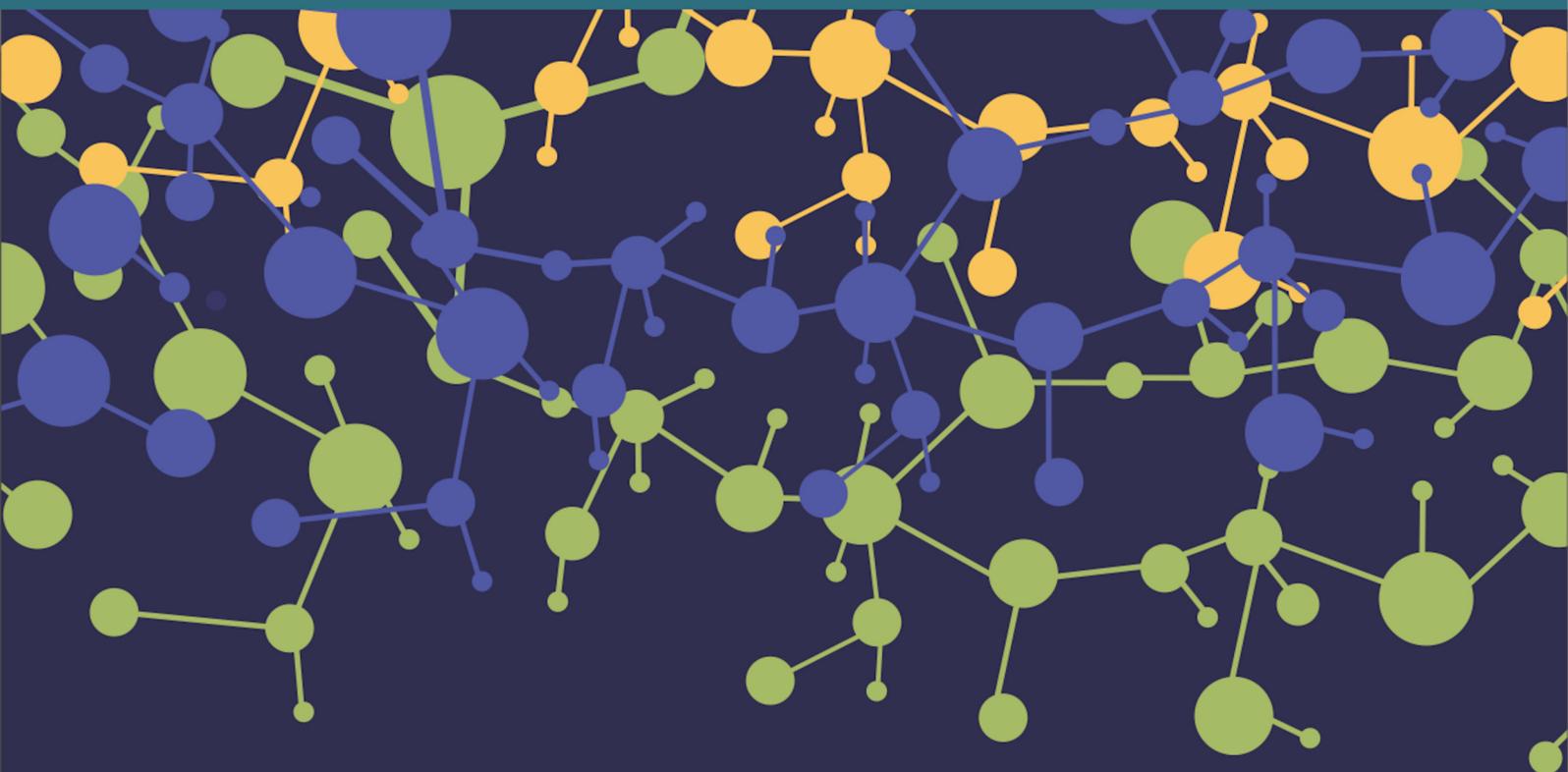
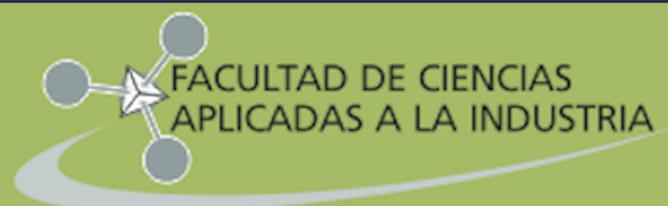


# RevICAp

## Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas



**UNCUYO**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE CUYO



## INDICE

Selección e identificación de levaduras para el control biológico de <i>Alternaria</i> en uva Malbec .....	3
Factibilidad de recuperación de principios bioactivos a partir de residuos de la industrialización de tomate .....	12
Producción Limpia: Agresividad de Efluentes Agroindustriales Utilizados para el Riego. ....	17
Enseñanza del electromagnetismo: los transformadores eléctricos .....	24
Evaluación de las propiedades funcionales y la capacidad antioxidante de harina de remolacha ( <i>Beta vulgaris</i> ) .....	29
Levaduras vínicas autóctonas: potencial fuente de prebióticos para formular alimentos funcionales. ....	35
Evaluación de configuraciones inversas en hornos de deshidratado de ciruela. ....	43
Producción de enzimas pectinolíticas por fermentación: Eficacia del método de producción y downstream .....	50
Modificación Estructural de Bentonitas por Intercalación de Polihidroxidaciones de aluminio .....	56
Evaluación de la bioactividad in vitro de recubrimientos compuestos de chitosan/Bioglass®/TiO <sub>2</sub> .....	60
Electrodeposición de aleación de Wolframio-Cobalto: optimización de dureza a través del diseño experimental .....	66

# Selección e identificación de levaduras para el control biológico de *Alternaria* en uva Malbec

## Selection and identification of yeasts for the biological control of *Alternaria* in Malbec wine grapes

Luciana Paola Prendes<sup>1,2</sup>, María Gabriela Merín<sup>1,2</sup>, Mario Alberto Andreoni<sup>3</sup>, Vilma Inés Morata<sup>1,2</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. CONICET. 3. INTA-Rama Caída.  
lpprendes@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

