sintetizaron matrices Q-Fe (0.7 y 11.2 Q-Fe) mediante gelificación iónica. En esta técnica, el polisacárido de quitosano se disuelve en una solución ácida acuosa para obtener el catión de quitosano. A continuación, el quitosano solubilizado se añade en forma de gota a gota a una solución de Na(OH) bajo agitación continua. Debido a la formación de complejos entre especies con carga opuesta, el quitosano sufre una solidificación y precipita en forma de partículas esféricas. Las matrices Q-Fe sintetizadas fueron esféricas con un diámetro aproximado para de 1,3 mm. En la Figura 1 (a,b) se observa que las matrices Q-Fe hidratadas mostraron una forma aproximadamente esférica con incremento de intensidad de color en función de la concentración de hierro en la matriz de manera similar a la observada en el hidrogel. Se analizó la morfología de la superficie de las matrices secas con distinta proporción de hierro mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Como se muestra en la Figura 1 (c-d) las matrices Q-Fe presentaron una estructura externa uniforme y no porosa. Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido acoplada a un detector de rayos X de dispersión de energía se obtuvo el espectro SEM-EDS de hierro y As en las matrices de 0.7 y 11.2 Q-Fe post adsorción de una solución de 0,3 mg/L de As. En el espectro EDS de la matriz 0.7 Q-Fe se obtuvo un pico

correspondiente al hierro (Figura 2a), como puede observarse en la Figura 2b la intensidad del pico para hierro incrementó su altura debido a la mayor concentración de hierro en la matriz 11.2 Q-Fe. Además, en ambas muestras se observó la presencia de As como resultado del proceso de adsorción de As en las matrices Q-Fe analizadas.

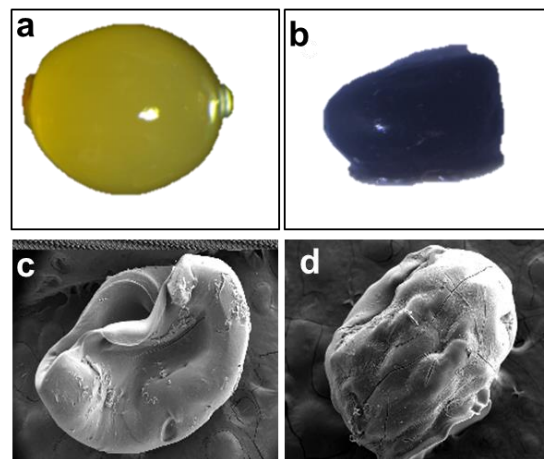


Figura 68. Análisis de microestructura matrices no porosas Q-Fe post adsorción de As. a) y b), Micrografía de estereomicroscopio; d) y e), Micrografía SEM de la superficie. Matrices: 0.7 Q-Fe (a, c), y 11.2 Q-Fe. (b, d).

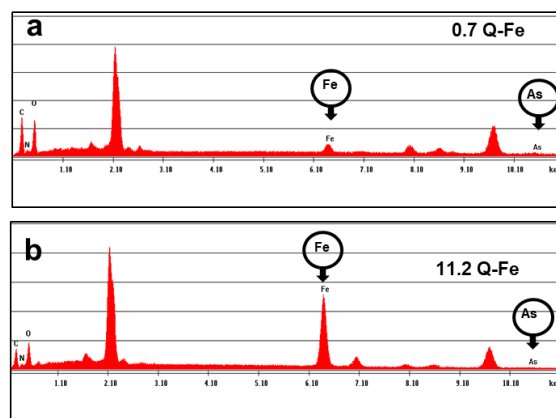


Figura 69. Espectro de microanálisis por EDS. a) Matrices 0.7Q-Fe y b) Matrices 11.2 LQ-Fe.

Las matrices porosas de quitosano con hierro (LQ-Fe) se sintetizaron por medio de la técnica de liofilización. En este método la estructura porosa se formó mediante el proceso de congelación del hidrogel quitosano con distintas proporciones de hierro (0.7 y 11.2 LQ-Fe) y la posterior sublimación del agua bajo condiciones de vacío (liofilización) (Dragan y Dinu, 2020). Las matrices 0.7 y 11.2 LQ-Fe liofilizadas obtenidas se colocaron en una solución de NaOH 0.5 M por 2 h esto permitió neutralizar el pH 2.5 empleado en la disolución del hidrogel quitosano con hierro. En la Figura 3 a,b se observa que las matrices LQ-Fe tuvieron una forma cilíndrica

debido al molde empleado en su síntesis y un incremento de intensidad de color en función de la concentración de hierro en la matriz de manera similar las matrices Q-Fe. Las matrices LQ-Fe presentaron un diámetro de 0,9 mm y la altura 10 mm, aproximadamente. En la Figura 3 c,d se puede observar una estructura de tipo porosa y similar para ambas matrices LQ-Fe. En la Figura 4 a,b se muestran los espectros SEM-EDS de matrices 0.7, y 11.2 LQ-Fe post adsorción de una solución de 0,3 mg/L de As. Al igual que en las matrices Q-Fe, se obtuvo un pico correspondiente al hierro con una intensidad creciente en función de la concentración de hierro en la matriz LQ-Fe analizada. Además, en muestras 0.7 LQ-Fe y 11.2 LQ-Fe analizadas post adsorción de As se observó la presencia de As como resultado del proceso de adsorción.

Por otro lado, se analizaron los cambios en los grupos funcionales de matrices Q-Fe y LQ-Fe pre y post adsorción de As.

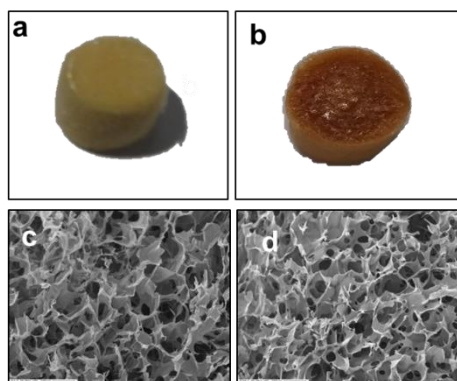


Figura 70. Análisis de microestructura, SEM de matrices porosas LQ-Fe post adsorción de As. a) y b), Micrografía de estereomicroscopio; d) y e), Micrografía SEM de la superficie. Matrices: 0.7 LQ-Fe (a, c), y 11.2 LQ-Fe (b, d).

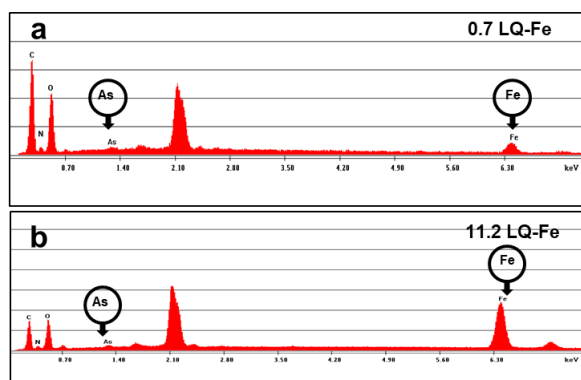


Figura 71. Espectro de microanálisis por EDS. a) Matrices 0.7 Q-Fe y b) Matrices 11.2 LQ-Fe.

En las Figura 5 se encuentra el espectro obtenido mediante FTIR para quitosano, matrices Q-Fe y matrices porosas LQ-Fe pre y post adsorción de As.

El análisis de las bandas se centró en el intervalo de número de onda entre 1800-1200 cm^{-1} . En el espectro FTIR de quitosano, la banda en 1651 cm^{-1} se asigna a la flexión del grupo NH_2 ; la banda a 1563 cm^{-1} corresponde al grupo NH_2 de la amida II y a 1420 cm^{-1} a la flexión OH corresponde al grupo alcohol primario. Asimismo, la absorción a 1374 cm^{-1} se corresponde a la flexión O-H y a 1149 cm^{-1} al estiramiento C-N (Wang, Xu et al. 2014, Pérez-Calderón, Santos et al. 2018).

Estos máximos descriptos son característicos del espectro FTIR para quitosano. Como se puede observar en la Figura 5a la presencia de estas bandas características del biopolímero quitosano permanecieron prácticamente sin cambios en las matrices 0.7Q-Fe y 11.2 Q-Fe tanto en muestras sin contacto con As como en matrices Q-Fe post adsorción de As. Sin embargo, en ambas matrices Q-Fe después de la adsorción de As se observó que la intensidad de la banda a 1563 cm^{-1} disminuyó. Esto pudo deberse a la interacción electrostática entre los grupos de As y NH_2 . Cho et al. (2012), observaron una disminución en la intensidad de las amidas y las bandas de amina, después de la adsorción de As en un adsorbente formado por quitosano/arcilla/ Fe_3O_4 .

En el espectro de las matrices 0.7 y 11.2 LQ-Fe (Figura 5b) se observan varias modificaciones respecto del espectro de quitosano tales como un leve desplazamiento del pico de 1651 cm^{-1} del doblez de tijera del grupo amino a 1637 cm^{-1} en el espectro de la matriz 0.7 LQ-Fe y a 1628 cm^{-1} en el espectro de la matriz 11.2 LQ-Fe. Asimismo, el pico correspondiente al grupo Amida II presente en Q a 1563 cm^{-1} presenta un leve desplazamiento a 1151 y 1528 cm^{-1} para la matriz 0.7 y para 11.2 LQ-Fe, respectivamente. Los picos correspondientes a amida I ($-\text{NH}_2$) con flexión simétrica “tijera” de amida I en 1375 y 1420 cm^{-1} , presentaron cambios de intensidad en la matriz 11.2 LQ-Fe. Además, como puede observarse los espectros FTIR de matrices LQ-Fe presentaron marcadas modificaciones post adsorción de As. En la matriz 0.7 LQ-Fe se observó un desplazamiento del pico de 1563 cm^{-1} del doblez de tijera del grupo amino a 1560 cm^{-1} y una disminución de intensidad. Esta variación también se observó en el espectro de la matriz 11.2 LQ-Fe y puede atribuirse a una interacción electrostática entre arseniato y el grupo amino del quitosano. Además en ambas matrices LQ-Fe post adsorción de As se evidenció una disminución en las bandas a 1420, 1375 cm^{-1} correspondientes a amida I ($-\text{NH}_2$) con flexión simétrica “tijera” de amida I.

Los cambios observados en las bandas correspondientes a grupo amino en las matrices Q-Fe y LQ-Fe post adsorción de As pueden corresponder a interacciones electrostáticas entre el ión arseniato y

el grupo amino presente en la matriz favorecidas por el pH empleado (pH 5.10).

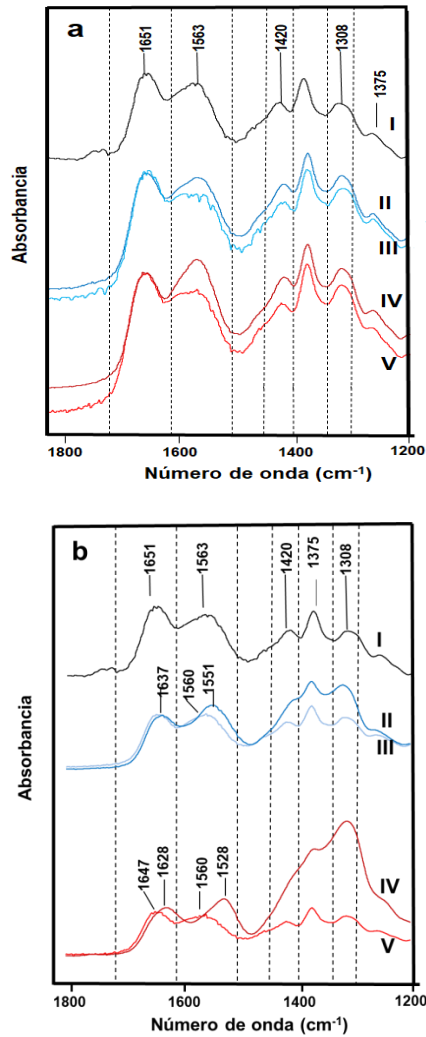


Figura 72. Espectros FTIR de matrices no porosas Q-Fe y matrices porosas LQ-Fe. a) Matrices Q-Fe, en el espectro I. Quitosano, II. 0.7Q-Fe, III. 0.7 Q-Fe post adsorción de As, IV. 11.2 Q-Fe, V. 11.2 LQ-Fe post adsorción de As. b) Matrices LQ-Fe, en el espectro I. Quitosano, II. 0.7 LQ-Fe, III. 0.7 LQ-Fe post adsorción de As, IV.11.2 LQ-Fe, V. 11.2 LQ-Fe post adsorción de As.

Remoción de Arsénico empleando matrices no porosas Q-Fe y porosas LQ-F

Se evaluó la remoción de 0,3 mg/L de As empleando las matrices sintetizadas. En todas las matrices Q-Fe y LQ-Fe con distinta proporción de hierro, se obtuvieron concentraciones finales de As inferiores al límite establecido por la OMS de 0,01mg/L. En la Figura 6 se encuentran los porcentajes de remoción (Figura 6a) y la capacidad de adsorción (q, Figura 6b) para matrices Q-Fe y LQ-Fe. Como puede observarse el porcentaje de remoción obtenido fue similar: 97.9 ± 0.16 y 94.2 ± 0.19 para matrices no porosas 0.7 Q-Fe y porosas 0.7 LQ-Fe, respectivamente. La

capacidad de adsorción (q) calculada fue levemente superior en matrices 0.7 Q-Fe $0,29 \pm 0,003$ mgAs/g matriz seca respecto de las matrices 0.7 LQ-Fe ($0,22 \pm 0,0004$ mgAs/g matriz seca). En cambio, la remoción de As en matrices no porosas 11.2 Q-Fe y porosas 11.2 LQ-Fe fue superior a la obtenida con matrices de menor proporción de hierro. En ambos casos el porcentaje de remoción fue superior a 98%. Además, cuando la concentración de hierro fue mayor la matriz liofilizada se obtuvo un leve incremento de la capacidad de adsorción; q fue de $0,28 \pm 0,003$ mgAs/g matriz seca y $0,30 \pm 0,003$ mgAs/g matriz seca, para matrices 11.2 Q-Fe y 11.2 LQ-Fe, respectivamente.

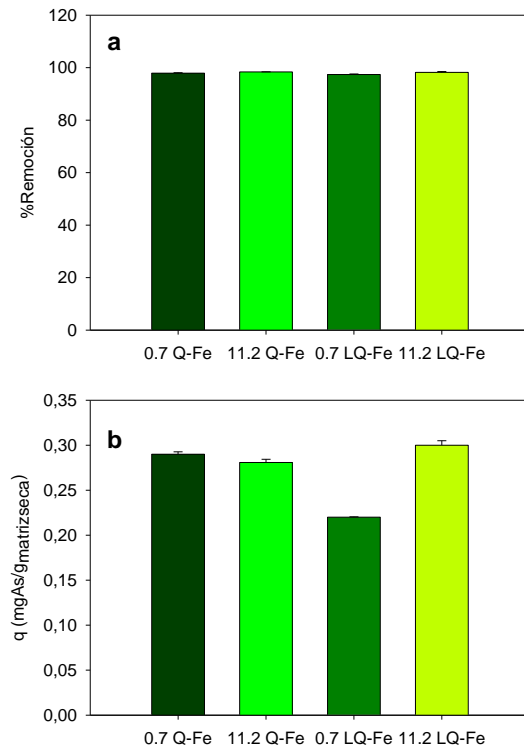


Figura 73. a) Porcentaje de remoción de remoción de 0.3 mgAs/L en matrices Q-Fe y LQ-Fe. b) Capacidad de adsorción (q; mgAs/gmatrizseca) para matrices Q-Fe y LQ-Fe.

4. Conclusiones

Se sintetizaron matrices de quitosano con distinta proporción de iones férrico mediante gelificación inotrópica (matriz Q-Fe) y liofilización (matriz LQ-Fe). Estas matrices presentaron diferencias en su microestructura, observándose en las matrices liofilizadas una estructura de tipo porosa. En ambas matrices la estructura no se vio modificada por un incremento de la concentración de hierro en la matriz. El espectro FTIR en todas matrices conservó los picos y bandas características del biopolímero quitosano. En cambio, el espectro FTIR obtenido post adsorción de As en matrices Q-Fe y LQ-Fe presentó variaciones

en la intensidad de los picos correspondientes al grupo amino, indicando la posible interacción electrostática entre los grupos amino de matrices Q-Fe y LQ-Fe con As. Finalmente, las matrices sintetizadas fueron efectivas en la remoción de 0,3 mg/L de As obteniéndose valores de As finales debajo de la norma establecida por la OMS. Se observó que el incremento de hierro y la formación de una estructura de tipo porosa incrementan levemente la capacidad de adsorción de la matriz. Finalmente, las matrices sintetizadas constituyen un material emergente para el desarrollo de sistemas de remoción de As en aguas subterráneas.

5. Referencias

- Cho, D.-W., B.-H. Jeon, C.-M. Chon, Y. Kim, F. W. Schwartz, E.-S. Lee and H. Song (2012). "A novel chitosan/clay/magnetite composite for adsorption of Cu (II) and As (V)." *Chemical Engineering Journal* 200: 654-662.
- Dragan, E. S. and M. V. Dinu (2020). "Advances in porous chitosan-based composite hydrogels: Synthesis and applications." *Reactive and Functional Polymers* 146: 104372.
- Kowalski, K. P. (2014). *Advanced arsenic removal technologies review*. Chemistry of Advanced Environmental Purification Processes of Water, Elsevier: 285-337.
- Kwok, K. C., L. F. Koong, G. Chen and G. McKay (2014). "Mechanism of arsenic removal using chitosan and nanochitosan." *Journal of colloid and interface science* 416: 1-10.
- Lobo, C., J. Castellari, J. Colman Lerner, N. Bertola and N. Zaritzky (2020). "Functional iron chitosan microspheres synthesized by ionotropic gelation for the removal of arsenic (V) from water." *International Journal of Biological Macromolecules* 164: 1575-1583.
- Nicolli, H. B., J. Bundschuh, M. d. C. Blanco, O. C. Tujchneider, H. O. Panarello, C. Dapena and J. E. Rusansky (2012). "Arsenic and associated trace-elements in groundwater from the Chaco-Pampean plain, Argentina: results from 100 years of research." *Science of The Total Environment* 429: 36-56.
- Nicolli, H., O. Tujchneider, M. Paris, M. Blanco and A. Barros (2008). *Sources and mobility of arsenic in groundwater from centre-north plain of Santa Fe Province, Argentina*. Proceedings of the 2nd. International Congress: Arsenic in the environment: "Arsenic from Nature to Humans.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2011). "Guidelines for Drinking-Water Quality." World Health Organization 4.
- Paoloni, J. D., M. E. Sequeira, M. E. Espósito, C. E. Fiorentino and M. d. C. Blanco (2009). "Arsenic in Water Resources of the Southern Pampa Plains, Argentina." *Journal of Environmental and Public Health* 2009: 216470.
- Pérez-Calderón, J., M. V. Santos and N. Zaritzky (2018). "Reactive RED 195 dye removal using chitosan coacervated particles as bio-sorbent: Analysis of kinetics, equilibrium and adsorption mechanisms." *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(5): 6749-6760.
- Ravenscroft, P., H. Brammer and K. Richards (2011). *Arsenic pollution: a global synthesis*, John Wiley & Sons.
- Wang, J., W. Xu, L. Chen, X. Huang and J. Liu (2014). "Preparation and evaluation of magnetic nanoparticles impregnated chitosan beads for arsenic removal from water." *Chemical Engineering Journal* 251: 25-34.