La presencia del género fúngico *Alternaria* con capacidad de producir micotoxinas en uva para vinificar podría significar un gran riesgo para la salud de los consumidores de vino. En pos de seleccionar un posible agente de control biológico del mismo en uva para vinificar, se evaluaron levaduras aisladas del mismo ecosistema. El 22,1% del total de levaduras y organismos tipo levadura aislados de uvas Malbec evaluados presentaron actividad antagonista de *Alternaria alternata* en ensayos en uva y la mayoría de ellas (14/15) mostraron una gran capacidad antagonista logrando un efecto preventivo. Todas las cepas de levadura con mayores requerimientos nutricionales, como *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina* y la mayoría de *Hanseniaspora uvarum* probadas mostraron capacidad antagonista frente a *A. alternata*, no así las cepas de menores requerimientos, como el organismo tipo levadura *Aureobasidium pullulans*, o las levaduras *Cryptococcus laurentii* II y *Rhodotorula* spp., sugiriendo una correlación positiva entre estos factores. La identificación de las levaduras antagonistas mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada por el método de PCR-RFLP. Estos hallazgos resultan prometedores para el control biológico de *Alternaria* en uva para vinificar.

Palabras clave: *Alternaria*, control biológico, levaduras antagonistas, Malbec.

### Abstract

The presence of *Alternaria* fungal genus, which is able to produce mycotoxin in wine grapes, could mean a health risk for wine consumers. With the aim to select a possible biological control agent in wine grapes, yeasts from the same ecosystem were evaluated. The 22.1% from total yeasts and yeast-like organisms evaluated showed antagonistic activity against *Alternaria alternata* in wine grape assays and most of them (14/15) showed a great antagonistic ability achieving a preventive effect. All *Metschnikowia* spp., *Candida zemplinina* and almost all *Hanseniaspora uvarum* evaluated strains, with higher nutritional requirements, showed antagonist capability against *A. alternata*. Meanwhile, none of the lesser nutritional requirement strains belonging to *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus laurentii* II and *Rhodotorula* spp. did, suggesting a positive correlation between these factors. Molecular identification through 26S sequencing allows confirming the assigned identity by PCR-RFLP method. These findings result promising for the biological control of *Alternaria* in wine grapes.

Keywords: *Alternaria*, biological control, antagonist yeasts, Malbec.

### 1. Introducción

El género *Alternaria* es un componente principal de la microbiota en uvas para vinificar en diversas regiones vitivinícolas de Argentina y del mundo (Rouseaux *et al.*, 2014; Tancinova *et al.*, 2015; Prendes *et al.*, 2015). La existencia de cepas de la especie *Alternaria alternata* aisladas de uva Malbec con habilidad de producir ácido tenuazónico (ATE), alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME) (Prendes *et al.*, 2015; Vargas Trinidad *et al.*, 2015) así como la incidencia natural de estas micotoxinas en jugo de uva y vino (Lau *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2006; Broggi *et al.*, 2013; Pizzutti *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2016), indican que la presencia de este género en uvas para vinificar podría significar un riesgo para la salud de los consumidores de vino.

La prevención del crecimiento de hongos productores de micotoxinas es la estrategia más efectiva para controlar la presencia de micotoxinas

en los alimentos (Hocking *et al.*, 2007). En los últimos 25 años, debido al aumento de las regulaciones y las demandas de los consumidores por productos más saludables, se ha incrementado el interés por el control biológico como método alternativo a la aplicación de fungicidas orgánicos y/o químicos para el control del crecimiento fúngico en frutos (Liu *et al.*, 2013). En este sentido, las levaduras epífitas de uva para vinificar resultan prometedoras para el control biológico de *Alternaria*, debido a que como componentes mayoritarios adaptados fenotípicamente a este nicho, son capaces de colonizar más efectivamente y competir por los nutrientes y el espacio además de poder permanecer en las superficies de planta o heridas durante largos periodos y condiciones secas (Suzzi *et al.*, 1995).

El control biológico con levaduras epífitas de bayas de uva ya ha sido propuesto como una herramienta útil para reducir el impacto de especies de

*Aspergillus* productoras de ocratoxina en los viñedos. Cepas de *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* y *Candida incommunis*, fueron capaces de disminuir la colonización de las uvas por *A. carbonarius* y *A. niger* (Bleve *et al*, 2006). Así también, dos cepas de *Kluyveromyces thermotolerans* mostraron capacidad de controlar el crecimiento de *A. carbonarius* y de especies de *Aspergillus* del agregado *A. niger* y la acumulación de OTA (Ponsone *et al.*, 2011).

También se han realizado estudios con levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas, para el control de diversos patógenos fúngicos de planta o uva de mesa. Suzzi *et al* (1995) observaron que levaduras naturales del vino aisladas de baya de uva poseían actividad biocontroladora contra hongos patógenos de planta (*A. niger*, *A. alternata*, *Botrytis squamosa*, *Cladosporium variable*, *Colleotrichum acutatum*, *Fusarium oxy sporum*, *Macrophomina phaseolina*, *Penicillium digitatum*, *Phomopsis longicola*, *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotium* y *Trichoderma viride*). Dos cepas de *S. cerevisiae* y una de *Zygosaccharomyces* resultaron los antagonistas más prometedores. Asimismo, entre levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas en Argentina, se encontraron 16 levaduras antagonistas de *B. cinerea* (15 *S. cerevisiae* y 1 *Sch. pombe*) en uvas de mesa (Nally y *col.*, 2012) y 43 levaduras antagonistas (16 *Saccharomyces*, 9 *Candida*, 4 *Dekkera*, 1 *Issatchenkia orientalis*, 2 *K. marxianus*, 2 *P. membranifaciens*, 1 *S. roseus*, 8 *T. delbrueckii*) de alguno de los hongos componentes del complejo de podredumbre ácida en uvas de mesa (*Aspergillus caelatus*, *A. carbonarius*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *F. oxysporum*, *Penicillium comune*, *Rhizopus stolonifer* y *Ulocladium* sp.) (Nally *et al*, 2013).

Por otra parte, el biocontrol puede visualizarse como un sistema, en donde existe una relación cuantitativa entre la concentración de las células del antagonista, concentración de organismo a controlar y el resultante biocontrol (Schisler *et al*, 2011). En este sistema, resulta importante conocer la concentración del patógeno a la cual se lo puede controlar así como definir la concentración del antagonista necesario para tal fin.