Geometría computacional y análisis biomecánico de una intervención endovascular en aneurismas cerebrales mediante láminas delgadas de Kirchhoff-Love de espesor variable

Computational geometry and biomechanical analysis of an endovascular intervention in cerebral aneurysms using Kirchhoff–Love shells of nonuniform thickness

Nicolás Muzi^{1,2}, Francesco Camussoni^{3,4}, Luis G. Moyano^{3,4}, Daniel Millán^{1,2}

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael (5600), Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (C1425FQB), Buenos Aires, Argentina.
3. Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo, Av. Bustillo 9500, San Carlos de Bariloche (8400), Argentina.
4. Grupo de Física Estadística e Interdisciplinaria (FiEstIn), Centro Atómico Bariloche, CNEA, Av. Bustillo 9500, San Carlos de Bariloche (8400), Argentina.

E-mail: dmillan@mendoza-conicet.gob.ar

Resumen

En la actualidad, los mecanismos de ruptura de aneurismas intracraneales no han sido caracterizados en su totalidad. El riesgo de ruptura durante la intervención endovascular de oclusión podría incrementarse debido a cargas localizadas en regiones cercanas al cuello del aneurisma, una situación común durante el procedimiento. Como un primer acercamiento al desarrollo de un análisis aplicable a una gran cantidad de casos con relevancia estadística, describimos la cinemática de deformación mediante un modelo de láminas delgadas geoméricamente no lineales bajo la teoría de Kirchhoff-Love, en conjunto con un modelo material hiperelástico de Kirchhoff-St. Venant. Si bien este modelo no refleja la complejidad del tejido arterial, este enfoque nos permite considerar la aplicación de una carga localizada en múltiples ubicaciones de la arteria para una base de datos con número significativo de casos, imitando el efecto de un microcatéter utilizado en el tratamiento endovascular. Realizamos simulaciones numéricas en 4 casos de la base de datos AneuriskWeb, y presentamos resultados preliminares considerando un espesor variable entre la arteria y el domo del aneurisma, poniendo el foco en la construcción de las mallas de superficie y en los experimentos realizados.

Palabras clave: Aneurismas intracraneales, biomecánica de arterias cerebrales, mecánica computacional, procesamiento de mallas de superficie.

Abstract

The mechanism of aneurysm rupture is still not fully understood. The rupture risk of the intervention may increase during endovascular occlusion of cerebral aneurysms due to a localized load in the parent vessel close to the neck, a common day-to-day situation. As a first attempt on the road towards developing a plausible analysis capable of dealing with many cases in a statistical sense, we describe the deformation kinematics using a geometrically nonlinear thin shell model under Kirchhoff-Love's assumptions in conjunction with a simplistic Kirchhoff-St. Venant's hyperelastic material model. Though it cannot assess the artery's complexity, this more straightforward yet not trivial approach enables us to statistically study the application of a concentrated load in many locations, which mimics the action of an instrument during the endovascular treatment. We performed numerical simulations on 4 cases from the AneuriskWeb Database. We present preliminary results considering a smoothly varying thickness between the parent vessel and the aneurysm dome, focusing on the mesh construction process and loading.

Keywords: Intracranial aneurysms, cerebral artery biomechanics, computational mechanics, mesh surface processing.

1. Introducción

Cuando se diagnostica un aneurisma intracraneal no roto (UIA, por sus siglas en inglés) la respuesta más común es la oclusión. Sin embargo, el tratamiento endovascular muestra índices de morbilidad (5%-7%) y mortalidad (1%-2%) no despreciables (Lindgren et al., 2016). Adicionalmente, dado que los UIAs son relativamente comunes, con una prevalencia de hasta el 6% (Wardlaw y White, 2000; Vlak et al., 2011), y que muchos de ellos nunca se rompen (sólo $\frac{1}{3}$ en una cohorte con seguimiento de por vida (Lindgren et al., 2016)), los médicos frecuentemente se encuentran en la dicotomía de tratarlos o no (Van Rooij y Sluzewski, 2006). Particularmente, además de factores hemodinámicos, quimo-mecánicos y morfológicos asociados a la ruptura de aneurismas saculares (Radaelli et al., 2015; Kayembe et al., 1984; Forget Jr et al., 2001; Costalat et al., 2011; Millán et al., 2007), el riesgo de ruptura durante la intervención puede incrementarse debido a las fuerzas externas aplicadas cerca del cuello del aneurisma por los instrumentos utilizados por los profesionales, alterando su estabilidad estructural. Un incremento en la tensión del microcatéter durante la intervención puede llevar a un súbito “salto” de éste hacia adelante (Orrú et al., 2013), generando complicaciones tales como la ruptura de la arteria, daño en la tunica íntima, complicaciones tromboembólicas (Lee et al., 2011) o perforaciones del domo del aneurisma, causando efectos mucho más graves que al perforarse por la acción del coil (Pierot y Wakhloo, 2013; Cloft y Kallmes, 2013). El estudio de este problema presenta grandes desafíos dada la necesidad de modelar la biomecánica de la pared arterial, la cual implica considerar una estructura multicapa de materiales compuestos altamente complejos, cada uno con un comportamiento mecánico diferente (Humphrey y Canham, 2000; Savastano et al., 2018; Frösen, 2014; Tulamo et al., 2018). Además, la pared del aneurisma muestra grandes variaciones en su estructura y comportamiento mecánico, lo que se traduce en una mayor fragilidad en el domo y en la zona de transición ubicada en el cuello.

Se han hecho grandes avances en el modelado de la biomecánica arterial. Por ejemplo, considerando modelos materiales no lineales incompresibles como un sólido de Mooney-Rivlin, materiales multicapa, o incluso considerando orientaciones de fibras (Watton et al., 2009; Selimovic et al., 2014). Desafortunadamente, estos trabajos consideran geometrías teóricas simples y una baja cantidad de casos. Además, es notable la falta de un estudio sistemático en una población estadísticamente significativa, que puede estar relacionada ya sea con la alta demanda de recursos del modelo, con la imposibilidad de especificar una serie de parámetros para realizar simulaciones en pacientes, o ambas. Con el fin de desarrollar un análisis capaz aplicable a una

gran cantidad de casos con relevancia estadística, describimos la cinemática de deformación mediante un modelo de láminas delgadas geoméricamente no lineales bajo la teoría de Kirchhoff-Love, en conjunto con un modelo material hipereelástico de Kirchhoff-St. Venant. Si bien estas suposiciones no reflejan la complejidad del tejido arterial, nos permiten estudiar la aplicación de una carga localizada en múltiples ubicaciones de la arteria para una base de datos con número significativo de casos (ver Base de datos AneuriskWeb). Adicionalmente y como una “prueba de concepto”, consideramos un mayor espesor en la arteria respecto al domo del aneurisma, así como módulos de Young diferentes en ambas regiones, buscando representar la falta de uniformidad del problema real.

En la sección 2 se presenta la base de datos utilizada y se hace una breve descripción del modelo de láminas delgadas no lineal considerado, el modelo de la carga aplicada, la implementación numérica y la consideración de espesor variable. Además, se detalla el tratamiento de los modelos geoméricos de la base de datos para obtener las mallas necesarias para la simulación. En la sección 3 se analizan los resultados obtenidos para cuatro casos seleccionados. Finalmente, se muestran algunas conclusiones en la sección 4.

2. Materiales y métodos

En primer lugar, se describe la base de datos AneuriskWeb, de donde se obtuvieron los modelos geoméricos utilizados. En segundo lugar, se presenta una breve descripción del modelo de láminas delgadas geoméricamente no lineales bajo la teoría de Kirchhoff-Love (tracción y flexión). El modelo de carga localizada se detalla en tercer lugar, seguida de información acerca de la implementación numérica y la consideración de espesor variable como función de la distancia geodésica al cuello del aneurisma. Finalmente, se detalla el procedimiento utilizado en la generación y tratamiento de los modelos geoméricos necesarios para el cálculo de la biomecánica.

Base de datos AneuriskWeb

La base de datos consultada es un conjunto de imágenes médicas y datos de aneurismas obtenidos del proyecto Aneurisk entre 2005 y 2008, financiado por SIEMENS Medical Solutions en colaboración con múltiples instituciones médicas y llevado a cabo en el Laboratorio para Modelado y Cálculo Científico (MOX), del Departamento de Matemáticas del Politécnico de Milano (Aneurisk-Team, 2012). La base de datos contiene 103 modelos geoméricos (mallas de triángulos) de aneurismas intracraneales de 99 pacientes, obtenidos a partir de angiografías rotacionales 3D (23 de ellas están disponibles en la

base de datos), con una resolución espacial de 0.3 mm (256 x 256 x 256) y segmentados a través de un proceso semi-automatizado validado por un experto. Para cada caso además se cuenta con el *ostium* (polígono describiendo el cuello), las líneas centrales del vaso sanguíneo (ver Figura 1) y algunos parámetros geométricos como la ubicación, clasificación (lateral o terminal) y estado de ruptura.

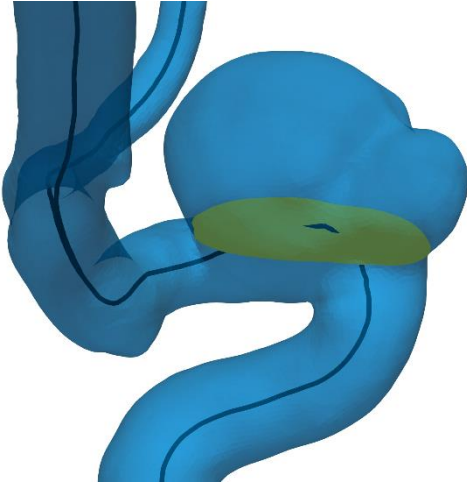


Figura 74. Modelo geométrico del aneurisma y el árbol arterial, líneas centrales (en negro) y polígono que describe el cuello (ostium).

Modelo elástico de láminas delgadas geoméricamente no lineales

En esta sección se describe brevemente la mecánica de láminas delgadas, basada en una formulación geoméricamente exacta (Simo y Fox, 1989). Se considera la teoría de láminas de Kirchhoff-Love, por lo que se desprecian los esfuerzos de corte y la deformación normal a la superficie media de la lámina delgada. En esta teoría el vector director de dicha lámina permanece normal a la superficie media durante la deformación (ver (Millán et al., 2013) y sus referencias).

Se asume que el cuerpo puede describirse mediante el par (φ, \mathbf{t}) , donde el mapeo φ corresponde a la superficie media Ω de la lámina delgada, y \mathbf{t} es un campo de vectores unitarios (campo director). Se asume un espesor variable h , además de considerar despreciable el cambio de espesor luego de la deformación. El subíndice 0 hace referencia a la configuración de referencia; por ejemplo, φ_0 parametriza la superficie media de referencia. Se sigue la convención usual de índices latinos y griegos (es decir, $i = 1, 2, 3$; $\alpha = 1, 2$), la coma representa derivadas parciales, subíndices indican componentes covariantes y los superíndices componentes contravariantes.

El cuerpo de la lámina delgada \mathcal{S} está dado por

$$\mathcal{S} = \left\{ \Phi \in \mathbb{R}^3 \mid \Phi = \varphi(\xi^\alpha) + \xi \mathbf{t}(\xi^\alpha) \dots, -\frac{h(\xi^\alpha)}{2} \leq \xi \leq \frac{h(\xi^\alpha)}{2}, (\xi^1, \xi^2) \in \mathcal{A} \right\} \quad (1)$$

donde $\mathcal{A} \subset \mathbb{R}^2$ es el espacio paramétrico para la superficie media. Por lo tanto, vemos una configuración Φ como un mapeo de un dominio paramétrico $\mathcal{A} \times [-h/2, h/2]$ en \mathbb{R}^3 . El dominio paramétrico se describe mediante las coordenadas $\{\xi^1, \xi^2, \xi^3\}$ (donde identificamos $\xi = \xi^3$), cuya base dual correspondiente es $\{\mathbf{E}^i\}$.

El elemento área de la superficie media deformada puede calcularse como $d\Omega = \underline{j} d\xi^1 d\xi^2$, donde $\underline{j} = \|\varphi_{,1} \times \varphi_{,2}\|$, y la normal unitaria es $\mathbf{t} = (\varphi_{,1} \times \varphi_{,2})/\underline{j}$. El tensor de deformación de membrana, que mide cambios en el tensor métrico sobre el plano, se define como $\varepsilon_{\alpha\beta} = \frac{1}{2}(\varphi_{,\alpha} \cdot \varphi_{,\beta} - \varphi_{0,\alpha} \cdot \varphi_{0,\beta})$. El tensor de deformación de flexión, que mide cambios en la segunda forma fundamental, está dado por $\rho_{\alpha\beta} = \varphi_{,\alpha} \cdot \mathbf{t}_{,\beta} - \varphi_{0,\alpha} \cdot \mathbf{t}_{0,\beta}$. Además, la deformación se expresa en términos de la cinemática de la superficie media. Para una lámina elástica, la energía potencial se expresa exclusivamente en función del mapeo φ (superficie media), y se escribe como:

$$\begin{aligned} \Pi_{tot}[\varphi] &= \Pi_{int}[\varphi] - \Pi_{ext}[\varphi] \\ &= \int_{\mathcal{S}} W(\varepsilon, \rho) d\mathcal{A} + \int_{\mathcal{S}} \mathbf{q} \cdot (\varphi - \varphi_0) d\mathcal{A} \quad (2) \end{aligned}$$

donde W es la densidad de energía de deformación por unidad de superficie y \mathbf{q} es la carga externa por unidad de área. Se considera un modelo material isotrópico de Kirchhoff-St. Venant como modelo de material elástico.

Carga localizada

El efecto de la carga localizada se modela mediante una función Plateau que decae como función de la distancia geodésica sobre la superficie media de referencia al punto de aplicación. Dicha función está dada como

$$\hat{q}(r) = \frac{\hat{C}}{2\pi\sigma^2} \frac{\exp\left[-\frac{1}{4}\left(\frac{r}{\sigma}\right)^4\right]}{1 + \exp\left[-\frac{1}{4}\left(\frac{r}{\sigma}\right)^4\right]}, \quad (3)$$

donde r es la distancia radial en una región circular infinita, σ es un parámetro que controla el ancho de la función y \hat{C} es una constante calculada de tal forma que la integral $\hat{q}(r)$ sea igual a uno.

Implementación numérica

Para el cálculo de la energía total es necesario obtener la derivada segunda de las deformaciones de la lámina $\boldsymbol{\varphi}$, lo que requiere una aproximación con continuidad C^1 para aplicar una discretización de Galerkin. A causa de esto se usaron elementos finitos de superficies de subdivisión (Cirak y Long, 2011) para aproximar $\boldsymbol{\varphi}$. Se siguió un enfoque Lagrangiano con el mismo espacio de funciones tanto para la configuración deformada como para la de referencia. Sea $\boldsymbol{\varphi}_0$ el mapeo de la configuración de referencia

$$\boldsymbol{\varphi}_{0h}(\xi^1, \xi^2) = \sum_{a=1}^N B_a(\xi^1, \xi^2) \boldsymbol{\varphi}_{0a}, \quad (4)$$

donde $B_a(\xi^1, \xi^2)$ son funciones base de superficies de subdivisión, N es el número de nodos sobre la malla y $\boldsymbol{\varphi}_{0a}$ la posición en el espacio del a-ésimo punto de control definiendo la superficie media de la lámina de referencia.

Es posible además considerar un espesor para la lámina, discretizado como

$$h_h(\xi^1, \xi^2) = \sum_{a=1}^N B_a(\xi^1, \xi^2) h_a, \quad (5)$$

donde h_a son valores predefinidos de espesor en los nodos de referencia. Se sabe que el espesor decae dramáticamente en el cuello del aneurisma; sin embargo, esta transición no ha sido caracterizada (Tulamo et al., 2018; Kadasi et al., 2013). En este trabajo se asume que el espesor de la lámina varía de acuerdo a una arcotangente de la distancia geodésica sobre el aneurisma desde el nodo hasta la curva definida por el ostium. La función considerada para asignar valores de espesor a cada nodo es

$$h_a = \frac{h_v - h_d}{\pi} \left(\tan^{-1} \left(\frac{d_{Ga}}{w} \right) + \frac{\pi}{2} \right) + h_d \quad (6)$$

donde h_v y h_d son valores reportados de espesor en la arteria y en el domo, w es el ancho de la zona de transición y d_{Ga} es el valor de la distancia geodésica entre el a-ésimo nodo y la curva que define el cuello del aneurisma. Esta distancia es calculada por la biblioteca CGAL (CGAL, 2021), sobre la cual se provee más información en el apartado Distancia geodésica.

Al utilizar la función de carga dada por la ecuación 3 para una superficie curva, la distancia r es reemplazada por la distancia geodésica d_G , mientras que la carga es $\boldsymbol{q} = Q\hat{\boldsymbol{q}}(d_G)\boldsymbol{t}_0$ donde Q es el valor de

carga (100 mmHg), $\sigma = 0.25$ mm, emulando el diámetro de un microcatéter de 1.5 Fr (0.5 mm) y \hat{C} es calculado de forma que la integral de $\hat{\boldsymbol{q}}(d_G)$ sobre la superficie media, Ω_0 es igual a uno. La energía total se expresa en función de las variables nodales $\boldsymbol{\varphi}_a$, $a = 1, 2, \dots, N$, que se minimiza respecto a los grados de libertad dados por la deformación usando el método de Newton-Raphson, combinado con un método de búsqueda lineal dirigida por gradientes (Millán et al., 2013). Esto se repite hasta alcanzar el criterio de convergencia, luego se selecciona otro punto de carga y se repite todo el proceso.

Modelos geométricos

Este estudio se enfoca en efectos relacionados a la región cercana al cuello del aneurisma. Los modelos obtenidos de la base de datos incluyen una malla que describe el árbol arterial que contiene al aneurisma, la cual muestra una muy mala calidad de elementos en zonas de alta curvatura. A causa de esto resulta necesario someter a las mallas geométricas a un preproceso (Figura 2), a fin de realizar simulaciones numéricas eficientes. De los 46 casos de la arteria carótida interna se seleccionaron y procesaron 40 casos, obteniendo 34 mallas finales de cálculo (6 mallas presentaron algún tipo de problema durante el proceso). Para esto se desarrolló un marco computacional en C++ que permitió combinar las bibliotecas CGAL y VTK (Visualization Toolkit, (Schroeder et al., 2006)) para el procesamiento de mallas.

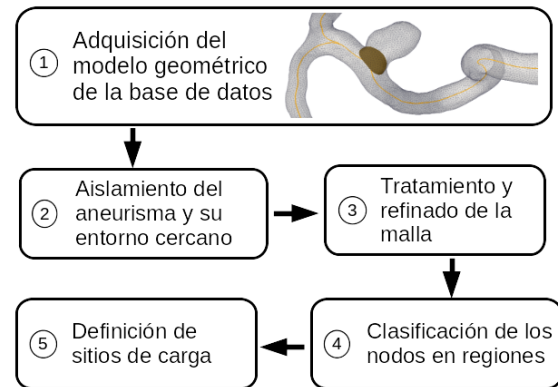


Figura 75. Pasos para el tratamiento de los modelos de aneurismas.

Aislamiento del aneurisma

Como primer paso se aisló cada aneurisma del árbol arterial cortando a una distancia determinada del cuello, descartando el resto de la arteria. Este procedimiento es llevado a cabo de manera semiautomática por una aplicación desarrollada en C++ que utiliza la biblioteca VTK, donde el usuario define la distancia de corte como un múltiplo del diámetro interno de la arteria a cada lado del cuello

del aneurisma (Figura 3). Las entradas del algoritmo son el modelo geométrico, el *ostium*, las líneas centrales, la distancia deseada (como un múltiplo del diámetro) y una variable que indica si el aneurisma es lateral o terminal, de acuerdo a la clasificación aportada por la base de datos. Luego, para cada aneurisma el algoritmo selecciona puntos de referencia sobre las líneas centrales, mide el diámetro interior de la arteria, y se mueve la distancia deseada sobre la línea central, realizando el corte al alcanzar la distancia deseada.

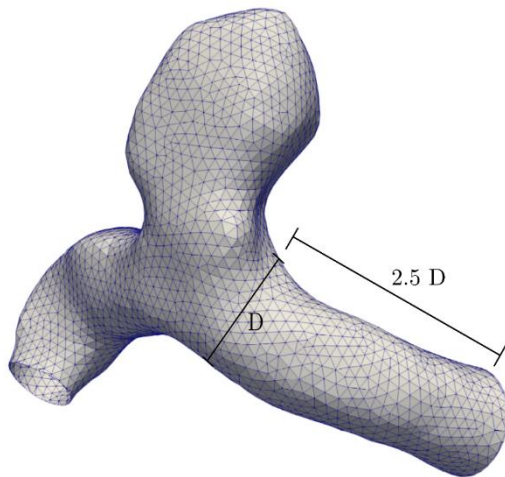


Figura 76. Ejemplo de modelo aislado (C0005) a una distancia de 2.5 veces el diámetro interno (D).

El corte es realizado por medio de un cilindro orientado de forma perpendicular a la línea central sobre el punto seleccionado (Figura 4). Luego del corte se descarta el árbol arterial, manteniendo sólo la componente conexa asociada al cuello. En este trabajo se consideró una distancia de corte de 2.5 veces el diámetro arterial, basado en un análisis no publicado del comportamiento del problema a diferentes distancias. Valores mayores (>3 veces el diámetro interno) presentaron una estabilidad mayor, pero causaban un efecto indeseado de flexión sobre el modelo y un movimiento excesivo del domo. El algoritmo de aislamiento realizó aproximadamente el 89% de los cortes de forma exitosa, permitiendo obtener el 70% de los modelos aislados de forma automática. El resto de modelos tuvo que ser aislado manualmente por un usuario entrenado, proceso que toma aproximadamente entre 10 y 20 minutos por caso, según la complejidad del modelo, en contraste con los 3-4 segundos del aislamiento automático.

Luego de esto se hizo un remallado del modelo (CGAL, 2021), manteniendo el tamaño original de 0.25 mm de los elementos. Debido al alto impacto del cuello en las etapas siguientes, se utilizó el algoritmo de remallado isotrópico de la biblioteca CGAL para refinar el cuello del aneurisma. Finalmente, se aplicó una iteración del esquema de subdivisión de

superficie de Loop (Figura 5), generando elementos de 0.0625 mm de longitud para la región refinada alrededor del cuello y 0.125 mm para el resto del modelo.

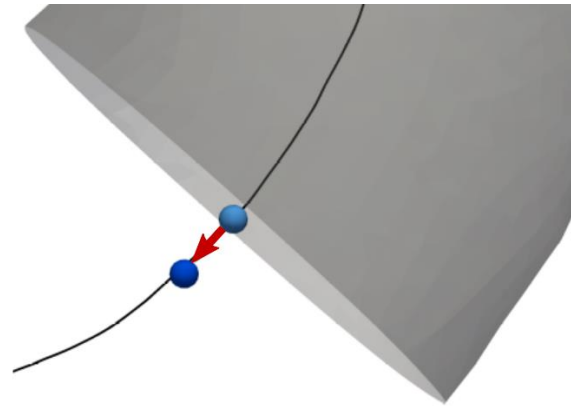


Figura 77. Ejemplo de puntos de corte sobre la línea central (en negro) seleccionados automáticamente por el algoritmo. Sobre ellos se crean los planos perpendiculares a la superficie para efectuar el aislamiento. La flecha roja indica la dirección seguida para fijar el segundo punto de corte.

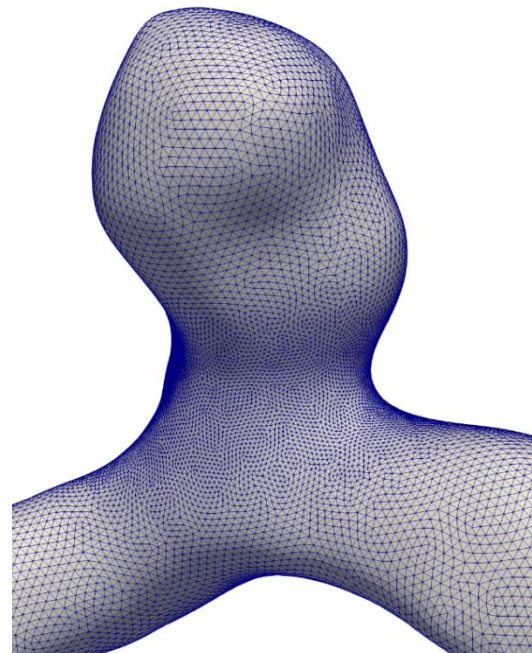


Figura 78. Detalle de la malla correspondiente al caso C0005 remallada y refinada en la zona del cuello.

Distancia geodésica

Se desarrolló un algoritmo que aproxima la distancia geodésica de cada nodo al ostium y le asigna una “etiqueta” para distinguir entre nodos del domo y

nodos de la arteria. En esta etapa se utilizaron algoritmos descritos en la sección “Triangulated Surface Mesh Shortest Paths” de la biblioteca CGAL (CGAL, 2021). Esta biblioteca calcula caminos geodésicos sobre una malla de triángulos, interpolando dentro de los elementos. Se calculó la distancia geodésica entre cada nodo y la curva del cuello (Figura 6) y se le asignó un signo dependiendo de la posición del nodo; positivo para nodos de la arteria y negativo para nodos del domo.

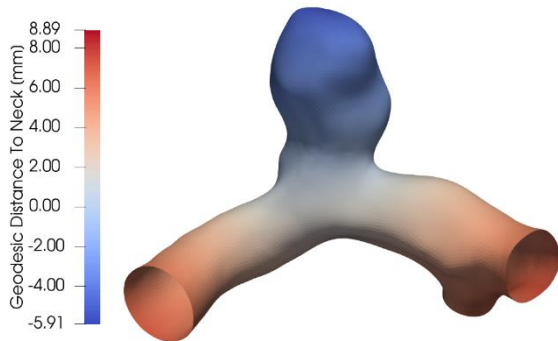


Figura 79. Modelo C0005. El mapa de colores corresponde a la distancia geodésica. Se observa que los valores negativos corresponden al domo y los positivos a la arteria.

El último paso consistió en la definición de un “chaleco” de carga en la región cercana al cuello. Esta zona fue definida a una distancia de 1 vez el diámetro interno de la arteria, con un algoritmo similar al de corte. En esta región se consideró una distribución de puntos de carga (Figura 7), donde sobre cada uno de ellos se simuló el efecto de un microcatéter presionando la arteria durante la oclusión endovascular. Estos puntos de carga se seleccionaron de tal manera que la distancia mínima entre ellos fuera de 0.5 mm, manteniendo la densidad tan regular como fuese posible. La carga aplicada corresponde a la función descrita en Carga localizada.

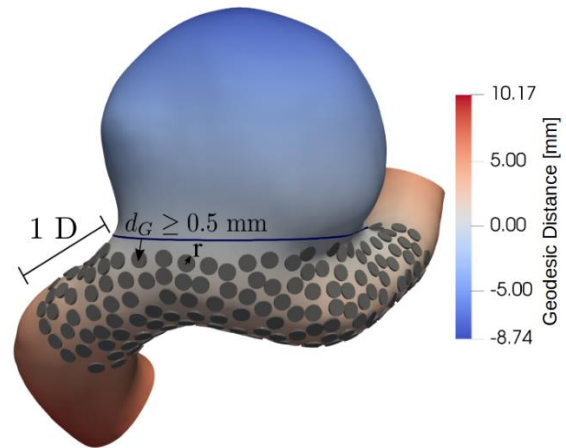


Figura 80. Detalle de los puntos de carga. Cada uno de ellos tiene un radio r de 0.25 mm (para visualización). Los puntos de carga están limitados a una región cercana al cuello (“chaleco”), definida con un algoritmo similar al de corte a una distancia de $1 D$ (D = diámetro interno).

3. Resultados y Discusión

Se llevaron a cabo experimentos con el objetivo a largo plazo de determinar qué zonas del aneurisma poseen una mayor sensibilidad a cargas localizadas, pudiendo estar relacionadas con un evento de ruptura, siendo de interés para este primer estudio caracterizar la deformación. Un caso particular de grandes deformaciones es la presencia de fenómenos de pandeo (buckling), deformaciones de gran magnitud asociadas a pequeños incrementos en la carga. En este estudio, se buscó establecer qué variables biomecánicas están relacionadas con grandes perturbaciones estructurales del aneurisma cuando se aplica una carga. Para cada punto de carga se llevó a cabo un experimento independiente, midiendo diferentes parámetros en puntos específicos dentro de los elementos de la malla deformada final (puntos de Gauss). Estos incluyen la magnitud del desplazamiento, diferencias entre la curvatura Gaussiana de las configuraciones de referencia y deformada, la energía total, la energía de membrana y de flexión, entre otros. La Figura 8 muestra las relaciones adimensionales de algunas variables biomecánicas para todos los puntos de carga de cuatro casos seleccionados de la Arteria Carótida Interna (C0090, C0034, C0014 y C0042), coloreados según la presencia (azul) o ausencia (naranja) de fenómenos de pandeo, determinados por inspección visual. Se observa que los puntos de carga se agrupan en dos regiones diferenciadas con muy poca superposición, lo que sugiere que este método de visualización es una herramienta eficiente para capturar áreas específicas cercanas al aneurisma relacionadas con algún tipo de inestabilidad en el domo del aneurisma, lo que podría estar relacionado con eventos de ruptura.

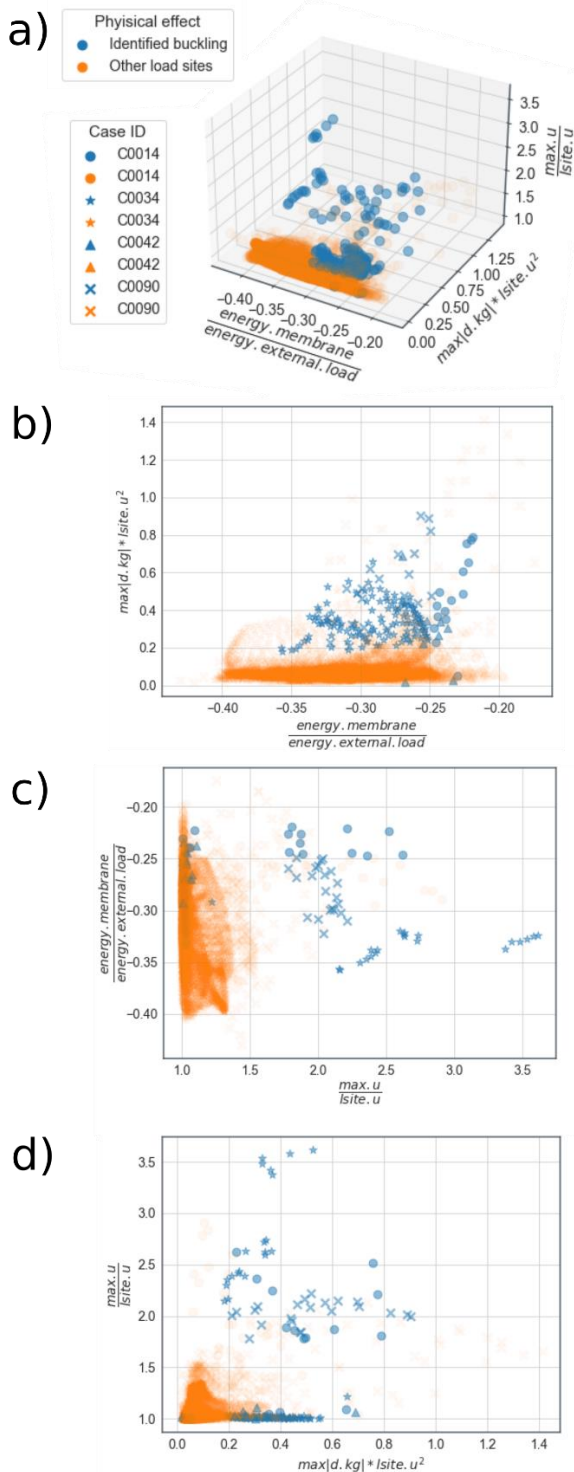


Figura 81. a) representación de atributos biomecánicos adimensionales para todos los puntos de carga de cuatro casos seleccionados de la ICA, coloreados a partir de la determinación visual de la presencia (azul) o ausencia (naranja) de pandeo. b-d) Proyecciones asociadas al gráfico 3D. $\max.u$ = máximo desplazamiento, $\text{lsite}.u$ = desplazamiento del punto de carga, $\max|d, \text{kg}|$ = diferencia máxima de curvatura entre las configuraciones de referencia y deformada.

4. Conclusiones

Este trabajo presenta resultados preliminares de simulaciones de biomecánica en aneurismas mediante un modelo de láminas delgadas considerando un espesor variable entre el domo y la arteria. Se desarrolló un proceso semi-automático implementado en C++ para aislar y remallar el domo del aneurisma y la vasculatura circundante, permitiendo el tratamiento de un gran número de casos y ahorrando tiempo y recursos. El algoritmo permite aislar cualquier tipo de aneurisma, ya que cada medida considerada en el proceso es relativa a las dimensiones de cada caso en particular. Además, se muestra que el análisis computacional de la biomecánica de aneurismas intracraneales puede ser útil para determinar áreas no triviales de interés para casos de estudio seleccionados. Como trabajo futuro se desea modificar el algoritmo de corte para mejorar su tasa de éxito, permitiendo no sólo expandir el presente estudio a toda la base de datos sino también aplicar dicha base de datos a otros problemas y situaciones. En cuanto a la biomecánica, se desea considerar un estado pretensionado de la estructura compatible con las condiciones fisiológicas del conjunto arteria-aneurisma en futuros análisis, a diferencia de la estructura libre de cargas considerada en el presente trabajo.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y por los subsidios del Proyecto de Investigación PICTO-2016-0054 UNCuyo-ANPCyT y L028-2019 SIIP-UNCuyo.

5. Referencias

Aneurisk-Team, (2012). AneuriskWeb project website, <http://ecm2.mathcs.emory.edu/aneuriskweb>. Web Site.

Cirak, F.; Long, Q. (2011). *Subdivision shells with exact boundary control and non-manifold geometry*. Int J Numer Meth Eng, vol. 88, n. 9, pp. 897–923.

Cloft, H. J., Kallmes, D. F. (2002). *Cerebral aneurysm perforations complicating therapy with Guglielmi detachable coils: a meta-analysis*. Am. J. Neuroradiol., 23(10), 1706-1709.

Costalat, V. M. y otros veintidós autores, (2011). *Biomechanical wall properties of human intracranial aneurysms resected following surgical clipping (irras project)*. J Biomech, vol. 44, n. 15, pp. 2685–2691.

Forget Jr, T. R. y otros seis autores, (2001). *A review of size and location of ruptured intracranial aneurysms*. Neurosurgery, vol. 49, n. 6, pp. 1322–1326.