Es importante destacar que en el mercado, ya se han desarrollado varios productos basados en levaduras antagonistas para el control de enfermedades post-cosecha de uvas, frutos de pepito y cítricos como Aspire (Ecogen, Inc., Langhore, PA) con la levadura antagonista *C. oleophila* (Droby *et al*, 1993,1998), Yieldplus (Anchor yeast, Cape town) basado en *Cryptococcus albidus* (De Koch, 1998) hecho y registrado en el sur de África y Shemer (Agrogreen, Asgdod) basado en *M. fructicola* (Kurtzman y Droby 2001; Karabulut *et al*, 2002 y 2003) hecho y registrado en Israel.

Por todo lo expuesto, son objetivos del presente trabajo: i) seleccionar levaduras y organismos tipo levadura con capacidad de biocontrol de *Alternaria*

*alternata* en uva Malbec y ii) confirmar la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S.

## 2. Metodología

### 2.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

#### 2.1.1 Preparación del inóculo de levadura y organismos tipo levadura

Se realizaron siembras de cada una de las cepas de levadura a evaluar en medio MYGP y se incubaron a 28 °C durante 48-72 hs. Se tomaron varias colonias aisladas por cepa y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada estéril contenida en un microtubos de 1,5 mL. Estas suspensiones fueron centrifugadas a 6200 g por 5 minutos a 4 °C, se descartaron los sobrenadantes y los pellets fueron resuspendidos nuevamente en agua destilada estéril para repetir el procedimiento, para eliminar cualquier nutriente remanente del medio inicial. Finalmente los pellets fueron resuspendidos en agua destilada estéril y se ajustó la concentración de levadura a 10<sup>6</sup> UFC/mL mediante recuento en cámara de Neubauer.

#### 2.1.2 Cepas e inóculo fúngico

Se utilizaron 3 cepas de *A. alternata* (5.5, 7.5 y 25.1) seleccionadas por su capacidad toxicogénica en medio AMLM (*in vitro*) y actividad patogénica y toxicogénica demostrada en uva (Prendes *et al*, 2015; Prendes, 2016). Para la preparación del inóculo fúngico, se sembraron cada una de las cepas de *A. alternata* en medio APZ y se incubaron a 20-25 °C durante 7-10 días bajo ciclos alternativos de luz blanca: oscuridad (8: 16 hs). Finalizado el período de incubación, se adicionaron 4 mL de agua destilada- 0.05 % Tween 20 (v/v) estéril a cada una de las placas, para remover las esporas del micelio. Cada suspensión fue recolectada en microtubos de 1,5 mL estériles que se centrifugaron a 13.000 g por 5 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado de esporas fue resuspendido en 1 mL de una solución 0,01 % de Tween 20 (v/v) estéril. La concentración de esporas fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer y las concentraciones a utilizar fueron ajustadas por dilución en solución 0.01 % Tween 20 (v/v).

#### 2.1.3 Determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *Alternaria alternata* en uva

Previamente a la selección de las levaduras y organismos tipo levadura con capacidad antagonista frente a *A. alternata* en uva, se procedió a determinar la concentración mínima infectiva de

cada una de las 3 cepas de *A. alternata* utilizadas. La metodología se basó en el ensayo de fitopatogenicidad descrito por Nally *et al* (2013). Brevemente se tomaron bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se las desinfectó superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (1 %, v/v) seguido de 3 lavados con agua destilada estéril. Las uvas fueron inoculadas mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 µl de una suspensión de esporas en solución 0.01 % Tween 20 (v/v) a una concentración dentro del rango de  $1,75 \cdot 10^2$  a  $1,9 \cdot 10^5$  esporas/mL, generando una herida ecuatorial con el mismo tip estéril que contenía la suspensión. El control negativo consistió en uvas inoculadas sólo con 20 µl de la solución 0.01 % Tween 20 (v/v). Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm) a 25°C en estufa, a humedad relativa de 100 % por 5 días. Se utilizaron 3 placas con 8 uvas por placa por cada cepa y condición a evaluar. El experimento se repitió 2 veces.

Al final del experimento, se determinó para cada cepa y concentración de esporas evaluadas, el porcentaje de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada por *Alternaria* en uvas (%), calculada como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales x 100. La mínima concentración de esporas capaz de producir un porcentaje de infección del 100 % para cada cepa de *Alternaria*, fue definida como la CMI.

#### **2.1.4 Evaluación del efecto preventivo de las levaduras y organismos tipo levadura frente a la infección de *Alternaria alternata* en uva**

Se utilizaron 67 cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael, previamente identificadas mediante el método de RFLP-ITS (Prendes, 2016). En pos de generar una presión de selección durante el aislamiento, las colonias con características de levadura se aislaron al cabo de 7 días de incubación de bayas de uvas Malbec colocadas directamente sobre el medio DRBC, para someterlas a una convivencia obligada con hongos. Se evaluó el posible efecto preventivo de las mismas frente a la infección ocasionada en uva por cepas de *A. alternata*, utilizando la metodología descrita previamente (punto 2.1.3) con algunas modificaciones. Se desinfectaron superficialmente bayas de uva Malbec sanas (recolectadas en tiempo de cosecha) con sus pedicelos remanentes y se inocularon mediante el uso de micropipeta con un volumen de 20 µl de una suspensión de  $10^6$  UFC/mL de la cepa de levadura u organismos tipo levadura a evaluar, generando una herida ecuatorial con el mismo tip que contenía la suspensión. Una

vez cumplido el período de 2 horas se inoculó, en la misma herida y mediante micropipeta, 20 µl de la cepa de *Alternaria* a enfrentar a su CMI. Los controles negativos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 µl de agua destilada estéril y uvas inoculadas con 20 µl de la suspensión de cada levadura y organismo tipo levadura a evaluar sin post-inoculación del patógeno. Los controles positivos consistieron en uvas inoculadas sólo con 20 µl del patógeno (*A. alternata*) a su CMI. Las uvas inoculadas se incubaron en placas de Petri (90 mm), a razón de 8 uvas por placa, a 25 °C en estufa y humedad relativa de 100 % durante 5 días. Se utilizaron 8 uvas por replica (placa) y 3 réplicas por tratamiento en un diseño de bloques completos al azar. Al final del experimento se determinó el porcentaje de infección o la incidencia de la enfermedad ocasionada en uva (%) por tratamiento, como el número de heridas infectadas/ número de heridas totales x 100.

Con los datos del primer experimento se realizó la preselección de levaduras y organismos tipo levadura con capacidad preventiva, utilizando como criterio una reducción mayor o igual a 60 % del porcentaje de infección provocado por cada una de las 3 cepas de *A. alternata* a su CMI. El experimento fue repetido sólo para aquellas cepas que resultaron preseleccionadas.

## **2.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S**

### **2.2.1 Extracción del ADN genómico**

Se extrajo el ADN genómico total de las levaduras que resultaron seleccionadas por su capacidad preventiva frente a la infección de las 3 cepas de *A. alternata* en uva (punto 2.1.4), siguiendo la técnica descrita por Querol *et al* (1992). Los aislamientos de las levaduras se inocularon en caldo YPD y se incubaron a 28 °C durante 24-48 h. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm durante 5 min. El sedimento celular se lavó con 1 mL de agua estéril y se resuspendió en 500 µl de solución 1 (sorbitol 0,9 M; EDTA 0,1M). Se agregó 30 µl de una solución de zimoliasa (25 mg/ml) y 30 µl de glucanasa (25 mg/ml), se homogeneizó e incubó a 37 °C durante 1 h. A posteriori se centrifugó a 7.000 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 500 µl de solución 2 (Tris-HCl 50 Mm, EDTA 20Mm), se añadió 13 µl de SDS 10% y se incubó a 65 °C durante 5 min. Se agregó 200 µl de acetato de potasio (5M/3M), se agitó por inversión y se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 4 °C durante 15 min y se pasaron los sobrenadantes a tubos eppendorf limpios. Para precipitar el ADN de los sobrenadantes se agregó isopropanol en una relación 1:1, se agitó por inversión, se incubó a -20°C durante 30-60 min y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El

ADN precipitado se lavó dos veces con etanol 70 %, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en agua miliQ estéril. Para eliminar el RNA, se agregó a cada tubo 1  $\mu$ L de RNasa 2mg/ml y se incubó a 37 °C durante 1 h.

### 2.2.2 Reacciones de PCR y análisis de las secuencias

Se amplificó, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de de aproximadamente 500-600 nucleótidos que corresponde al extremo 5' del gen que codifica el ARNr 26S (subunidad grande), conteniendo los dominios D1 y D2. Para ello, se utilizaron los cebadores descritos previamente por Kurtzman y Robnett (1998): NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Fig. 10). Para la amplificación exitosa en una de las cepas se requirió la dupla ITS1-NL4. La amplificación se realizó en un termociclador TC-312 (TECHNE). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50  $\mu$ L y contuvo 1  $\mu$ L de ADN templado (12-60 ng/ $\mu$ L), 5  $\mu$ L de tampón de PCR 10 $\times$ , 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 4  $\mu$ L de dNTPs 1 mM, 1  $\mu$ L de cada cebador 10  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ L de enzima Taq polimerasa (5 U/  $\mu$ L) y 34,75  $\mu$ L de agua miliQ. La mezcla de reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 52 °C y 2 min 72 °C, y una etapa de extensión final de 10 min a 72 °C. Seguidamente, los productos amplificados del gen 26S del ADNr se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen) de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

La secuenciación de los fragmentos amplificados de ADNr se realizó por electroforesis capilar usando los cebadores NL1 y NL4, en uno de los casos se requirió ITS1, haciendo uso de la prestación de servicios externos de la Unidad de Genómica del INTA Castelar (Hurlingham, Buenos Aires, Argentina). Las secuencias obtenidas se editaron con el software MEGA6 versión 2013 y las comparaciones se realizaron con las secuencias presentes en las bases de datos de acceso público con la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básica (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) provista por GenBank, disponible en el servidor del NCBI (National Center of Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir de las secuencias parciales de ADNr se construyó el árbol filogenético de las cepas aplicando el método de "Neighbor-joining" (Tamura y col., 2004) mediante el software MEGA6.

## 2.3 Análisis estadístico

Para la selección de cepas de levadura y organismos tipo levadura con capacidad preventiva frente a la infección de *A. alternata* en uva, se utilizaron los datos de porcentaje de infección correspondientes a los 2 experimentos, se obtuvo promedio y desviación estándar para cada una de las cepas y se seleccionaron aquellas que lograron una reducción del porcentaje de infección igual o mayor al 60 % ( $p$  de 0,05) para cada una de las 3 cepas fúngicas en su CMI.

Para el análisis de las levaduras seleccionadas se aplicó el análisis multivariado de varianza (MANOVA), seguido de test de Hotelling-Bonferroni para determinar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre ellas.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Infostat (versión 2013) y STATGRAPHICS Plus 5.1.

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1 Selección de levaduras y organismos tipo levadura con potencial de biocontrol de *Alternaria alternata* en uva

La determinación de la concentración mínima infectiva (CMI) de *A. alternata* en uvas Malbec a 25 °C durante 5 días, mostró diferencias entre las distintas cepas evaluadas. Para las cepas de *A. alternata* 5.5 y 25.1 la CMI resultó de  $1,75 \times 10^4$  esporas/ mL y para la cepa 7.5 fue de  $5 \times 10^4$  esporas/ mL, ocasionando porcentajes de infección de  $97 \pm 21$  %,  $97 \pm 17$  % y  $98 \pm 18$  %, respectivamente.

En un primer experimento de selección, el 48 % (32) de las cepas de levadura y organismos tipo levadura evaluados (67) disminuyeron el porcentaje de uvas infectadas en un 60 % para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas, resultando preseleccionadas para un segundo experimento. Finalmente, el 22,4 % (15) del total de levaduras y organismos tipo levadura evaluados lograron controlar a las 3 cepas de *A. alternata* en los 2 experimentos independientes llevados a cabo ( $p < 0,05$ ) y si se excluye la población del organismo tipo levadura *A. pullulans*, el porcentaje de levaduras con capacidad antagonista asciende a 75 % (15/20) (Tabla 1). Estos porcentajes resultan elevados cuando se comparan con el 0,4 a 4 % obtenido por Nally *et al.* (2013) y el 19 % obtenido por Zahavi *et al.* (2000) de levaduras aisladas de ambientes vitivinícolas antagonistas de diversos agentes fúngicos causantes de podredumbres de uva de mesa o uva para vinificar. Es posible que la búsqueda de levaduras antagonistas en el mismo nicho ecológico al de los organismos a controlar, sumado a una metodología de pre-selección como la aplicada en el presente trabajo, hayan contribuido al alto porcentaje de antagonistas obtenido entre los aislados.