- Frösen, J., (2014). *Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall—a review of current pathophysiological knowledge*. Transl Stroke Res, vol. 5, n. 3, pp. 347–356.
- Humphrey, J.; Canham, P., (2000). *Structure, mechanical properties, and mechanics of intracranial saccular aneurysms*. J Elasticity, vol. 61, n. 1, pp. 49–81.
- Kadasi, L. M.; Dent, W. C.; Malek, A. M., (2013). *Cerebral aneurysm wall thickness analysis using intraoperative microscopy: effect of size and gender on thin translucent regions*. J Neurointerv Surg, vol. 5, pp. 201–206.
- Kayembe, K. y otros dos autores, (1984). *Cerebral aneurysms and variations in the circle of willis*. Stroke, vol. 15, n. 5, pp. 846–850.
- Lee, J. Y., y otros cuatro autores, (2011). *Endovascular treatment of wide-neck intracranial aneurysms using a microcatheter protective technique: results and outcomes in 75 aneurysms*. Am J Neuroradiol, 32(5), 917-922.
- Lindgren, A. E. y otros seis autores, (2016). *Irregular shape of intracranial aneurysm indicates rupture risk irrespective of size in a population-based cohort*. Stroke, vol. 47, n. 5, pp. 1219–1226.
- Millán, D.; Rosolen, A.; Arroyo, M., (2013). *Nonlinear manifold learning for meshfree finite deformation thin-shell analysis*. Int J Numer Meth Eng, vol. 93, n. 7, pp. 685–713.
- Millan, R. D. y otros cuatro autores, (2007). *Morphological characterization of intracranial aneurysms using 3-d moment invariants*. IEEE T Med Imaging, vol. 26, n. 9, pp. 1270–1282.
- Orrù, E., y otros cuatro autores, (2013). *Complications of endovascular treatment of cerebral aneurysms*. Eur J Radiol, 82(10), 1653-1658.
- Pierot, L.; Wakhloo, A. K. (2013). *Endovascular treatment of intracranial aneurysms: current status*. Stroke, 44(7), 2046-2054.
- Radaelli AG, Bogunović H, Villa Uriol MC, Cebra JR, Frangi AF (2015). *Image-based haemodynamics simulation in intracranial aneurysms*. In Handbook of Biomedical Imaging, 199–217. Springer.
- Savastano, L. E. y otros tres autores, (2018). *Biology of cerebral aneurysm formation, growth, and rupture*. In Intracranial Aneurysms, pp. 17–32. Elsevier.
- Schroeder, W.; Martin, K.; Lorensen, B., (2006). *The Visualization Toolkit*. Kitware.
- Selimovic, A.; Ventikos Y.; Watton, P. N., (2014). *Modelling the evolution of cerebral aneurysms: biomechanics, mechanobiology and multiscale modelling*. Procedia IUTAM, vol. 10, pp. 396–409.
- Simo, J.; Fox, D., (1989). *On a stress resultant geometrically exact shell model. Part I: Formulation and optimal parametrization*. Comput Method Appl M, vol. 72, pp. 267–304.
- The CGAL Project, (2021). *CGAL User and Reference Manual*. CGAL Editorial Board, 5.2.2 edition.
- Tulamo, R. y otros tres autores, (2018). *Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review*. J Neurointerv Surg, vol. 10, n. Suppl 1, pp. i58–i67.
- Van Rooij, W.; Sluzewski, M. (2006). *Procedural morbidity and mortality of elective coil treatment of unruptured intracranial aneurysms*. Am J Neuroradiol, vol. 27, n. 8, pp. 1678–1680.
- Vlak, M. H. y otros tres autores, (2011). *Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis*. Lancet Neuro, vol. 10, n. 7, pp. 626–636.
- Wardlaw, J.; White, P., (2000). *The detection and management of unruptured intracranial aneurysms*. Brain, vol. 123, n. 2, pp. 205–221.
- Watton, P. N. y otros dos autores, (2009) Y. Ventikos, and G. A. Holzapfel. *Modelling the growth and stabilization of cerebral aneurysms*. Math Med Biol, vol. 26, n. 2, pp. 133–164.

Bacterias lácticas nativas de interés industrial aisladas a partir de arándanos frescos (*Vaccinium corymbosum*)

Native lactic acid bacteria of industrial interest isolated from fresh blueberries (*Vaccinium corymbosum*)

Silvia Graciela Ortiz¹, Juan Ignacio Tunez², Alicia Gallo¹, Silvia Raffellini¹

1. Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología, Ruta 5 y Avenida Constitución, Luján (6700), Argentina.
2. Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas, INEDES-UNLU-CONICET, Ruta 5 y Avenida Constitución, Luján (6700), Argentina.

E-mail: ortizs@mail.unlu.edu.ar

Resumen

Las bacterias lácticas pueden poseer propiedades funcionales de interés para elaboración de alimentos frutales innovadores. El objetivo de este trabajo fue aislar cepas nativas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial, a partir de arándanos frescos. Las cepas se aislaron en MRS agar, se sometieron a identificación preliminar y se determinó: actividad antagonista frente a microorganismos indicadores patógenos e indicadores; resistencia a pH 3; crecimiento ante diferentes temperaturas, sales biliares (1 %) y alta concentración de cloruro de sodio (6,5 %); producción de exopolisacáridos (EPS) y caracterización de metabolitos antimicrobianos extracelulares. Se aislaron 10 cepas caracterizadas preliminarmente como bacterias lácticas, de las cuales la cepa Ar2, identificada por métodos moleculares como perteneciente a la especie *Weissella confusa*, fue la que presentó mayor actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*. Además, resistió pH 3, creció en medio MRS adicionado con sales biliares (1%), produjo EPS y metabolitos extracelulares tipo bacteriocina con efecto anti-*Listeria monocytogenes*. Por consiguiente, la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 podría ser potencialmente aplicada en elaboración de alimentos frutales innovadores ya sea como cultivo bioprotector, probiótico o productor de espesantes naturales.

Palabras clave: Bacterias lácticas, frutas, bioprotección, probióticos, exopolisacáridos.

Abstract

Lactic acid bacteria may have functional properties that can be used for the production of innovative fruit foods. The objective of this work was to isolate native strains of lactic acid bacteria with properties of industrial interest from fresh blueberries. Native strains were isolated on MRS agar and subjected to preliminary identification. Antagonistic activity against pathogenic and indicator microorganisms was determined. Other tests carried out were: resistance to pH 3; growth at different temperatures, bile salts (1%) and high concentration of sodium chloride (6.5%); production of exopolysaccharides (EPS); and characterization of extracellular antimicrobial metabolites. Ten native strains preliminarily characterized as lactic acid bacteria were isolated. The Ar2 strain, identified by molecular methods as *Weissella confusa*, showed the highest inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. In addition, it resisted pH 3, grew in MRS medium added with bile salts (1%), produced EPS and extracellular bacteriocin-like metabolites with anti-*Listeria monocytogenes* effect. Consequently, the native lactic strain *Weissella confusa* Ar2 could potentially be applied in the production of innovative fruit foods either as a bioprotective microorganism, as a producer of natural thickeners or as a probiotic culture.

Keywords: Lactic acid bacteria, fruit, bioprotection, probiotics, exopolysaccharides.

1. Introducción

En la actualidad, se percibe por parte de los consumidores un marcado interés por la adopción de dietas saludables, poco procesadas, y con menos

aditivos químicos, por lo que la industria alimentaria necesita buscar alternativas que permitan ofrecer alimentos seguros, pero al mismo tiempo de alta calidad nutritiva y organoléptica. Las sociedades desarrolladas registran un incremento de la población

que, por diferentes causas como intolerancia a la lactosa, alergia a las proteínas de la leche, alto contenido de colesterol o de ácidos grasos saturados, han optado por consumir dietas vegetarianas o veganas (Vijaya Kumar et al., 2015). Las frutas y las hortalizas son esenciales para una dieta equilibrada debido a su contenido de agua, vitamina, minerales, carbohidratos (glucosa y fructosa), fibra, y compuestos bioactivos tales como polifenoles, carotenoides, tocoferoles entre otros, los cuales poseen efectos beneficios comprobados para la salud (Rodríguez et al., 2015; Ayed et al., 2020). Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras, para prevenir enfermedades crónicas y mitigar varias carencias de micronutrientes (OMS, 2018).

Las frutas pueden ser consumidas frescas, en jugos o néctares, en ensaladas o en variedad de frutas IV GAMA, lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y envasadas, sin embargo, la vida útil de estos alimentos es corta y son susceptibles al deterioro microbiano por su alto contenido de nutrientes y actividad de agua (Rodríguez et al., 2015; Valero, 2018). Asimismo, han estado también involucradas en brotes de enfermedades de transmitidas por alimento (ETA), producidos por distintos microorganismos como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, y diferentes serovariedades de *Salmonella enterica* o de *Escherichia coli* (Oliveira et al., 2018; Carstens et al., 2019; EFSA and ECDC, 2021).

Una alternativa para la conservación de estos alimentos es la biopreservación (Ananou et al., 2007), que consiste en la aplicación de microorganismos, como por ejemplo bacterias lácticas (BAL), y/o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes (O'Sullivan et al., 2002; Akbar et al., 2016). Las BAL pueden contribuir también al desarrollo de características organolépticas, reológicas y de textura en alimentos innovadores de matriz vegetal debido a la habilidad de algunas cepas de producir exopolisacáridos (EPS) in situ que actúan como bioespesantes naturales. La producción de EPS por BAL está recibiendo creciente atención en los últimos años debido a los posibles efectos benéficos para la salud, en particular la actividad anticancerígena, antitumoral e inmunomoduladora (Behare et al., 2009; Patel et al., 2014). Estos efectos se suman a los ya demostrados en algunas cepas de BAL como por ejemplo la contribución al mantenimiento del equilibrio de la población microbiana en el tracto gastrointestinal o el aumento de la respuesta inmune contra infecciones entre otros, por lo que se las considera bacterias probióticas (Vinderola y Reinheimer, 2003; Fontana et al., 2013).

En general la población de bacterias lácticas en frutas y hortalizas se encuentra en un rango de 10^2 y 10^4 UFC/g y, hasta la fecha, la diversidad de bacterias lácticas en frutas ha sido escasamente estudiada, siendo los géneros frecuentemente reportados *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus* (Di Cagno et al., 2010; Emerenini et al., 2013; Ruiz Rodríguez et al., 2019; Bouzaïene et al., 2019; Linares Morales et al., 2020).

Por otra parte, las frutas constituyen posibles sustratos para la inclusión de microorganismos probióticos, cuyos efectos benéficos se sumarían a las ventajas funcionales que ya de por sí presentan estos alimentos (fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos, buena digestibilidad). Además, esta inclusión podría ser una alternativa para aumentar el bajo consumo de vegetales frescos que se observa en países en desarrollo (Bernal Castro et al., 2017).

La combinación de cepas de bacterias lácticas productoras de EPS, de metabolitos antimicrobianos naturales con actividad biológica y con características probióticas, suponen una alternativa a los métodos tradicionales, para la conservación de los parámetros de calidad de alimentos de matriz vegetal, sumado los efectos benéficos que ejercen a la salud. Por consiguiente, el objetivo del siguiente trabajo fue aislar cepas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial a partir de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) frescos, que puedan ser empleadas en la elaboración de alimentos innovadores derivados de frutales.

2. Materiales y métodos

Procesamiento de las frutas, aislamiento de bacterias lácticas y conservación de las cepas lácticas

Para el aislamiento de bacterias lácticas a partir de arándanos frescos adquiridos en supermercados, se preparó un homogenato en bolsas plásticas estériles (Whirl-Pack Nasco, EEUU) para lo cual se pesó 20 g del material, se agregó 180 ml de agua peptonada (0,1 %), y posteriormente se homogeneizó en digestor tipo Stomacher (Lab Cima, Argentina) durante 30 segundos a velocidad media. A partir de los homogenatos se realizaron placas de aislamiento en agar MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) mediante siembra en superficie por agotamiento. Las placas se incubaron 48 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis, al cabo de las cuales se aislaron con pipeta Pasteur las colonias que presentaron morfología típica de bacterias lácticas. Las cepas de bacterias lácticas aisladas se conservaron a -20 °C en caldo MRS adicionado con 15 % de glicerol. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C.

Cepas empleadas como indicadoras de actividad antibacteriana

Las cepas bacterianas empleadas como indicadoras de la actividad antibacteriana en los diferentes ensayos fueron: *Bacillus cereus* MA 130, *Cronobacter sakazakii* MA13, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* O:157 MA 61, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2583, *Salmonella* Enteritidis MA 44 y *Staphylococcus aureus* MA 106, provistas por la colección de cultivos del laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional de Luján; *Listeria innocua* CIP 8011, provista por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA; y *Listeria monocytogenes* tipo 1 BE 16/96, *Listeria seeligeri* 19/02, *Listeria welshimeri* BE313/01, provistas por el INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”. Las cepas de bacterias se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caldo triptona soja (TSB, Biokar, Francia) adicionado con 15 % de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos las cepas se desarrollaron en TSB y agar triptona soja (TSA, Biokar, Francia) 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Identificación taxonómica preliminar de las cepas lácticas aisladas

Para la identificación taxonómica preliminar de las cepas aisladas se sometieron a las siguientes pruebas: tinción de Gram, catalasa, fermentación de azúcares, diferenciación entre homofermentativas y heterofermentativas.

Caracterización de las cepas lácticas aisladas

Desarrollo a 15, 30, 37 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS y se incubó a 15, 30, 37 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h, al cabo de las cuales se observó en forma cualitativa el desarrollo de turbidez. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Desarrollo en CINa al 6,5 %. A partir de cultivos ON, cada una de las cepas se inoculó en caldo MRS adicionado con 6,5 % de CINa y se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h al cabo de las cuales se realizó la lectura cualitativa de la turbidez producida. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Producción de exopolisacáridos (EPS). La producción de EPS se determinó sembrando cada cepa, con ansa calibrada (10 μl), en MRS agar suplementado con 5 % de sacarosa (Grosur-Tudor y Zamfir, 2011). Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 h al cabo de las cuales se observó el desarrollo de colonias mucosas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a sales biliares. La resistencia a la bilis se determinó mediante el método modificado

propuesto por Kociubinski et al. (1999). A partir de cultivos ON, las cepas de bacterias lácticas se sembraron con ansa calibrada (10 μl) en placas de agar MRS adicionado con 1 % de sales biliares (Britania, Argentina) y se incubaron 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para control, las cepas se sembraron también en medio MRS sin adición de sales biliares. Finalizada la incubación se comparó cualitativamente el desarrollo de las cepas en medios con y sin sales biliares adicionadas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resistencia a pH ácidos (pH 3). La resistencia a pH 3 de las cepas de bacterias lácticas, se evaluó mediante el método propuesto por Garriga et al. (1998) modificado. A partir de cultivos ON cada una de las cepas se sembraron en tubos de centrifuga con 10 ml de caldo MRS y se incubaron 24 horas; a continuación, se recuperaron las células por centrifugación (5000 rpm, 10 minutos, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), los pellets fueron lavados 2 veces en buffer fosfato salino pH 6,5 (PBS 6,5) y resuspendidos en 10 ml de PBS. De cada cepa se colocó 0,5 ml de suspensión en tubos con 4,5 ml de PBS con pH 3 (pH ajustado con HCl 1 M) y pH 6,5, utilizado como control, que se incubaron 3 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó el recuento de bacterias lácticas por siembra en profundidad en placas con MRS agar al inicio y al final de la exposición. Las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h; a partir del recuento de unidades formadoras de colonias (ufc), se calculó el Índice de Supervivencia (IS) de la población expuesta a pH 3 utilizando la fórmula 1:

$$\text{IS} = \text{Log ufc final} / \text{Log ufc inicial} \quad (1)$$

Donde IS es el índice de supervivencia después de la exposición a pH 3 durante 3 horas; Log ufc final es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población después de haber sido expuesta durante 3 horas a pH 3, y Log ufc inicial es el logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias de la población al inicio de la exposición.

Determinación de la actividad inhibitoria in vitro de las cepas lácticas aisladas sobre bacterias indicadoras

Para determinar la capacidad inhibitoria de las cepas de bacterias lácticas se utilizó la técnica de estrías cruzadas (González et al., 1995). Las cepas lácticas se sembraron en un arco de las placas de Petri sobre agar MRS y se incubaron 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Salmonella* Enteritidis MA 44, se sembraron en forma de estría perpendicular al cultivo desarrollado de la cepa láctica y las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las longitudes de las zonas de inhibición se midieron con

calibre (en mm) cada 24 h durante 120 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de la producción de metabolitos antimicrobianos extracelulares

Esta determinación se realizó con el extracto libre de células (ELC) del cultivo de la cepa láctica que presentó la mayor actividad inhibitoria sobre bacterias indicadoras en el ensayo de estrías cruzadas. Para la obtención del ELC, la cepa se cultivó 3 veces consecutivas en caldo MRS y se incubó ON a 37 °C. El cultivo obtenido se sembró al 3% en 100 ml de caldo MRS, se incubó a 37 °C durante 16-20 h, al cabo de las cuales el cultivo se centrifugó (6000 rpm 30 minutos a 5 °C en centrífuga Sorvall RC-5B, Alemania), y se concentró el sobrenadante 10 veces con un evaporador rotatorio Büchi RE130 (Suiza) en un baño a 40 °C. Posteriormente el extracto se ajustó a pH 5 con NaOH 3M y se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Para evaluar la actividad inhibitoria del ELC, se utilizó la técnica de difusión en agar (Benkerroum et al., 1993). Las cepas utilizadas como indicadoras de la actividad antibacteriana se cultivaron en TSB a su respectiva temperatura óptima de crecimiento. Se mezcló 0,5 ml del inóculo con 12 ml TSA que posteriormente se volcó en placas de Petri. Una vez que el agar solidificó, se realizaron pozos con sacabocado estéril (7 mm de diámetro) y en cada uno se colocó 50 µl del ELC a ensayar. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C, al cabo de las cuales se midieron los halos de inhibición producidos. Los ensayos se realizaron por triplicado y en todos los casos como testigo se utilizó caldo MRS concentrado acidificado con ácido láctico a pH 5, coincidente con el pH del ELC.

Para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, se evaluó la estabilidad de su actividad biológica frente a la acción de diferentes enzimas y ante la exposición a tratamientos térmicos de alta temperatura. Para esto, el ELC se expuso ante las siguientes enzimas: catalasa, pronasa E, proteasa, pepsina, tripsina. Cada enzima se preparó en una concentración de 1mg/ml, según recomendación del fabricante (Sigma, USA) y luego se esterilizó por filtración (membrana de 0,22 µm de diámetro de poro, Sartorius, Alemania). Posteriormente, se mezclaron 1 ml de las enzimas esterilizadas con 1 ml del ELC (concentración final de la enzima: 0,5 mg/ml), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h, al cabo de las cuales se evaluó la persistencia de la capacidad inhibitoria de los ELC por el método de difusión en agar descripto anteriormente, utilizando *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como bacteria indicadora. Los ensayos se realizaron por triplicado y como testigos se utilizaron la enzima sin el agregado del ELC (blanco de enzima), el ELC sin tratar enzimáticamente y MRS

concentrado (blanco del medio). Para evaluar la persistencia de la actividad antimicrobiana ante tratamientos de altas temperaturas, el ELC (1 ml) se incubó en un baño termostático Vicking Modelo Masson (Argentina) a 100 °C durante 30 minutos. Luego se ensayó la actividad inhibitoria remanente mediante el método de difusión en agar. Como cepa indicadora se empleó *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y como testigos se utilizaron MRS concentrado (blanco del medio), sometido a los mismos tratamientos que los utilizados para el ensayo, y ELC sin tratar. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Identificación molecular

A partir de un cultivo ON de la cepa láctica aislada de arándanos seleccionada por su alta capacidad inhibitoria, se realizó la extracción del ADN genómico por el método de fenol-cloroformo. Para la amplificación de secuencias específicas del ADN que codifican la fracción 16S rRNA se empleó la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando una mezcla que contenía ADN genómico bacteriano, primers (27F y 518R; 27F: 5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3' Y 518R: 5'-WTT ACC CGC GCT GCT GG-3'), enzima Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y buffer de reacción. El termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient AG 22331 Hamburg Made in Germany) se utilizó con las siguientes condiciones de ciclado: 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg y 72 °C por 5 min. El producto amplificado fue purificado por el método Exo-SAP (Werle et al., 1994) y enviado a un laboratorio externo (Macrogen Inc., Corea del Sur) donde fue secuenciado en ambas direcciones utilizando los mismos primers empleados en la amplificación.

Análisis estadísticos

Los análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher), empleados para establecer diferencias significativas entre los tratamientos, se realizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (StatPoint Inc., EEUU).

3. Resultados y Discusión

De un total de 13 cepas aisladas de arándanos, 10 cepas presentaron colonias con características morfológicas similares a las de las bacterias lácticas, por reacción de Gram positiva y catalasa negativa. Según la vía fermentativa de la glucosa, las 10 cepas se clasificaron como heterofermentativas. En la Tabla 1 se reseñan las características diferenciales de las cepas de bacterias lácticas aisladas de arándanos.

La temperatura óptima de crecimiento de las bacterias lácticas permite determinar si las bacterias son

mesófilas o termófilas y por lo tanto el uso industrial al que va a ser destinado. Todas las cepas aisladas desarrollaron en caldo MRS a 15, 30 y 37 °C, en cambio a 45 °C no mostraron desarrollo, por lo tanto, se las considera mesófilas.

La resistencia de las cepas de bacterias lácticas a altas concentraciones de NaCl sin perder su capacidad de crecimiento les confiere amplias posibilidades de ser utilizadas en cultivos iniciadores, bioprotectores o probióticos en una amplia variedad de alimentos (Castillo Arroyo et al., 2018). Todas las cepas aisladas de arándanos desarrollaron en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v), excepto Ar7 y Ar12.

Tabla 1. Características diferenciales de cepas lácticas nativas aislada a partir de arándanos frescos.

Cepas	Morfología microscópica	ClNa 6,5%	EPS	IS pH3
Ar1	Bastones cortos	±	±	0,75
Ar2	Diplococos y cadenas cortas	±	+	0,75
Ar3	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,54
Ar4	Diplococos	±	±	0,70
Ar5	Bastones cortos	±	+	0,43
Ar6	Diplococos y cadenas cortas	+	+	0,50
Ar7	Bastones cortos	-	+	0,52
Ar11	Bastones cortos	±	+	0,38
Ar12	Bastones cortos	-	+	0,41
Ar13	Bastones cortos	±	+	0,65

ClNa 6,5 %: crecimiento en caldo MRS adicionado con ClNa (6,5 % p/v); **EPS:** producción de exopolisacáridos; **IS pH3:** Índice de Supervivencia de cultivos expuestos a pH 3 durante 3 horas a 37 °C, calculado aplicando la fórmula 1.

Las BAL que producen EPS son microorganismos de importancia industrial en el desarrollo de productos alimenticios funcionales y se utilizan como cultivos iniciadores o coadyuvantes para desarrollar alimentos fermentados. En la industria de los alimentos estas bacterias mejoran las características reológicas y desempeñan un papel importante como agentes texturizantes y bioespesantes, debido a la naturaleza hidrocoloidal, gelificante, emulsificante y estabilizante de los EPS que producen. Además, diversos investigadores han señalado una variedad de beneficios para la salud que los EPS pueden proporcionar a los consumidores como, por ejemplo, efectos antiinflamatorios, antioxidantes, antitumorales, o anticolesterolémicos (Patel et al., 2012; Zannini et al., 2016; Fessard y Remize, 2017; Jin et al., 2019). Las 10 cepas aisladas de arándanos sembradas en MRS agar suplementado con sacarosa

mostraron producción de EPS, si bien difieren en algunas cepas la producción fue moderada (Tabla 1).

En la generación y diseño de un alimento con microorganismos probióticos adicionados, se debe considerar propiedades intrínsecas de la cepa a emplear, como por ejemplo su capacidad de sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal, ser tolerante al pH ácido y a la pepsina del estómago, a sales biliares, a pancreatina en la parte superior del intestino, poseer capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, entre otras (Havenaar y Huis in't Veld, 1992; Ren et al., 2014). Por este motivo en las cepas lácticas aisladas de arándanos se evaluó su capacidad de supervivencia a pH3 (Tabla 1) y el desarrollo en MRS agarizado adicionado sales biliares. Todas las cepas aisladas desarrollaron en MRS agarizado adicionado con sales biliares, y las cepas Ar 1 y Ar 2 se destacaron significativamente por su elevado Índice de Supervivencia a pH 3 (0,75).

Todas las cepas aisladas de arándanos mostraron capacidad inhibitoria contra las bacterias indicadoras ensayadas (Figura 1). La cepa más inhibitoria fue Ar2 y las especie más inhibidas fueron *Listeria monocytogenes* (24±0,16) y *Salmonella Enteritidis* (24±0,16), seguida por *Escherichia coli* (19,7±0,047).

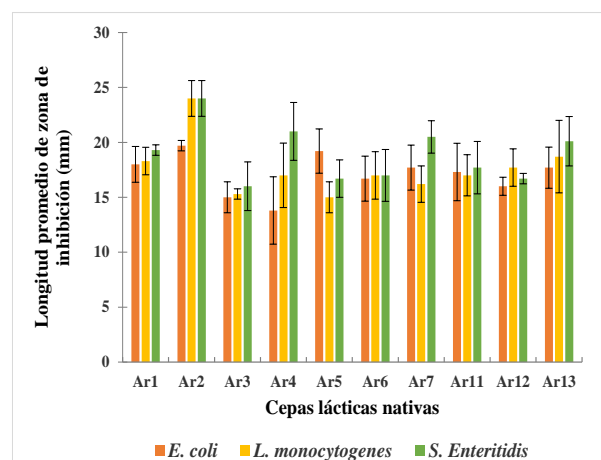


Figura 82. Inhibición producida por cepas aisladas de arándanos sobre *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Enteritidis*.

Debido a que la cepa Ar2 mostró mayor capacidad inhibitoria frente a las cepas indicadoras ensayadas y además, resistió pH 3, sales biliares 1 % y produjo exopolisacáridos (EPS), se seleccionó para los ensayos de determinación de metabolitos extracelulares antimicrobianos y para la identificación taxonómica molecular.

Los resultados obtenidos de la acción inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad inhibitoria del ELC de la cepa Ar2 contra bacterias indicadoras y patógenas

Cepas patógenas o indicadoras	Halos de inhibición (mm)
<i>Bacillus cereus</i> MA 130	11,5±0,8
<i>C. sakazakii</i> MA13	11,1±0,2
<i>E. coli</i> ATCC 35218	-
<i>E. coli</i> O:157 MA 61	-
<i>Listeria innocua</i> CIP 8011	10,5±0,5
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	11,7±0,4
<i>L. monocytogenes</i> tipo 1 BE 16/96	11±0,1
<i>Listeria seeligeri</i> 19/02	13,5±0,5
<i>L. welshimeri</i> BE313/01	10,9±0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 2583	12,7±0,5
<i>S. Enteritidis</i> MA 44	13,4±0,4
<i>S. aureus</i> MA 106	11,2±0,4

Dado que el ELC de la cepa Ar2 presentó marcada actividad inhibitoria frente a todas las cepas del género *Listeria* ensayadas, se decidió usar *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como cepa indicadora para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos contenidos en el ELC, debido a que esta especie ha estado involucrada en numerosos brotes de ETA vinculados con el consumo de frutas y hortalizas (CDC, 2012; 2015a; 2015b; 2016a; 2016b; EFSA and ECDC, 2019; EFSA and ECDC 2021).

La actividad inhibitoria de los metabolitos antimicrobianos presentes en el ELC, fue afectada por la acción de enzimas proteolíticas, pero permaneció estable frente a los tratamientos térmicos y la catalasa. Estos resultados sugieren, por consiguiente, que la inhibición observada no es debida a la producción de peróxido de hidrógeno, y que la cepa Ar2 produciría una sustancia proteica termorresistente del tipo bacteriocina con efecto inhibitorio frente a *Listeria monocytogenes*.

De acuerdo con el resultado de la identificación molecular de (amplificación por PCR de fragmentos de aproximadamente 500 pb de gen que codifica la fracción 16S rRNA y posterior secuenciación) la cepa nativa Ar2, seleccionada para su uso como bioconservante, probiótico o espesante, se identificó como perteneciente a la especie *Weissella confusa*, con 99 % de similitud.

Las propiedades observadas en la cepa nativa *Weissella confusa* Ar2 son comparables con los obtenidos por otros investigadores con otras cepas del mismo género o especie. La actividad antimicrobiana es una propiedad importante para que una cepa pueda ser utilizada como probiótica. *Weissella confusa* Ar2, inhibió el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativa: estos resultados son similares a los

reportados por Trias et al. (2008) que encontraron que dos cepas de *Weissella cibaria* aisladas de acelga y tomates, inhibieron microorganismos patógenos asociados con frutas y vegetales frescos, o por Serna et al. (2010) quienes reportaron actividad antimicrobiana de una cepa de *Weissella confusa* contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*.

Con respecto a la producción de EPS observada en *W. confusa* Ar2, se destaca que esta propiedad ha sido también observada con cepas de la misma especie aisladas por otros investigadores (Jin et al., 2019), y lo mismo ocurre con respecto a la capacidad de crecer con altas concentraciones de cloruro de sodio (Lee et al., 2012).

Por último, con respecto a la potencialidad de cepas de *W. confusa* para ser empleadas como probióticas, los resultados obtenidos en este trabajo son comparables, en lo referente a la supervivencia a pH 3,0 y resistencia a las sales biliares, a los presentados por Lee et al. (2012) y Wang et al. (2020), con cepas aisladas a partir de heces, o por Ayeni et al. (2011) y Sharma et al. (2018), con cepas aisladas a partir de alimentos fermentados.

4. Conclusiones

En este trabajo se aislaron diferentes cepas autóctonas de bacterias lácticas a partir de arándanos. Se identificó por método molecular a *Weissella confusa* Ar2, cepa productora de exopolisacáridos, con alta capacidad inhibitoria de diversos microorganismos patógenos, que resistió pH 3 y sales biliares y que puede crecer con elevada concentración de ClNa. Además, los ELC de *W. confusa* Ar2 tuvieron efecto inhibitorio contra *Listeria* spp. y las cepas específicas testeadas de *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Enteritidis y *Staphylococcus aureus*. La capacidad inhibitoria observada contra *Listeria monocytogenes* es debida aparentemente a sustancias de naturaleza proteica termorresistentes, tipo bacteriocina. Estos resultados justifican evaluaciones adicionales de *W. confusa* Ar2 para su potencial uso en la industria alimentaria, ya sea como bioprotectora, como probiótica o como productora de bioespesantes naturales.

5. Referencias

- Akbar, A.; Ali, I.; Anal, A. K. (2016). *Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety*, The Journal of Animal & Plant Sciences, 26 (4), 938-948.
- Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. (2007). *Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*.

- En Méndez-Vilas, A. (Ed.) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Vol. 1. Ed. Formatex, España.
- Ayed, L.; M'hir, S.; Hamdi, M. (2020). *Microbiological, biochemical, and functional aspect of fermented vegetable and fruit beverages*, *Journal of Chemistry* 2020, 1-12.
- Ayeni, F. A.; Sánchez, B.; Adeniyi, B. A.; Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A.; Ruas-Madiedo, P. (2011). *Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine*, *International Journal of Food Microbiology* 147, 97-104.
- Behare, P.V.; Singh, R.; Kumar, M.; Prajapati, J. B.; Singh, R. P. (2009). *Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review*, *Journal Food Science Technology* 46, 1-11.
- Benkerroum, N.; Ghouati, Y.; Sandine, W.E.; Tantaoui-Elar, A. (1993). *Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins*, *Letters in Applied Microbiology*, 17, 78-81.
- Bernal Castro, C.A.; Díaz Moreno, C.; Gutiérrez Cortés, C. (2017). *Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas*, *Revista Chilena de Nutrición* 44 (4), 383-392.
- Bouzaïene, T.; Lasram, S.; Ziadi, M.; Hadda-Imen, O.; Zohra, H.; Hamdi, M. (2019). *Isolation of lactic acid bacteria from grape fruit: antifungal activities, probiotic properties, and in vitro detoxification of ochratoxin A*, *Annals of Microbiology* 69, 17-27.
- Carstens, C.K.; Salazar, J.K.; Darkoh, C. (2019). *Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017*, *Frontiers in Microbiology* 10, 2667.
- Castillo Arroyo, P.L.; Betancur Hurtado, C.A.; Pardo Pérez, E. (2018). *Caracterización de microorganismos con potencial probiótico aislados de estiércol de terneros Brahman en Sucre, Colombia*, *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú* 29 (2), 438-448.
- CDC (2012). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado* (Final Update). Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC. (2015a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Commercially Produced, Prepackaged Caramel Apples Made from Bidart Bros. Apples* (Final Update). Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/caramel-apples-12-14/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2015b). *Wholesome Soy Products, Inc. Sprouts and Investigation of Human Listeriosis Cases* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bean-sprouts-11-14/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2016a). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Frozen Vegetables* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/frozen-vegetables-05-16/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- CDC (2016b). *Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility* (Final Update) Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>. Fecha de consulta: 6/10/2021.
- Di Cagno, R.; Cardinali, G.; Minervini, G.; Antonielli, L.; Rizzello, C. G.; and Ricciuti, P.; Gobbetti, M. (2010). *Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (Ananas comosus L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing*. *Food Microbiology* 27: 381-389.
- EFSA and ECDC. (2019). *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report*. Disponible en: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5926>. Fecha de consulta: 5/10/2021.
- EFSA and ECDC. (2021). *Multi-country outbreak of Salmonella Braenderup ST22, presumed to be linked to imported melons*, Disponible en: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ROA_S_Braenderup-ST22_UI-719_2021.pdf. Fecha de consulta: 27/10/2021.
- Emerenini, E., Afolabi, O.; Okolie, P.; Akintokun, A. (2013). *Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis*, *British Microbiology Research Journal* 3 (3), 368-377.
- Fessard, A.; Remize, F. (2017). *Why Are Weissella spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation?*, *Fermentation* 3 (3), 1- 31.
- Fontana, L.; Bermudez-Brito, M.; Plaza-Diaz, J.; Muñoz-Quezada, S.; Gil, A. (2013). *Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics*, *British Journal of Nutrition* 109, S35-S50.
- Garriga, M.; Pascual, M.; Monfort, JM.; Hugas, M. (1998). *Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts*, *Journal of Applied Microbiology* 84, 125-132.
- González, F.; Mans M., Raffellini S., Fantuzzi L. (1995). *Preliminary test on the inhibitory effect of Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum isolated from raw milk on Gram negative*

- psychrotrophic bacteria*, *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 13 (1), 55-59.
- Grosur-Tudor, S.S.; Zamfir M. (2011). *Isolation and characterization of lactic bacteria from romanian fermented vegetables*, *Romanian Biotechnological Letters* 16, 148-154.
- Havenaar R.; Huis in't Veld J. H. J. (1992). *Probiotics: A general view*. In: *The lactic acid bacteria in health & Disease*, BJB Wood (Ed.) Elsevier Applied Science, London.
- Jin, H.; Jeong, Y.; Yoo, S-H.; Johnston TV.; Ku, S., Ji, G.E. (2019). *Isolation and characterization of high exopolysaccharide-producing Weissella confuse VP30 from young children's feces*, *Microbial Cell Factories* 18 (110), 1-13.
- Kociubinski, G.; Pérez, P.; De Antoni, G. (1999). *Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacterial*, *Journal Food Protection* 62, 905-912.
- Lee, K.W.; Park, J.Y.; Jeong, H. R., Heo, H. J., Hand, N. S., Kim J.H. (2012). *Probiotic properties of Weissella strains isolated from human faeces*, *Anaerobe* 1 (1), 96-102.
- Linares-Morales, J.R.; Cuellar-Nevárez, G.E.; Rivera-Chavira, B.E.; Gutiérrez-Méndez, N.; Pérez-Vega, S.B. Nevárez-Moorillón, G.V. (2020). *Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities*, *Foods* 9 (10), 1399: 1-14.
- Oliveira Elias, S.; Tombini Decol, L.; Tondo, C.E. (2018). *Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014*, *Food Quality and Safety* 2, 173-181.
- OMS. (2018). *Alimentación sana*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>. Fecha de consulta: 15/10/2021.
- O'Sullivan, L.; Ross, R.; Hill, C. (2002). *Potencial of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality*, *Biochimie* 84, 593-604.
- Patel, A.; Prajapati, J.B.; Holst, O., Ljungh, A. (2014). *Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products*, *Food Bioscience* 5, 27-33.
- Patel, S.; Majumder, A.; Goyal, A. (2012). *Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria*, *Indian Journal Microbiology* 52, 3-12.
- Ren, D.; y otros trece autores (2014). *In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of Lactobacillus strains isolated from fermented food and human intestine*, *Anaerobe* 30: 1-10.
- Rodriguez, S. del C.; Gutierrez, D.R.; Sgroppo, Y.S.C. (2015). *Productos vegetales IV GAMA*, *Aspectos generales*, *Simiente* 85 (1-2), 1-12.
- Ruiz Rodríguez, L.G.; L.; Bleckwedel, J.; Medina, R.; De Vuyst, L.; Hebert, ME.; Mozzi, F. (2019). *Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina*, *Frontiers in Microbiology* 10, 1-26.
- Sharma, S.; Kandasamy, S.; Kavitha, D.; Shetty, P.H. (2018). *Probiotic characterization and antioxidant properties of Weissella confuse KR780676, isolated from an Indian fermented food*, *LWT* 97, 53-60.
- Serna Cock, L.; Valencia L.; Campos, R. (2010). *Cinética de fermentación y acción antimicrobiana de Weissella confuse contra Staphylococcus aureus y Streptococcus agalactiae*, *Revista de la Facultad de Ingeniería Universidad Antioquia* 55, 55-65.
- Trias, R.; Bañeras, L.; Badosa, E.; Montesino, E. (2008). *Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria*, *International Journal of Food Microbiology* 123, 50-60.
- Valero, D. (2018). *Frutas y hortalizas mínimamente procesadas o de IV Gama: cambios en los compuestos bioactivos*. *Horticultura*. Disponible en: <https://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/216797-Frutas-y-hortalizas-minimamente-procesadas-o-de-IV-Gama-cambios-en-compuestos-bioactivos.html>. Fecha de consulta: 15/10/2020.
- Vijaya Kumar, B.; Vijayendra, SVN.; Reddy, OVS. (2015). *Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review*, *Journal Food Science Technology* 52, 6112-6124.
- Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. (2003). *Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance*, *Food Research International* 36, 895-904.
- Wang, W.; Liu, W.; Chu, W. (2020). *Isolation and preliminary screening of potentially probiotic Weissella confuse strains from healthy human feces by culturomics*, *Microbial Pathogenesis* 147, 1-7.
- Werle, E.; Schneider, C.; Renner, M.; Völker, M.; Fiehn, W. (1994). *Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing*, *Nucleic Acids Research* 22 (20), 4354-4355.
- Zannini, E.; Waters, D.M.; Coffey, A.; Arent, E. (2016). *Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (3), 1121-1135.