Como se puede observar en la tabla 1, todas las cepas de levadura identificadas como *M. pulcherrima* (6), *C. zemplinina* (3) y la mayoría (6 de 7) de *H. uvarum* evaluadas mostraron capacidad de disminuir la infección en uva provocada por las tres cepas de *A. alternata* empleadas. Por otro lado, ninguna de las cepas del organismo tipo levadura *A. pullulans* (47) y las cepas de levadura identificadas como *Cr. laurentii II* (3) y *Rhodotorula* spp. (1) mostraron esa capacidad. El trabajo realizado en la presente tesis resulta el primer informe acerca del uso de cepas de *Metschnikowia* spp. y *H. uvarum* como antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar y particularmente, el primer informe de la levadura *C. zemplinina* con capacidad biocontroladora.

**Tabla 1. Cepas de levadura y organismos tipo levadura aisladas durante las vendimias 2011, 2012 y 2013 en uvas Malbec a tiempo de cosecha de la DOC San Rafael con capacidad antagonista frente a *Alternaria alternata*.**

Especie	Evaluadas	Antagonistas <sup>1</sup>
<i>A. pullulans</i>	47	0
<i>H. uvarum</i>	7	6
<i>M. pulcherrima</i>	6	6
<i>Cr. laurentii II</i>	3	0
<i>C. zemplinina</i>	3	3
<i>Rhodotorula</i> spp.	1	0
Total	67	15

<sup>1</sup> Capaces de reducir el porcentaje de uvas infectadas en un 60 % para cada una de las 3 cepas de *A. alternata* ensayadas (5.5, 7.5 y 25.1) en su CMI, en 2 experimentos independientes ( $p < 0,05$ ).

Es llamativo que ninguna de las cepas pertenecientes al organismo *A. pullulans* evaluadas haya resultado antagonista de *A. alternata* en uva para vinificar. *Aureobasidium pullulans* es integrante mayoritario de la microbiota de uvas para vinificar (Barata *et al.*, 2012) y ha demostrado actividad antagónica frente a distintos patógenos de frutos (Scheda *et al.*, 1999; Castoria *et al.*, 2001) así como frente a *A. carbonarius* (causante de la pudrición ácida) en uvas tintas de Grecia (Dimakopoulou *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista fisiológico, *A. pullulans* es un organismo con requerimientos mínimos para su supervivencia en uva (Barata *et al.*, 2012) y es probable que esta poca exigencia para sobrevivir constituya una presión selectiva negativa para el desarrollo de mecanismos para la competencia por nutrientes, uno de los más utilizados por los organismos antagonistas (Liu *et al.*, 2013). Esta idea se vería reforzada con la evidencia de que las cepas de levadura pertenecientes a las especies *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp. evaluadas tampoco resultaron antagonistas durante el presente estudio. Estas especies están incluidas dentro de las levaduras basidiomicetes oxidativas, y también integran junto con *A. pullulans*, el grupo de las “oligotróficas” o aquellas con requerimientos mínimos para su desarrollo (Barata *et al.*, 2012). Por otro lado, la mayoría de las cepas evaluadas pertenecientes al grupo de las copiotróficas -las apiculadas débilmente fermentativas como *H. uvarum* y las fermentativas como *C. zemplinina* y *M. pulcherrima* o *fructicola*- (Barata *et al.*, 2012) sí resultaron antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar. Se ha discutido reiteradamente acerca del biocontrol como una característica dependiente de la cepa y no de la especie (Suzzi *et al.*, 1995), pero no se han hecho análisis a la luz de los requerimientos fisiológicos de las levaduras evaluadas. En este trabajo, aquellas levaduras con mayores requerimientos nutricionales, resultaron antagonistas de *A. alternata* en uva para vinificar, sugiriendo una correlación positiva entre estos factores.

Las levaduras con capacidad antagonista fueron agrupadas en dos categorías según el test de Hotelling–Bonferroni (MANAVA;  $p < 0,05$ ). El grupo integrado por la mayoría de las levaduras (14) logró reducir el porcentaje de infección a 0.0 % de cada una de las 3 cepas fúngicas a su CMI, mientras que sólo una cepa (LP123.2) mostró una menor eficiencia (Tabla 2). La capacidad antagonista de las levaduras evaluadas durante el presente trabajo resultó elevada en comparación con otros estudios. Nally y *col.* (2013), encontraron dos levaduras, inoculadas bajo las mismas condiciones que nuestro trabajo, capaces de evitar la infección producida por *A. terreus* y una de ellas además capaz de evitar la infección por *P. commune*, la concentración de los hongos empleados en este estudio fue de  $10^4$  esporas/mL, sin tener en cuenta su CMI. Por otra parte, Zahavi *et al.* (2000) también encontraron sólo una levadura, de la que se aplicó 10 µl de  $10^8$ - $10^9$  cel/mL 1-2 horas previas a la inoculación del patógeno, capaz de evitar la infección producida por *B. cinerea*, siendo este último inoculado a razón de 10 µl de una concentración de  $5 \times 10^4$  conidios/mL, independientemente de su CMI. Es probable que la utilización de la concentración mínima infectiva del organismo a controlar (CMI), utilizada en el presente trabajo, evite el exceso del mismo resultando en una detección más sensible de la

capacidad antagonista de los organismos evaluados. Por otra parte, el nivel de control logrado por las levaduras antagonistas en el presente trabajo es el recomendado para seleccionar un antagonista con

buenas perspectivas de ser efectivo a campo (Chaluzt y Droby, 1998).