Caracterización química de vinos Malbec y Cabernet franc provenientes de dos localidades de La Pampa (Argentina), en relación al grado de madurez de las uvas

Chemical characterization of Malbec and Cabernet franc wines from two locations in La Pampa (Argentina) in relation to grapes ripeness degree

Ayelén Varela^{1,2}, Luján Masseroni², Santiago Sari³, Jorge Prieto³, Paolo Sartor², Damián Zamora², Dardo Fontanella², Carolina Aumassanne², Martín Fanzone³.

1. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Godoy Cruz 2290, Buenos Aires, Argentina.
2. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), AER 25 de mayo. Gral. Pico 720, 25 de mayo, La Pampa, Argentina.
3. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - EEA Mendoza. San Martín 3853, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

E-mail: varela.ayelen@inta.gob.ar

Resumen

Este trabajo tiene como objetivos, caracterizar la composición química de uvas y vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc provenientes de 25 de Mayo y Casa de Piedra (La Pampa, Argentina) e interpretar la influencia del grado de madurez de las uvas sobre la composición química de los vinos de estas variedades tintas. Las uvas se cosecharon en dos momentos: Madurez 1 (M1: 35 días después del envero) y Madurez 2 (M2: 50 días después del envero), en 2020 y 2021. Se determinaron componentes del rendimiento (producción, peso de racimos y de baya), parámetros generales analíticos en los mostos de uvas (°Brix, pH y acidez titulable) y en los vinos (alcohol, pH, acidez titulable y volátil) y compuestos fenólicos globales (fenoles, antocianos, taninos y pigmentos poliméricos). Las uvas de la M2 tuvieron mayores valores de sólidos solubles y pH y menor acidez titulable. En los vinos, la M2 mostró mayor concentración de polifenoles globales, mayor pH y contenidos de etanol más elevados. Al comparar las zonas, los vinos producidos en 25 Mayo tuvieron significativamente mayores contenidos de polifenoles en general, demostrando un mayor potencial enológico que Casa de Piedra.

Palabras clave: La Pampa, grado de madurez, vinos, compuestos fenólicos.

Abstract

The present study aimed to both, characterize the chemical composition of Malbec and Cabernet franc grapes and wines from 25 de Mayo and Casa de Piedra (La Pampa, Argentina), and to evaluate the influence of the grapes ripeness degree on the chemical composition of these red wines. The grapes were harvested in two moments: Maturity 1 (M1: 35 days after veraison) and Maturity 2 (M2: 50 days after veraison), in 2020 and 2021. In grape, yield components (production, bunch and berry weight) and general analytical parameters (° Brix, pH and titratable acidity) were determined. In wines, general analytical parameters (alcohol, pH, titratable and volatile acidity) and global phenolic compounds (phenols, anthocyanins, tannins and polymeric pigments) were analyzed. The M2 grapes had higher soluble solids and pH values and lower titratable acidity. The M2 wines showed a higher concentration of global polyphenols as well as higher pH and ethanol content. Moreover, when the zones were compared, the 25 de Mayo wines showed significantly higher polyphenol content in general, demonstrating better oenological potential than Casa de Piedra.

Keywords: La Pampa, ripeness degree, wine, phenolic compounds.

1. Introducción

La Región Patagónica Argentina es una de las regiones vitivinícolas más australes (38° a 45° de latitud sur) y con menor altitud del mundo. La viticultura se asienta principalmente en los márgenes de los ríos Negro y Colorado, en las provincias de Neuquén, La Pampa y Río Negro, aunque también se cultiva vid en regiones de la provincia de Chubut. Debido al avance de la tecnología de riego, la frontera del cultivo de la vid en la región se ha extendido y puede propagarse a niveles incalculables, a partir de la utilización de los suelos de la meseta patagónica (Villareal et al., 2007).

Particularmente, en la provincia de La Pampa, según las últimas estadísticas del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 2021), la actividad vitícola ha crecido considerablemente luego del año 2000. Desde 2010, la superficie total ha aumentado un 32% (+ 68 ha). Además, presenta un 99,8% de su superficie con variedades aptas para elaboración de vinos y/o mostos.

La viticultura pampeana se desarrolla en la cuenca media del río Colorado, al sur de la provincia. El clima es árido al oeste y semiárido al este con temperaturas medias anuales de 15°C y una amplitud térmica anual muy marcada de 17°C. El régimen de lluvias disminuye de este a oeste, observándose precipitaciones medias anuales que varían desde los 320 a los 260 mm. Los suelos son pobres en materia orgánica y predominantemente arenosos con buen drenaje (Aumassanne, 2019). Estas características otorgan al cultivo un sitio vitícola óptimo para la producción de vinos de alta calidad.

Actualmente, la tendencia del mercado del vino tinto se encuentra orientada hacia la elaboración de productos con un alto contenido polifenólico y complejidad aromática, es por ello que resulta fundamental la comprensión de estos parámetros de calidad y de los múltiples factores que inciden sobre los mismos.

Los compuestos fenólicos representan unos de los principales metabolitos secundarios presentes en las uvas, y según su estructura química pueden ser divididos en dos grandes grupos: no-flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (antocianinas, flavanoles y flavonoles) (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Las antocianinas constituyen la familia de compuestos directamente responsables del color de las uvas y vinos tintos jóvenes, los flavanoles (monómeros, oligómeros y polímeros) contribuyen a la astringencia, amargor y estructura de los vinos (Gawel, 1998), por su parte, los flavonoles se relacionan con el amargor (Sáenz-Navajas et al.,

2010) y junto con los flavanoles participan del color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación (Monagas et al., 2005).

La biosíntesis y acumulación de los compuestos fenólicos durante las distintas fases del desarrollo de las bayas, depende tanto del genotipo de la planta como también de diversos factores bióticos (microorganismos estimulantes o antagonistas), abióticos (condiciones edafoclimáticas), y de las prácticas culturales realizadas en el viñedo (Düring y Davtyan, 2002; Downey et al., 2006; Villareal et al., 2007; Ubalde et al., 2007; Gutiérrez-Escobar, 2021).

Por otro lado, resulta esencial determinar el grado de madurez de las uvas (hollejo, semilla y pulpa) que permitirá definir el momento oportuno de cosecha, con el mejor potencial de calidad, para producir el vino de las características buscadas. Es decir, determinar cuál es el contenido de azúcar en las bayas que permita obtener, a su vez, la madurez fenólica, término que abarca no sólo la abundancia, diversidad y complejidad de los distintos compuestos presentes en las uvas, sino también su extractabilidad desde las distintas partes de la baya hacia el vino durante el proceso de vinificación (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

Si bien existen resultados acerca del impacto de los factores antes mencionados, sobre la composición química de uvas y vinos de diversas zonas vitícolas de Argentina, particularmente Mendoza (Fanzone, 2012), no se cuenta con información científica sobre la zona de estudio. Es por esto que se propone con este trabajo, generar información científica de base que permita, por un lado, caracterizar la composición química de uvas y vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc provenientes de distintas localidades de la cuenca media del río Colorado (La Pampa, Argentina); y por otro lado, interpretar la influencia del grado de madurez de las uvas sobre la composición química de los vinos de estas variedades tintas.

A partir de estos objetivos, se plantean las siguientes hipótesis de trabajo: la composición química de los vinos de las variedades Malbec y Cabernet franc de la cuenca media del río Colorado presentan un alto potencial de calidad, representado por un alto contenido de polifenoles. Así mismo, la cosecha temprana de uvas permite obtener vinos con mejores características químicas generales y cantidad de polifenoles comparables a los de cosecha tradicional, lo que favorece a la estabilidad de los mismos.

2. Materiales y métodos

Material Vegetal

El ensayo fue realizado durante las vendimias 2020 y 2021 con uvas Malbec y Cabernet franc provenientes de viñedos ubicados en dos localidades (25 de Mayo, Casa de Piedra) de la cuenca media del río Colorado (La Pampa, Argentina).

En el viñedo de la localidad de 25 de Mayo (67° 42' O y 37° 52' S), la variedad Malbec fue implantada en 2003 y Cabernet franc en el año 2008, ambas sobre pie franco con un sistema de conducción en espaldero con orientación Norte-Sur, poda corta en cordón bilateral pitoneado y riego por goteo. El marco de plantación, en ambas variedades, es de 2,5 m entre hileras y 1,5 m entre plantas.

En el viñedo de la localidad de Casa de Piedra (67° 08' O y 38° 09' S) ambas variedades fueron implantadas en 2011 sobre pie franco con igual conducción, poda y riego que en 25 de Mayo. El marco de plantación, en ambas variedades, es de 2,2 m entre hileras y 1 m entre plantas.

En ambos viñedos, la producción estimada fue de 9.000 kg/ha para Malbec y 10.500 kg/ha para Cabernet franc, mediante el ajuste de carga en la poda invernal y posteriormente con desbrote.

Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado, consistente en tres unidades experimentales de 10 plantas al azar para cada variedad, en cada zona, teniendo en cuenta el perímetro de tronco para determinar uniformidad de las plantas.

Las uvas se cosecharon en dos momentos: Madurez 1 (M1: 35 días después del envero) y Madurez 2 (M2: 50 días después del envero). En ambas temporadas se emplearon tres réplicas de cada momento.

Las vinificaciones se realizaron a escala piloto en recipientes plásticos de grado alimentario (30 L,) siguiendo un protocolo estándar de vinificación. En ambas temporadas se evaluaron los vinos al momento de embotellado (60 días post-descube).

Determinaciones analíticas

Se determinaron componentes del rendimiento como la producción por planta y el peso de racimos en cada vendimia y se realizó un muestreo de 100 bayas para determinar el peso de baya. Luego de la molienda, se determinaron parámetros generales analíticos (°Brix, pH y acidez titulable) en los mostos de cada unidad experimental.

En los vinos se procedió a la determinación de parámetros analíticos generales (alcohol, pH, acidez titulable y volátil), siguiendo la metodología de la

OIV (OIV, 2017); y compuestos fenólicos globales (fenoles, antocianos, taninos y pigmentos poliméricos), por espectrofotometría UV-Visible (Harbertson et al., 2003; Gordillo et al., 2015).

Análisis estadístico de los datos

Se verificó normalidad de los datos por el test de Shapiro-Wilk y homogeneidad de varianzas por el test de Levene's. Se realizó el análisis de la varianza de dos vías (ANOVA) y la comparación de medias por el test de Tukey, con un nivel de significancia de 0,05. Valores de $p < 0,05$ indicaron diferencias significativas. Todos los análisis se realizaron empleando los programas estadísticos Jamovi (2021) e Infostat (2020).

3. Resultados y Discusión

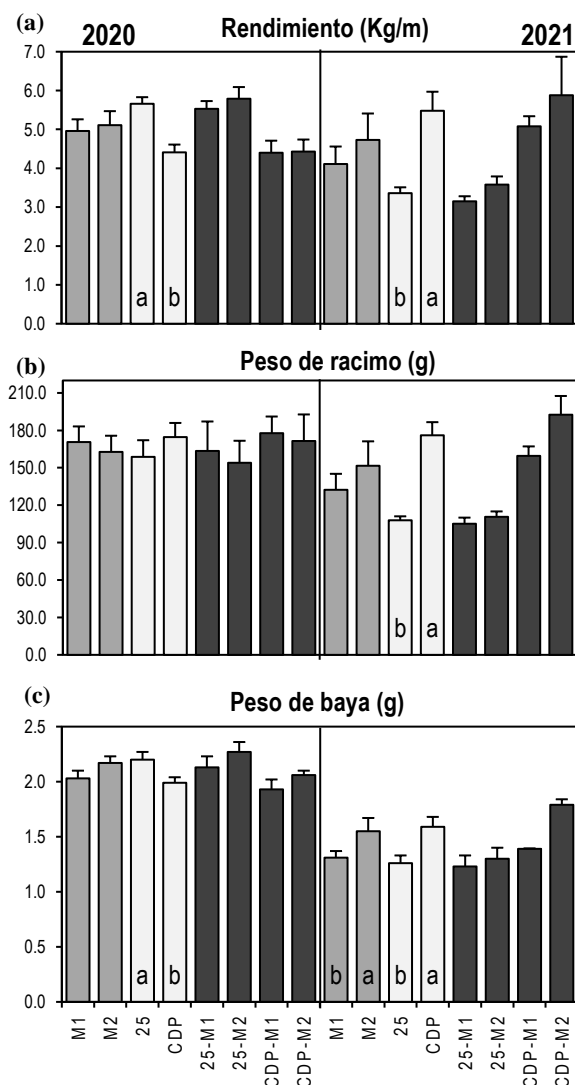


Figura 83. Componentes de rendimiento en plantas Malbec. (a) Rendimiento expresado en Kg de uva/metro lineal. (b) Peso de racimo en gramos. (c) Peso de baya en gramos.

Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Zonas de estudio: 25 (25 de mayo); CDP (Casa de Piedra). Grado de madurez: M1 (madurez 1) y M2 (madurez 2).

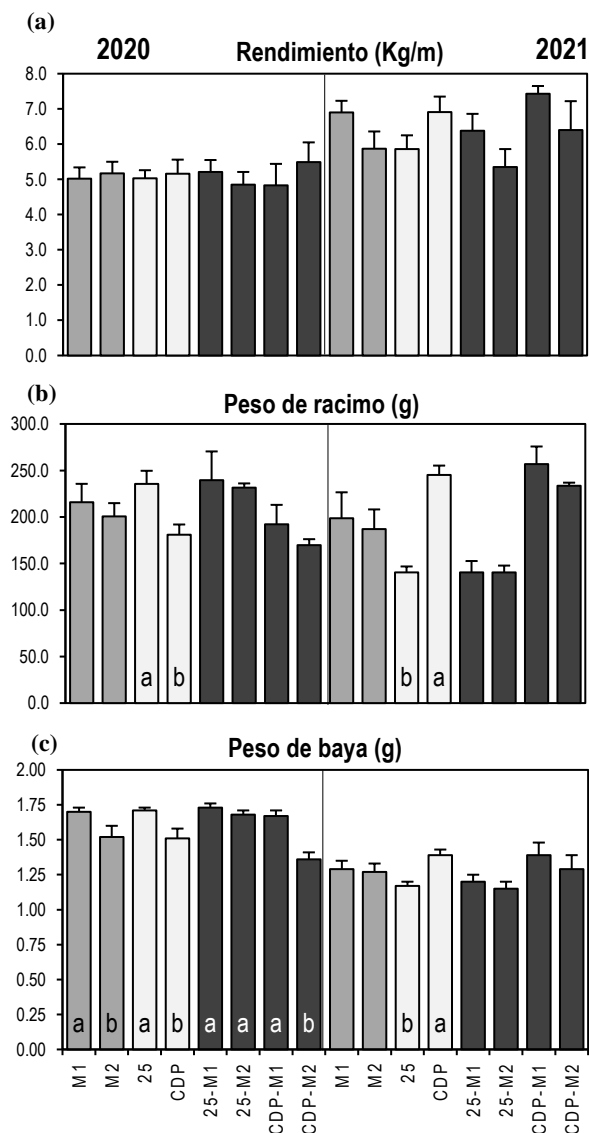


Figura 84. Componentes de rendimiento en plantas Cabernet franc. (a) Rendimiento expresado en Kg de uva/metro lineal. (b) Peso de racimo en gramos. (c) Peso de baya en gramos. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Zonas de estudio: 25 (25 de mayo); CDP (Casa de Piedra). Grado de madurez: M1 (madurez 1) y M2 (madurez 2).

Parámetros de rendimiento

Está claro que el rendimiento influye en la calidad de las uvas y sus vinos, pero se trata de un complejo proceso biológico. Existe una calidad máxima posible que corresponde a un rendimiento óptimo según el equilibrio vegetativo/reproductivo de las plantas y las características agroclimáticas del viñedo (Ojeda, 2007). El rendimiento de la vid se compone de varios componentes: el número de yemas por vid, brotes por yema, racimos por brote y bayas por racimo, además del peso de las bayas (Keller, 2015).

Las Figuras 1 y 2 muestran algunos de estos componentes tales como rendimiento expresado en kg/m, peso de racimos (g) y peso de bayas (g), para ambas variedades de uva (Figura 1, Malbec; Figura 2, Cabernet franc) en las dos temporadas de estudio.

Malbec

En el caso de Malbec (año 2020) tanto el rendimiento como el peso de las bayas fueron superiores en 25 de Mayo, aunque sin diferencias significativas en el peso de los racimos. Con respecto al grado de madurez, no influyó en ninguna de las variables mencionadas.

En 2021, en cambio, las plantas de Casa de Piedra presentaron mayores valores para el rendimiento, peso de racimos y de bayas. Entre ambos puntos de madurez, se observaron diferencias en el peso de bayas, siendo significativamente mayor para M2.