**Tabla 2. Capacidad antagonista de levaduras seleccionadas de uvas Malbec vendimias 2011, 2012 y 2013 DOC San Rafael frente a cepas de *A. alternata*.**

Cepa	Especie	Origen	% de infección <sup>1</sup>			*
			cepa 5.5	cepa 7.5	cepa 25.1	
LP123.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	4,4 ± 0,7	2,0 ± 2,8	0,0 ± 0,0	A
LP6.4.1	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP132.1	<i>M. pulcherrima</i>	2011	1,9 ± 2,6	0,0 ± 0,0	2,1 ± 2,9	B
LP8.1.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.2	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.5.1	<i>C. zemplinina</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP8.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP131.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP124	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP122.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	2,2 ± 3,1	0,0 ± 0,0	B
LP10.2.1	<i>H. uvarum</i>	2013	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP125.1	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP128.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP126	<i>H. uvarum</i>	2011	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	B
LP125.2	<i>M. pulcherrima</i>	2011	1,9 ± 2,7	0,0 ± 0,0	2,0 ± 2,8	B

<sup>1</sup> Promedio y desviación estándar correspondiente al porcentaje de uvas infectadas para cada una de las cepas de *A. alternata* evaluadas, en su concentración mínima infectiva (CMI) con el efecto antagonista de cada levadura seleccionada en 2 experimentos independientes.

\* Letras distintas representan una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo al test de Hotelling-Bonferroni.

### 3.2 Confirmación de la identidad de las levaduras seleccionadas mediante la secuenciación de la región génica 26S

Con el fin de confirmar de forma efectiva la identidad de las cepas de levadura seleccionadas por su potencial biocontrol de *A. alternata* en uva, se realizó la secuenciación de regiones conservadas del ARNr de las mismas. En términos generales, esta identificación mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada a las levaduras por el método de PCR-RFLP.

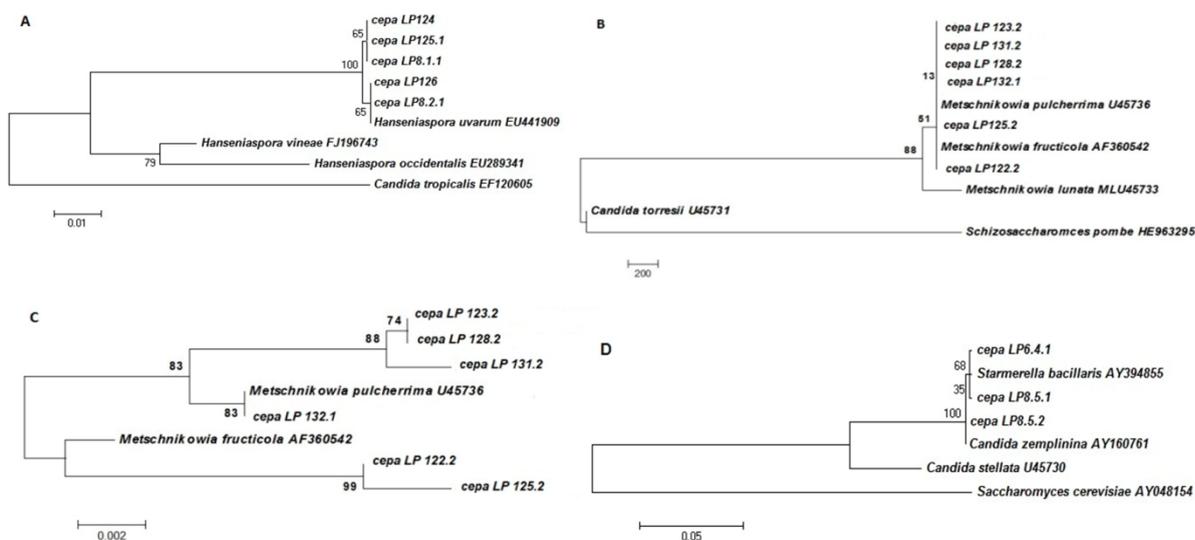
El análisis de la secuencia del dominio D1/D2 del gen 26S del ARNr (aproximadamente 600 pb) de las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126, LP 8.2.1 y LP 10.2.1 reveló que poseen una estrecha relación filogenética con cepas pertenecientes al

género *Hanseniaspora*. Las secuencias de los fragmentos amplificados de las cepas estudiadas mostraron una similitud entre 98-100 % con secuencias disponibles en la base de datos GenBank de la misma región de cepas de referencia de *H. uvarum*. El análisis filogenético, basado en el alineamiento de las secuencias parciales del ADNr de las levaduras seleccionadas con las secuencias de cepas de referencia (Fig. 1A), indicó que las cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.1.1, LP 126 y LP 8.2.1 son conespecíficas con *H. uvarum* A2 26S (GenBank EU441909).

Para las cepas LP 131.2, LP 132.1, LP 128.2, LP 125.2, LP 122.2 y LP 123.2 el análisis mostró una estrecha relación filogenética de las mismas con cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*. Las secuencias de las cepas LP 131.2, LP 132.1 y LP 128.2 mostraron un 98-99 % de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. pulcherrima*

mientras las secuencias de las cepas LP 125.2 y LP 122.2, mostraron un 99 % y 98 %, respectivamente, de similitud con secuencias de cepas de referencia de *M. fructicola*. La cepa LP 123.2 mostró una similitud de 97 % con secuencias de cepas de referencia de *M. pulcherrima* y *M. fructicola*. El análisis filogenético (Fig. 1B) indicó que todas las cepas pertenecerían al grupo que incluye tanto *M. pulcherrima* (GenBankU45736) como *M. fructicola* (GenBankAF360542). La ampliación de ese grupo (Fig. 1C), permite ver que la cepa LP 132.1 sería conespecífica con *M. pulcherrima*. Como el resto de las cepas resultaron filogenéticamente cercanas tanto a *M. pulcherrima* como a *M. fructicola*, no es

posible afirmar a cuál de estas dos especies pertenecerían. Es importante resaltar que la técnica de PCR-RFLP no tiene la sensibilidad adecuada para discernir entre las especies *M. pulcherrima* y *Metschnikowia fructicola*, ya que sólo un 2,2 % de sustituciones (11 de 499 posiciones de nucleótidos compartidas) separa a una especie de otra (Kurtzman y Droby, 2001). Esta sutil diferencia hace que inclusive, mediante la técnica de 26S, resulte compleja la asignación de especie a las cepas pertenecientes al género *Metschnikowia*.



**Figura 1: Árboles filogenéticos de cepas de levadura seleccionadas por su capacidad de reducir la infección de *Alternaria alternata* en uva, basados en la secuenciación parcial del ADNr.** (A) Cepas LP 124, LP 125.1, LP 8.8.8, LP 126 y LP 8.2.1 pertenecientes a *Hanseniaspora uvarum*, (B) y (C) cepas LP 122.2, LP 123.2, LP 125.2, LP 128.2, LP 131.2 y LP 132.1 pertenecientes a *Metschnikowia* spp. y (D) cepas LP 8.5.1, LP 8.5.2 y LP 6.4.1 pertenecientes a *Starmerella bacillaris*. Los números representan el nivel de confianza obtenidos a partir de 1000 repeticiones (se indican las frecuencias mayores al 50 %). Las barras inferiores en A, B, C y D representan la distancia correspondiente a un cambio de 1; 200; 0,2 y 5 pares de bases en 100 nucleótidos, respectivamente. En A, *Candida tropicalis* (GenBank EF120605) se usa como cepa no relacionada o “outgroup”, en B, *Schizosaccharomyces pombe* (GenBank HE963295) y en D, *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank AY048154).

Finalmente, el análisis de las secuencias de las cepas LP 6.4.1, LP 8.5.1 y LP 8.5.2 reveló una estrecha relación filogenética (100 % de similitud) de estas levaduras con cepas de referencia de *C. zemplinina* o *S. bacillaris*. La asignación de *S. bacillaris* como sinónimo obligado de *C. zemplinina* es relativamente reciente (Duarte *et al.*, 2012). Asimismo, el análisis filogenético (Fig. 1 D) indicó que estas cepas son conespecíficas tanto con *C. zemplinina* (GenBankAY048154) como con *S. bacillaris* (GenBank AY394855).

#### 4. Conclusiones

Se lograron aislar e identificar levaduras del mismo ecosistema, capaces de ejercer un control biológico de *A. alternata* en uva para vinificar.

Con la metodología de selección empleada, se obtuvo un gran porcentaje (22,1 %) del total de

levaduras y organismos tipo levadura aislados de uvas Malbec evaluados que presentaron actividad antagonista de *A. alternata* en uva.

La mayoría de las levaduras seleccionadas mostraron una gran capacidad antagonista logrando un efecto preventivo de la infección de *A. alternata* en uva.

Todas las cepas de levadura identificadas como *Metschnikowia* spp., *C. zemplinina* y la mayoría de *H. uvarum* probadas mostraron capacidad antagonista frente a *A. alternata*, no así las cepas del organismo tipo levadura *A. pullulans* y las cepas de levadura identificadas como *Cr. laurentii II* y *Rhodotorula* spp., sugiriendo una correlación positiva entre la capacidad antagonista y los mayores requerimientos nutricionales de los organismos evaluados.

La identificación de las levaduras antagonistas mediante la metodología de secuenciación del 26S, permitió corroborar la identidad asignada por el método de PCR-RFLP.

## 5. Referencias

- Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2012). *The microbial ecology of wine grape berries*. International Journal of Food Microbiology, 153(3), 243-259.
- Bleve, G.; Grieco, F.; Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). *Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of Aspergillus carbonarius and A. niger on grape*. International Journal of Food Microbiology, 108: 204-209.
- Broggi, L.; Reynoso, C.; Resnik, S.; Martinez, F.; Drunday, V.; Romero Bernal, A. (2013). *Occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages from the Entre Rios Province market, Argentina*. Mycotoxin Research, 29: 17-22.
- Castoria, R.; De Curtis F., Lima G.; Caputo L.; Pacifico S.; De Cicco V. (2001) *Aureobasidium pullulans (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action*. Postharvest Biological Technology, 22: 7-17
- Chalutz, E.; Droby, S. (1998). *Biological control of postharvest disease. Plant-Microbe interactions and Biological Control*. Dekker, New York, 157-170.
- De Koch, S. (1998). *Control of post-harvest decay of fruit by means of antagonistic microorganisms*. Ph.D. dissertation. University of Stellenbosch, Stellenbosch.
- Dimakopoulou, M.; Tjamos, S.E., Antoniou, P.P.; Pietri, A.; Battilani, P.; Avramidis, N.; Markakis, E.A.; Tjamos, E.C., 2008. *Phyllosphere grapevine yeast Aureobasidium pullulans reduces Aspergillus carbonarius (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece*. Biological Control, 46: 158-165.
- Droby, S.; Hofstein, R.; Wilson, C.L.; Wisniewski, M.; Fridlender, B.; Cohen, L.; Weiss, B.; Daus, A.; Timar, D.; Chalutz, E. (1993). *Pilot testing of Pichia guilliermondii: a biocontrol agent of postharvest diseases of citrus fruit*. Biological Control, 3: 47-52.
- Droby, S.; Cohen, L.; Daus, A., Weiss, B., Horev, E.; Chalutz, E.; Katz, H.; Keren-Tzour, M.; Shachnai, A. (1998). *Commercial testing of Aspire: a biocontrol preparation for the control of postharvest decay of citrus*. Biological Control, 12: 97-101.
- Duarte, F. L.; Pimentel, N.H.; Teixeira, A.; Fonseca, A. (2012). *Saccharomyces bacillaris not a synonym of Candida stellata: reinstatement as Starmerella bacillaris comb. nov.* Antonie van Leeuwenhoek, 102: 653-658
- Fan, C.; Cao, X.; Liu, M.; Wang, W. (2016). *Determination of Alternaria mycotoxins in wine and juice using ionic liquid modified countercurrent chromatography as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1436: 133-140.
- Hocking, A.; Leong, S.; Kazi, B.; Emmett, R.; Scott, E. (2007). *Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products*. Food Microbiology, 119: 84-88.
- Karabulut, O. A.; Cohen, L.; Wiess, B.; Daus, A.; Lurie, S.; Droby, S. (2002). *Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists*. Postharvest Biology and Technology, 24(2): 103-111.
- Karabulut, O.A.; Smilanick, J.L.; Gabler, F.M.; Mansour, M.; Droby, S. (2003). *Near-harvest applications of Metschnikowia fructicola, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California*. Plant Disease, 87: 1384-1389.
- Kurtzman, C.P.; Droby, S. (2001). *Metschnikowia fructicola, a new ascospore yeast with potential for biocontrol of postharvest fruit rots*. System of Applied Microbiology, 24: 393-399.
- Lau, B. P. Y.; Scott, P. M.; Lewis, D. A.; Kanhere, S. R.; Cléroux, C.; Roscoe, V. A. (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry of the Alternaria mycotoxins alternariol and alternariol monomethyl ether in fruit juices and beverages*. Journal of Chromatography A, 998(1), 119-131.
- Liu, J.; Sui, J.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Liu, Y. (2013). *Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit*. International Journal of Food Microbiology, 167: 153-160.
- López, P.; Venema, D.; de Rijk, T.; de Kok, A.; Scholten, J. M.; Mol, H. G.; de Nijs, M. (2016). *Occurrence of Alternaria toxins in food products in The Netherlands*. Food Control, 60: 196-204.
- Nally, M.C.; Pesce, V., M.; Maturano, Y. P.; Munoz, C.J.; Combina, M.; Toro, M. E.; Castellanos de Figueroa; L.I., Vazquez, F. (2012). *Biocontrol of Botrytis cinerea in table grapes by non-pathogenic indigenous Saccharomyces cerevisiae yeasts isolated from viticultural environments in Argentina*. Postharvest Biology and Technology, 64: 40-48.
- Nally, M. C.; Pesce, V. M.; Maturano, Y. P.; Toro, M. E.; Combina, M.; Castellanos de Figueroa L. I.; Vazquez, F. (2013). *Biocontrol of fungi isolated from sour rot infected table grapes by Saccharomyces and other yeast species*. Postharvest Biology and Technology, 86: 456-462.
- Pizzutti, I.; Kok, A.; Scholten, J.; Righi, L.; Cardoso, C.; Rohers, G.; Da Silva, R. C. (2014). *Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Talanta, 129: 352-363.
- Ponsone, M. L.; Chiotta, M. L.; Combina, M.; Dalcerro, A.; Chluze, S. (2011). *Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and Aspergillus section Nigri in grapes*. International Journal of Food Microbiology, 151: 70-77.
- Prendes, L.P.; Merín, M.G.; Andreoni, M.A.; Ramírez, M.L.; Morata de Ambrosini, V.I. (2015).