Si bien la carga de los viñedos se ajustó por igual en las dos localidades, las diferencias observadas en los rendimientos podrían deberse a distintos factores como las condiciones edafoclimáticas propias de cada una, la nutrición vegetal, el manejo de la canopia, entre otros (Smart *et al.*, 1990; Spayd *et al.*, 2002; Ubalde *et al.*, 2007; Keller, 2010)

Cabernet franc

Los componentes del rendimiento para esta variedad se muestran en la Figura 2. Para ambas temporadas y momentos de cosecha, no se observaron diferencias significativas en los rendimientos obtenidos (Figura 2.a).

Al analizar el peso de racimos (Figura 2.b) se presentaron diferencias significativas según la zona de estudio, en ambas temporadas (2020 y 2021), aunque no se observó impacto del grado de madurez. En este sentido, aunque las diferencias resultaron significativas en las dos temporadas analizadas, no tuvieron el mismo comportamiento, resultando en 2020 con un peso superior los racimos de las plantas ubicadas en 25 de Mayo; a diferencia del año 2021, donde resultaron con peso superior los racimos de Casa de Piedra.

Con respecto al peso de bayas (Figura 2.c), en el año 2020, no hubo diferencias en los dos momentos de cosecha en 25 de Mayo, pero si para las bayas de Casa de Piedra, siendo de menor peso en la M2. En la vendimia siguiente, se observaron diferencias significativas sólo para las zonas, obteniéndose en Casa de Piedra bayas de pesos superiores.

Parámetros analíticos generales de las uvas al momento de cosecha

En la Tabla 1 se muestran los parámetros analíticos generales de los mostos de uva Malbec y Cabernet franc luego de la molienda, para las dos temporadas.

- Malbec.

En la vendimia 2020, como era de esperarse, se observaron diferencias significativas en las características químicas de las uvas cosechadas en distintos momentos, presentando la M2 valores significativamente mayores que la M1 con respecto al contenido de azúcares y pH, y menores en la acidez total.

En la temporada 2021 no se observaron diferencias entre M1 y M2 para los contenidos de azúcares de las uvas de 25 de Mayo, a pesar de haberse cosechado en momentos distintos. Esto indica que en dicha temporada la maduración resultó más rápida en cuanto a la acumulación de azúcares, probablemente por las condiciones climáticas, y el tiempo transcurrido entre M1 y M2 no fue suficiente para lograr una diferencia significativa en los niveles de azúcar. Diversos autores han demostrado que el proceso de maduración es un fenómeno dinámico que varía, entre otros factores, según las condiciones climáticas de cada año y zona, independientemente de la estandarización en las prácticas culturales realizadas (Gallina, 2009; Andrades y González, 1995).

Para Casa de Piedra, M2 alcanzó mayor concentración de azúcares que M1. Al analizar el pH y la acidez total, se observó igual efecto del grado de madurez que en la temporada anterior.

Con respecto a las zonas, sólo se observó efecto de este factor para la temporada 2020, siendo mayor el contenido de azúcares y menor la acidez titulable en las uvas de Casa de Piedra, lo que podría indicar una maduración más avanzada en esta zona. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores de pH entre las zonas.

- Cabernet franc.

Durante el año 2020, no se observaron diferencias significativas entre las zonas en los valores de contenido de azúcares y pH, pero sí en la acidez titulable siendo mayor para las uvas de 25 de Mayo. En la temporada siguiente (2021), se observaron diferencias significativas en los tres parámetros mencionados, para las dos zonas de estudio. Específicamente, las uvas de 25 de Mayo mostraron niveles superiores de sólidos solubles, menor pH y menor acidez que las uvas de Casa de Piedra.

Además, se observó un efecto del momento de cosecha en los tres parámetros; en las dos temporadas. Las uvas de M2 presentaron mayor contenido de azúcares, mayor pH y menor acidez.

Tabla 12. Parámetros generales en bayas (mosto) al momento de cosecha

	2020			2021		
	Sólidos solubles (°Brix)	pH	Acidez Titulable (g ác. Tart./L)	Sólidos solubles (°Brix)	pH	Acidez Titulable (g ác. Tart./L)
MALBEC						
Madurez 1 (M1)	22,0 ± 0,28 ^β	3,34 ± 0,02 ^β	8,43 ± 0,45 ^α	24,6 ± 0,19 ^β	3,50 ± 0,02 ^β	5,62 ± 0,07 ^α
Madurez 2 (M2)	25,8 ± 0,36 ^α	3,67 ± 0,02 ^α	6,57 ± 0,26 ^β	25,4 ± 0,16 ^α	3,69 ± 0,03 ^α	4,81 ± 0,10 ^β
25 de Mayo (25)	23,3 ± 0,84 ^β	3,48 ± 0,08	8,15 ± 0,60 ^A	25,0 ± 0,06	3,56 ± 0,04	5,28 ± 0,15
Casa de Piedra (CDP)	24,5 ± 0,88 ^A	3,53 ± 0,07	6,84 ± 0,30 ^B	25,0 ± 0,36	3,63 ± 0,06	5,14 ± 0,24
25-M1	21,5 ± 0,27	3,31 ± 0,01	9,38 ± 0,31	24,9 ± 0,07 ^b	3,49 ± 0,02	5,60 ± 0,12
25-M2	25,1 ± 0,47	3,64 ± 0,04	6,93 ± 0,44	25,1 ± 0,07 ^{ab}	3,64 ± 0,02	4,97 ± 0,07
CDP-M1	22,5 ± 0,29	3,37 ± 0,03	7,48 ± 0,13	24,2 ± 0,20 ^c	3,51 ± 0,05	5,63 ± 0,12
CDP-M2	26,4 ± 0,12	3,69 ± 0,03	6,20 ± 0,11	25,7 ± 0,18 ^a	3,74 ± 0,01	4,64 ± 0,13
CABERNET FRANC						
Madurez 1 (M1)	22,1 ± 0,49 ^β	3,44 ± 0,02 ^β	6,08 ± 0,23 ^α	24,0 ± 0,31 ^β	3,40 ± 0,04 ^β	5,20 ± 0,07 ^α
Madurez 2 (M2)	25,9 ± 0,81 ^α	3,70 ± 0,02 ^α	5,09 ± 0,31 ^β	26,1 ± 0,44 ^α	3,75 ± 0,03 ^α	3,87 ± 0,08 ^β
25 de Mayo (25)	23,2 ± 0,86	3,57 ± 0,06	5,23 ± 0,36 ^B	25,8 ± 0,53 ^A	3,51 ± 0,08 ^B	4,41 ± 0,32 ^B
Casa de Piedra (CDP)	24,8 ± 1,15	3,57 ± 0,07	5,94 ± 0,27 ^A	24,3 ± 0,45 ^B	3,65 ± 0,07 ^A	4,67 ± 0,29 ^A
25-M1	21,8 ± 0,81	3,44 ± 0,02	5,98 ± 0,26	24,7 ± 0,07	3,32 ± 0,01	5,10 ± 0,12
25-M2	24,7 ± 0,98	3,70 ± 0,03	4,48 ± 0,10	27,0 ± 0,23	3,69 ± 0,01	3,71 ± 0,02
CDP-M1	22,5 ± 0,67	3,43 ± 0,03	6,18 ± 0,44	23,3 ± 0,18	3,48 ± 0,01	5,30 ± 0,06
CDP-M2	27,1 ± 0,88	3,71 ± 0,04	5,70 ± 0,32	25,2 ± 0,31	3,81 ± 0,02	4,03 ± 0,09

Media ± error estándar (n=3). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05).

Letras mayúscula (A,B) indican diferencias significativas entre bayas de distintas zonas.

Letras griegas (α,β) indican diferencias significativas entre bayas de distinto grado de madurez.

Letras minúsculas (a,b,c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (interacción).

Estos resultados confirman que las uvas de ambas variedades se encontraban en diferentes grados de madurez al momento de cosecha y que las bayas maduraron correctamente, evidenciado por la acumulación de azúcares y una disminución de la acidez, producto de la degradación del ácido málico y, en menor medida, del ácido tartárico. El aumento del pH, es consecuencia de la menor concentración de ácidos, tanto por degradación como por su salificación, al aumentar la concentración de los minerales, especialmente el potasio, con el avance de la maduración (Keller, 2015).

Analizando la maduración de las dos variedades en las dos temporadas, se observan diferencias en este proceso, a pesar de que las condiciones culturales fueron las mismas. Estas diferencias son propias de la influencia de los factores ambientales de cada año y de cada zona que aceleran o retrasan los cambios en la composición química de las bayas (Gallina, 2009; Andrades y González, 1995).

Características generales de los vinos

En la Tabla 2 se observan los valores de etanol (% v/v), pH y acidez titulable (g ácido tartárico/L) para los vinos elaborados con uvas Malbec y Cabernet franc de las dos zonas y en dos momentos cosechas distintos.

- Malbec.

En el 2020, como era de esperar, la graduación alcohólica de los vinos de ambas localidades aumentó con la madurez. En la madurez avanzada (M2) los vinos de Casa de Piedra alcanzaron el mayor valor, de acuerdo al contenido de azúcar del mosto al comienzo de la vinificación. En cuanto al pH y acidez titulable de estos vinos, la madurez aumentó el pH y disminuyó la acidez.

Con respecto a las dos zonas, no se observaron diferencias en los valores de pH pero sí en la acidez titulable, siendo los vinos de Casa de Piedra significativamente más ácidos. En cuanto a la acidez volátil, se observa que a mayor madurez de las uvas, los vinos poseen mayor acidez; los vinos de 25 de Mayo tuvieron mayor acidez volátil que los vinos de Casa de Piedra en M1 invirtiéndose en M2, aunque sin diferencias significativas para las dos zonas en cada momento de cosecha.

Tabla 13 – Parámetros analíticos generales en vinos Malbec y Cabernet franc de dos localidades de La Pampa, elaborados con bayas de dos grados de madurez.

	2020				2021			
	Etanol (% v/v)	pH	Acidez Titulable*1 (g/L)	Acidez Volátil*2 (g/L)	Etanol (% v/v)	pH	Acidez Titulable*1 (g/L)	Acidez Volátil*2 (g/L)
MALBEC								
M1	12,60 ± 0,17 ^β	3,82 ± 0,04 ^β	5,37 ± 0,07 ^α	0,34 ± 0,02 ^β	14,73 ± 0,21 ^β	3,76 ± 0,01	5,69 ± 0,02 _β	0,30 ± 0,01 ^α
M2	15,52 ± 0,31 ^α	4,13 ± 0,05 ^α	5,08 ± 0,05 ^β	0,49 ± 0,01 ^α	15,33 ± 0,03 ^α	3,78 ± 0,02	6,16 ± 0,12 _α	0,23 ± 0,01 ^β
25	13,59 ± 0,58 ^β	4,03 ± 0,08	5,12 ± 0,06 ^β	0,42 ± 0,02	15,25 ± 0,04 ^A	3,79 ± 0,01 ^A	6,04 ± 0,17 _A	0,27 ± 0,02
CDP	14,53 ± 0,75 ^A	3,92 ± 0,08	5,33 ± 0,09 ^A	0,41 ± 0,05	14,81 ± 0,24 ^B	3,74 ± 0,01 ^B	5,80 ± 0,06 _B	0,26 ± 0,01
25-M1	12,33 ± 0,27 ^c	3,89 ± 0,03	5,25 ± 0,04	0,38 ± 0,02 ^b	15,19 ± 0,01 ^a	3,77 ± 0,02 ^{ab}	5,68 ± 0,03 _b	0,32 ± 0,01 ^a
25-M2	14,84 ± 0,13 ^b	4,16 ± 0,10	4,99 ± 0,01	0,47 ± 0,003 ^a	15,31 ± 0,05 ^a	3,82 ± 0,01 ^a	6,41 ± 0,08 _a	0,22 ± 0,003 ^c
CDP-M1	12,87 ± 0,03 ^c	3,76 ± 0,05	5,50 ± 0,08	0,31 ± 0,01 ^b	14,28 ± 0,07 ^b	3,74 ± 0,01 ^b	5,69 ± 0,03 _b	0,27 ± 0,01 ^b
CDP-M2	16,20 ± 0,11 ^a	4,09 ± 0,04	5,17 ± 0,07	0,51 ± 0,02 ^a	15,35 ± 0,02 ^a	3,73 ± 0,01 ^b	5,91 ± 0,06 _b	0,25 ± 0,01 ^{bc}
CABERNET FRANC								
M1	12,93 ± 0,22 ^β	3,96 ± 0,03 ^β	4,88 ± 0,05	0,41 ± 0,01 ^β	14,25 ± 0,23 ^β	3,72 ± 0,05	5,86 ± 0,20 _β	0,34 ± 0,02 ^α
M2	15,11 ± 0,36 ^α	4,11 ± 0,02 ^α	4,79 ± 0,07	0,45 ± 0,01 ^α	15,99 ± 0,21 ^α	3,68 ± 0,08	6,79 ± 0,43 _α	0,25 ± 0,03 ^β
25	13,88 ± 0,33	4,08 ± 0,03 _A	4,81 ± 0,08	0,43 ± 0,003	15,54 ± 0,41 ^A	3,56 ± 0,04 ^β	7,01 ± 0,34 _A	0,34 ± 0,02 ^A
CDP	14,16 ± 0,73	3,98 ± 0,04 _B	4,87 ± 0,03	0,43 ± 0,02	14,70 ± 0,40 ^B	3,84 ± 0,03 ^α	5,65 ± 0,10 _B	0,25 ± 0,03 ^B
25-M1	13,33 ± 0,29 _{bc}	4,01 ± 0,03	4,96 ± 0,09 ^a	0,43 ± 0,01 ^{ab}	14,66 ± 0,23	3,63 ± 0,03 ^b	6,27 ± 0,13 _b	0,37 ± 0,02
25-M2	14,43 ± 0,42 ^b	4,15 ± 0,01	4,66 ± 0,06 ^b	0,43 ± 0,003 _{ab}	16,42 ± 0,18	3,49 ± 0,02 ^b	7,75 ± 0,09 _a	0,30 ± 0,02
CDP-M1	12,53 ± 0,02 ^c	3,90 ± 0,03	4,81 ± 0,02 ^{ab}	0,39 ± 0,02 ^b	13,84 ± 0,21	3,82 ± 0,05 ^a	5,46 ± 0,10 _c	0,30 ± 0,02
CDP-M2	15,80 ± 0,07 ^a	4,06 ± 0,03	4,92 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,01 ^a	15,56 ± 0,07	3,87 ± 0,01 ^a	5,84 ± 0,04 _c	0,20 ± 0,01

Media ± error estándar (n=3). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, p<0,05). Letras mayúscula (A,B) indican diferencias significativas entre vinos de distintas zonas. Letras griegas (α,β) indican diferencias significativas entre vinos elaborados con bayas en distinto grado de madurez. Letras minúsculas (a,b,c) indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (interacción).

En el 2021, los vinos de Casa de Piedra aumentaron su graduación alcohólica con la madurez de las uvas y en los vinos de 25 de Mayo no hubo diferencias significativas para los dos momentos. Esto coincide con los parámetros generales de las uvas. En los vinos de 25 de Mayo, no hubo diferencias en el pH con respecto al grado de madurez de las uvas, pero sí en los valores de acidez titulable, siendo mayor en M2, y en la acidez volátil, siendo menor en ese momento. En cambio, en los vinos de Casa de Piedra no se observaron diferencias en estos tres parámetros para los distintos grados de madurez.

- Cabernet franc.

En el 2020, la graduación alcohólica de los vinos de 25 de Mayo no se diferenció con relación al grado de madurez. Por el contrario, en Casa de

Piedra los vinos de M2 presentaron una graduación alcohólica significativamente mayor. En cuanto al pH, fue mayor en vinos de M2 y en los vinos de 25 Mayo. En cambio, la acidez titulable no se diferenció en los vinos de las dos zonas para el primer momento, siendo mayor en Casa de Piedra para el segundo momento. La acidez volátil mostró diferencias significativas sólo en los vinos de Casa de Piedra aumentando con la madurez de las uvas.

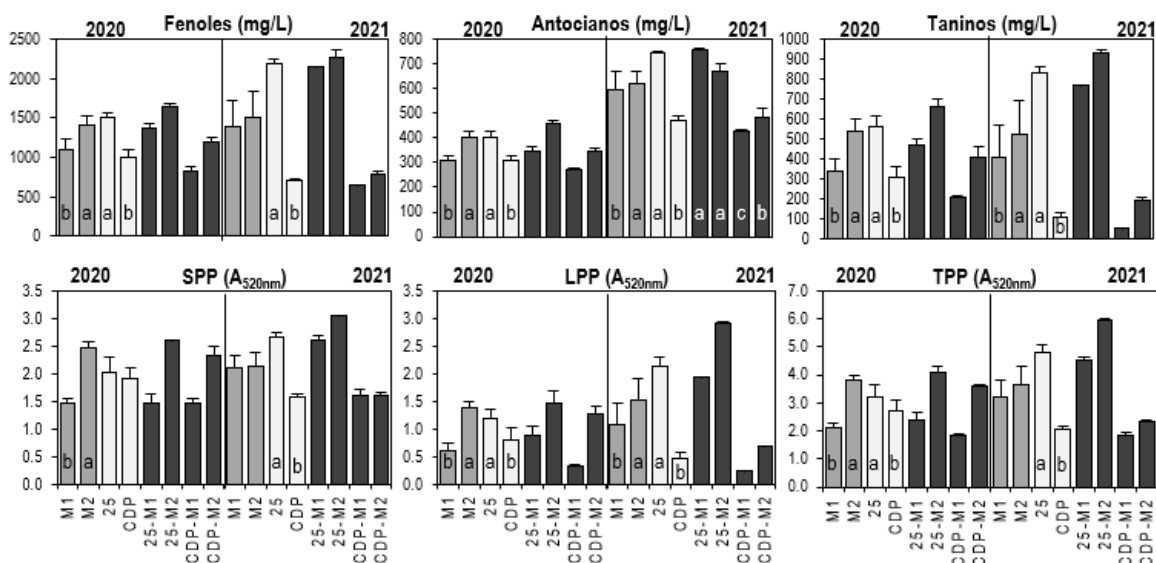


Figura 85. Parámetros fenólicos globales en vinos Malbec obtenidos en dos localidades de la provincia de La Pampa con bayas de dos grados de madurez. Letras distintas en el mismo conjunto de barras indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

En 2021, la graduación alcohólica de los vinos fue significativamente mayor en M2 y en los vinos de 25 de Mayo, de acuerdo a al contenido de azúcares de las uvas al momento de cosecha. La acidez volátil fue mayor en los vinos de M1 y en los de 25 de Mayo. Al analizar el pH, no se diferenciaron los valores con respecto al grado de madurez, pero sí en las zonas, mostrando los vinos de Casa de Piedra mayores niveles de este parámetro. En cambio, la acidez titulable fue significativamente mayor para M2 en los vinos de 25 de Mayo pero sin diferencias significativas en los vinos de Casa de Piedra para ambas cosechas.

Si bien generalmente el pH está inversamente relacionado con la concentración de ácidos, no existe una relación simple entre la acidez titulable y el pH (Keller, 2015). Se ha observado, para ambas variedades, que una mayor acidez no implica necesariamente un pH menor y esto puede deberse a que los ácidos orgánicos pueden tener un efecto buffer, amortiguando el pH.

Si bien existe diversos trabajos que muestran que la acidez titulable en vinos disminuye con la maduración de las uvas (Cassasa *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*, 2015), en otros trabajos (Fanzone *et al.*, 2020; Gallina, 2009) se ha encontrado mayores valores de acidez titulable en vinos con uvas más maduras. Esto se debe a que en la acidez titulable se cuantifica no sólo los ácidos presentes en la uva, sino también otros ácidos orgánicos que se producen como metabolitos secundarios de la fermentación alcohólica.

Composición fenólica de los vinos

- Malbec.

En la Figura 3 se observan los parámetros fenólicos globales para los vinos de ambos momentos de cosecha y zonas de estudio (años 2020 y 2021).

En los vinos del año 2020, se observó que las muestras de 25 de Mayo contienen mayores concentraciones de fenoles, antocianinas y taninos totales que los vinos de Casa de Piedra. Con respecto a la madurez de las bayas, uvas más maduras produjeron vinos con mayores contenidos de fenoles en general, esto concuerda con numerosos trabajos que han demostrado que la madurez influye significativamente en la composición fenólica de los vinos tintos (Gallina, 2009; Gil *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2015; Fanzone *et al.*, 2020; Gutiérrez-Escobar, 2021).

Los pigmentos poliméricos totales (TPP) se obtienen de la suma de los pigmentos poliméricos de cadena corta (SPP) y los de cadena larga (LPP). Estos compuestos contribuyen a la estabilidad de color durante la crianza de los vinos. El contenido de TPP mostró igual comportamiento que los fenoles para ambos factores (zona y madurez), al igual que la fracción de LPP. En cambio, los SPP solo se vieron influenciados por el grado de madurez de las uvas utilizadas, siendo mayores para la M2.

En los vinos del 2021, se observó igual comportamiento a los de la temporada anterior con respecto a las zonas, siendo los vinos de 25 de Mayo los de mayores contenidos fenólicos en general. Una madurez más avanzada en las uvas produjo diferencias significativas en los contenidos de taninos totales, como así también en los LPP, sin

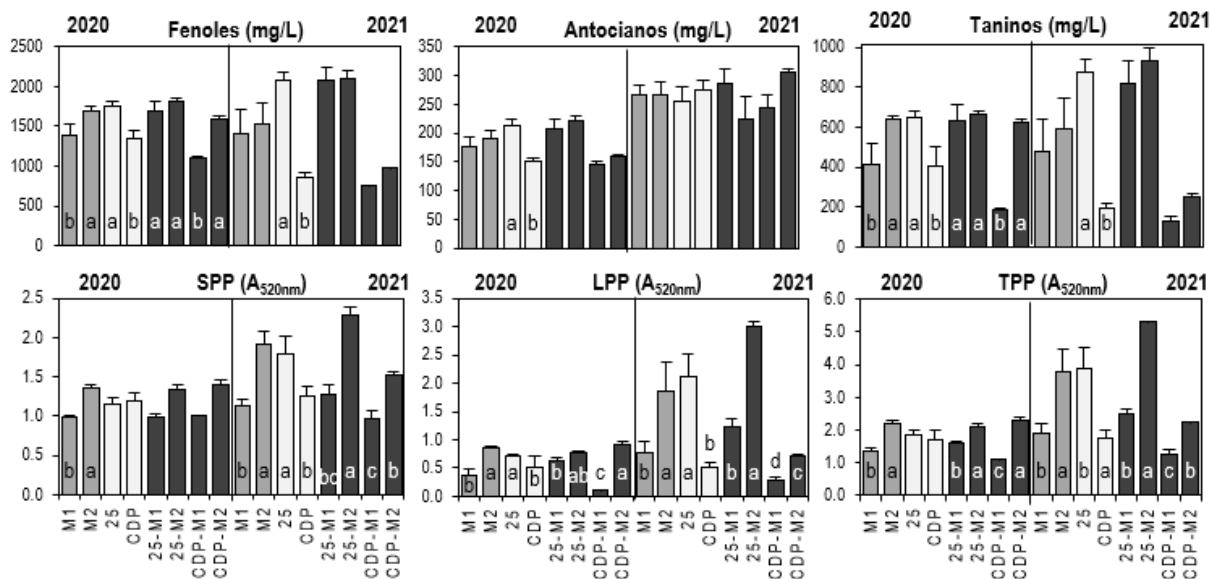


Figura 86. Parámetros fenólicos globales en vinos Cabernet franc obtenidos en dos localidades de la provincia de La Pampa con bayas de dos grados de madurez. Letras distintas en el mismo conjunto de barras indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

diferenciarse los contenidos de fenoles totales y de TPP y de SPP. En el caso del contenido de antocianos para esta misma temporada, se observó una significativa mayor cantidad en los vinos de 25 de Mayo, sin diferenciarse según el grado de madurez de las uvas. Para los vinos de Casa de Piedra, se observó un aumento en el valor de este parámetro con la madurez de las uvas.

- Cabernet franc.

En la Figura 4 se muestran los parámetros fenólicos globales para los vinos de la variedad Cabernet franc elaborados con uvas provenientes de las dos localidades en dos diferentes momentos de madurez, para la temporada 2020 y 2021.

En los vinos del año 2020, la concentración de fenoles y taninos totales se vio afectada por la madurez, en el caso de los provenientes de 25 de Mayo. En cambio, en los vinos de Casa de Piedra estos parámetros aumentaron significativamente con la madurez de las uvas. Con respecto al contenido de antocianos, se observó diferencias significativas entre los vinos de las dos zonas, siendo mayor para los de 25 Mayo.

En cuanto al contenido de TPP y LPP, aumentaron con la madurez de las uvas, teniendo los vinos de 25 de Mayo en la M1 mayores valores a los de Casa de Piedra, para luego igualarse en la M2. El contenido de los SPP sólo fue diferente en relación al grado de madurez de las uvas utilizadas, siendo mayor para la madurez más avanzada.

En los vinos del año 2021, la concentración de taninos y fenoles totales se diferenciaron según

la zona, obteniéndose valores significativamente superiores en los vinos de 25 de Mayo. Por el contrario, no hubo diferencias significativas para la concentración de antocianos.

Los pigmentos poliméricos en general (TPP, LPP y SPP) se diferenciaron significativamente, aumentando con la madurez para ambas zonas, siendo mayor en los vinos de 25 de Mayo para la M2.

Comparación de los vinos según los parámetros descriptos

En la Figura 5 se observan los Análisis de Componentes principales para cada variedad en las dos temporadas.

- Malbec.

Para los vinos del año 2020, se puede observar que el 92,8% de la variabilidad se puede explicar con estos componentes. Como indica la Figura 5a, los cuatro tratamientos se diferencian entre sí. Los vinos de M1 se encuentran en el cuadrante positivo del componente 1, caracterizado por la acidez titulable y los de M2 en el lado opuesto, con mayores valores de pH, pigmentos de cadena larga y alcohol, entre otros. Los vinos de 25 de Mayo, por su parte, se agrupan en la parte inferior, caracterizados por mayores contenidos de polifenoles en general.

Con respecto a los vinos del año 2021 (Figura 5b), se explica el 82,9% de la variabilidad con los primeros dos componentes. Los cuatro tratamientos están diferenciados entre sí, aunque, en este caso, se diferencian mayormente por la zona.

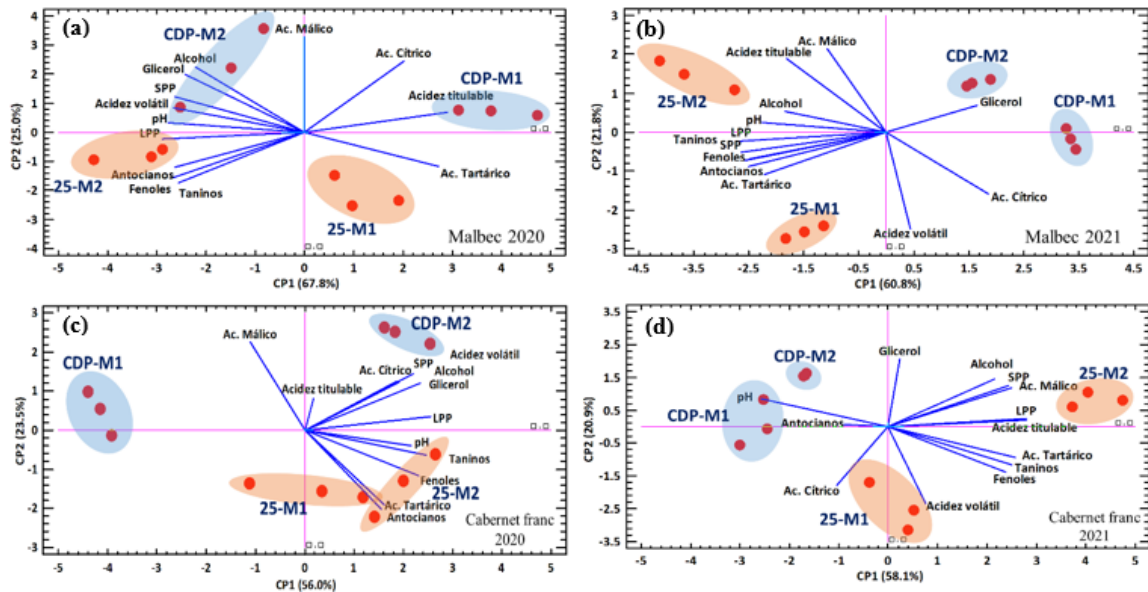


Figura 87. Análisis de Componentes Principales (ACP) en vinos Malbec y Cabernet franc elaborados con uvas de dos grados de madurez provenientes de dos localidad de La Pampa, Argentina.

Los vinos de Casa de Piedra poseen mayores contenidos de glicerol, menor alcohol y pH. Por el contrario, los vinos de 25 de Mayo se destacan por mayores concentraciones de polifenoles en general.

- Cabernet franc.

Con el Análisis de Componentes Principales para el año 2020 (Figura 5c) se puede explicar el 79,5% de la variabilidad de los vinos. Los vinos de las dos zonas se encuentran bien diferenciados, teniendo los de 25 de Mayo mayor concentración de taninos y fenoles, y mayor pH, sin presentar grandes diferencias con respecto al grado de madurez de las uvas. Sin embargo, cuando analizamos los vinos provenientes de Casa de Piedra, se observa una marcada diferencia, siendo los de M2 más alcohólicos y con mayor contenido de SPP.

En el año 2021 (Figura 5d), la variabilidad de los datos está explicada en un 79% por los primeros dos componentes del análisis. Nuevamente se observa una marcada diferenciación entre los vinos de distintas zonas, separándose del resto los vinos los elaborados con uvas provenientes de 25 de Mayo para la M2, los cuales se destacan por tener mayores contenidos de pigmentos poliméricos en general, mayor acidez pero también mayor contenido de etanol.

4. Conclusiones

Los vinos producidos en las localidades de estudio poseen buenas características generales y contenido de polifenoles comparables a otras zonas de vitivinícolas. Se destacan los vinos producidos en 25

Mayo por tener significativamente mayores contenidos de polifenoles en general, demostrando un mayor potencial enológico.

Con respecto al momento de cosecha, una madurez más avanzada aumenta el contenido de polifenoles en detrimento del pH, con contenidos de etanol más elevados. En este sentido, la madurez óptima no puede describirse simplemente por la acumulación máxima de componentes de la uva, sino que es una combinación compleja de las características físicas y químicas de las uvas, el estilo de vino requerido y las preferencias del mercado.

Teniendo en cuenta la importancia del pH en la estabilidad de los vinos y los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante analizar técnicas enológicas que permitan la reducción de este parámetro en los vinos de la región evaluada. Así mismo, se observa en ambas zonas una acumulación rápida de azúcares en las bayas que se encuentra desfasada con la madurez fenólica. Por lo tanto, resulta interesante analizar técnicas que permitan mejorar la extracción de los compuestos polifenólicos de los hollejos de las uvas, lo que permitiría realizar cosechas tempranas para producir vinos con menor graduación alcohólica, sin detrimentos de la complejidad aromática y del color, de acuerdo a la normativa vigente y a la tendencia del mercado.

5. Referencias

Andrades Rodríguez, M. S.; González San José, M. L. (1995) *Influencia climática en la maduración de la uva: Estudio de cultivares de La Rioja y Madrid*. Zubía, 7, pp 79-102. ISSN 0213-4306

- Aumassanne, C. (2019) *Impacto de los cambios en el uso y la cobertura de la tierra y de la variación del clima, sobre los componentes principales del balance de agua en la cuenca del río Colorado, Argentina*. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires, Argentina. 176 p.
- Cassasa, L. F. y otros 6 autores (2013) *Influence of Fruit Maturity, Maceration Length, and Ethanol Amount on Chemical and Sensory Properties of Merlot Wines*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 64 (4), pp 437-449. DOI: 10.5344/ajev.2013.13059
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2020) Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
DOI: 10.35537/10915/82130
- Downey, M.O.; Dokoozlian, N.K.; Krstic, M.P. (2006). *Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (3), pp 257-268.
- Düring, H.; Davtyan, A. (2002). *Developmental changes of primary processes of photosynthesis in sun- and shade-adapted berries of two grapevine cultivars*. *Vitis*, 41 (2), pp 63-67. DOI: 10.5073/vitis.2002.41.63-67
- Fanzone, M. L. (2012) *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (vitis vinifera L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial*. Tesis de doctorado. Universitat Roviri i Virgili, Tarragona, España. 368 p. <http://hdl.handle.net/10803/81715>
- Fanzone, M. y otros 9 autores (2020). *Combination of pre-fermentative and fermentative strategies to produce Malbec wines of lower alcohol and pH, with high chemical and sensory quality*. *OENO One*, 54, 4, pp 1041-1058. DOI: 10.20870/oeno-one.2020.54.4.4018
- Gallina, M. (2009) *Influencia del estado de madurez y la exposición de los racimos de la cv. Pinot noir (Vitis vinifera L.) en la composición de la uva y el vino, en el Alto Valle de río Negro y Neuquén*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina. 97 p.
- Gawel, R. (1998) *Red Wine Astringency: a review*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), pp 74-95. DOI: 10.1111/j.1755-0238.1998.tb00137.x
- Gil, M. y otros 6 autores (2012). *Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines*. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, pp 7988–8001. DOI: 10.1021/jf302064n
- Gordillo, B. y otros 7 autores (2015). *Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin–flavonol–flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions*. *J. Agric. Food Chem.*, 63, pp 7645-7653. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b00181
- Gutiérrez-Escobar, R.; Aliaño-González, M.J.; Cantos-Villar, E. (2021) *Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review*. *Molecules*, 26, pp 718-779. DOI: 10.3390/molecules26030718
- Harbertson, J. F., Picciotto, E. A., y Adams, D. O. (2003). *Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 54(4), pp 301-306. ISSN 0002-9254
<https://www.ajevonline.org/node/5320.full>
- INV (2021). *Informe Anual de superficie 2020*. Subgerencia de Estadística y Asuntos Técnicos Internacionales. Mendoza, Argentina. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/estadisticas>
ISBN-13:978-987-521-229-9
- Keller, M. (2010) *Managing grapevines to optimise fruit development in a challenging environment: a climate change primer for viticulturists*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, pp 56–69
DOI: 10.1111/j.1755-0238.2009.00077.x
- Keller, M. (2015). *The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology*. 2^{da} ed. Elsevier Inc, San Diego, Estados Unidos. 508 p. ISBN: 978-0-12-419987-3
- Monagas, M; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. (2005) *Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45 (2), pp 85-118. DOI: 10.1080/10408690490911710
- OIV (2017) *Compendium of international methods of wine and must analysis* (vols. 1-2). París, Francia: Organización Internacional de la Viña y el Vino.
- Ojeda, H. (2007) *¿Cómo se relaciona la calidad de la uva y del vino con el rendimiento del viñedo?* *Revista Enología*, 5, Año IV.
- Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de enología*. Vol 2. Química del vino, estabilización y tratamientos. 1^o ed, Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. pp. 177–258. ISBN 950-504-573-5
- Sáenz-Navajas, M.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. (2010) *An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine*. *Food Chemistry* 121: pp 1139–1149. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.01.061

Sánchez, N.; Aleixandre-Tudó, J. L.; Aleixandre, J. L. (2015) *Evolución fenólica y calidad sensorial de los vinos tintos de bobal elaborados utilizando diferentes tecnologías*. *Enoviticultura*, 37, pp 17-29. <http://hdl.handle.net/10251/92944>

Smart, R. E.; Dick, J. K.; Gravett, I. M. (1990) *Canopy Management to Improve Grape Yield and Wine Quality – Principles and Practices*. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 11 (1). DOI: 10.21548/11-1-2232

Spayd, S.E.; Tarara, J.M.; Mee, D.L.; Ferguson, J.C. (2002) *Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of Vitis vinifera cv. Merlot Berries*. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:3, pp 171-182

The Jamovi Project (2021). *Jamovi*. (Version 2.0) [Software Informático]. Sídney, Australia. <https://www.jamovi.org>

Ubalde, J. M.; Sort, X.; Poch, R. M.; Porta, M. (2007) *Influence of edapho-climatic factors on grape quality in Conca de Barberà vineyards (Catalonia, Spain)*. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 41 (1), pp 33-41. DOI: 10.20870/oenone.2007.41.1.859

Villareal, P.; Romagnoli, S.; Llorente, A. (2007). *Pautas tecnológicas: vid para vinificar. Manejo y Análisis económico-financiero*. 1ª ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Buenos Aires, Argentina. 104 p.