*Mycobiota and toxicogenic Alternaria spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina.* Food Control, 57: 122-128.

Prendes, L.P. (2016). *Hongos filamentosos de uvas Malbec de la DOC San Rafael: potencial biocontrol de los productores de micotoxinas con levaduras del mismo ecosistema.* Tesis doctoral, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992). *A comparative study of different methods of yeast strain characterization.* Systematic and Applied Microbiology, 15 (3): 439-446.

Rousseaux, S.; Diguta, C. F.; Radoï-Matei, F.; Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. (2014). *Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off flavors and mycotoxins.* Food Microbiology, 38: 104-121.

Schena, L.; Ippolito, A.; Zahavi, T.; Cohen, L.; Nigro, F.; Droby, S. (1999). *Genetic diversity and biocontrol activity of Aureobasidium pullulans isolates against postharvest rots.* Postharvest Biology and Technology, 17(3): 189-199.

Schisler, D.; Janisiewicz, W.; Boekhout, T.; Kurtzman, C. (2011). *Agriculturally Important Yeasts: Biological Control of Field and Postharvest Diseases Using Yeast Antagonists, and Yeasts as Pathogens of Plants.* In The Yeast, a Taxonomic Study pp 45-52. Eds. Elsevier B.V.

Scott, P.; Lawrence, B.; Lau, B. (2006). *Analysis of wines, grape juices and cranberry juices for Alternaria toxins.* Mycotoxin Research, 22: 142-147.

Suzzi, G.; Romano, P.; Ponti, I.; Montuschi, C. (1995). *Natural wine yeasts as biocontrol agents.* Journal of Applied Bacteriology, 78: 304-308.

Tančinová, D.; Rybárik, L.; Masková, Z.; Felsöciová, S.; Císarová, M. (2015). *Endogenous colonization of grapes berries.* The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 4: 69-73.

Vargas Trinidad; A.S., Ganoza, F.Q.; Pinto, V.F.; Patriarca, A. (2015). *Determination of mycotoxin profiles characteristic of Alternaria strains isolated from Malbec grapes.* En BIO Web of Conferences. Vol. 5, p. 02004. EDP Sciences.

Zahavi, T.; Cohen, L.; Weiss, B.; Schena, L.; Daus, A.; Kaplunov, T.; Zutkhi, J.; Ben-Arie, R.; Droby, S. (2000). *Biological control of Botrytis Aspergillus and Rhizopus rots on table and wine grapes in Israel.* Postharvest Biology and Technology, 20: 115-124.

# Factibilidad de recuperación de principios bioactivos a partir de residuos de la industrialización de tomate

## Feasibility of recovery of bioactive principles from residues of tomato industrialization

Cecilia Flores<sup>1</sup>, Alicia Ordóñez<sup>1</sup>, María Esther Balanza<sup>1</sup>, Alejandra Morant<sup>1</sup>, Daniela Bocci<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO.

cflores@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

La industrialización del tomate origina gran cantidad de residuos sin valor económico que contienen compuestos bioactivos. El objetivo del presente trabajo es extraer el licopeno a partir de piel, fibra y semillas obtenidas del proceso de industrialización de tomate. Se realizó un muestreo de residuos de una industria local, con el fin de disminuir la humedad y lograr su conservación las muestras se secaron en un horno del tipo túnel horizontal, de bandeja, discontinuo, haciendo variar dos parámetros en un diseño estadístico experimental del tipo 2<sup>3</sup>, las variables seleccionadas fueron temperatura y velocidad de flujo de aire. La variable de respuesta fue el contenido de licopeno de las muestras deshidratadas para un mismo nivel de humedad. En las muestras de residuos deshidratados se encontraron cantidades de licopeno inferiores a lo esperado en relación a la concentración de sólidos, variando las mismas en un rango que va desde 120 hasta 147 mg de licopeno/kg de residuos con un 7% de humedad. Se observó que la degradación a consecuencia de la deshidratación provocó pérdidas entre un 88 y 90 %. El licopeno cuantificado en los residuos deshidratados de industrialización del tomate no respondió a la cantidad de agua eliminada.

Palabras clave: licopeo, estabilidad, compuestos bioactivos, subproductos del tomate.

### Abstract

The industrialization of tomato causes a large amount of waste with no economic value that contains bioactive compounds. The objective of this work is to extract lycopene from skin, fiber and seeds obtained from the tomato industrialization process. Sampling of waste from a local industry was carried out, in order to reduce humidity and achieve conservation, the samples were dried in a horizontal, tray, batch tunnel kiln, varying two parameters in an experimental statistical design of the type 2<sup>3</sup>, the selected variables were temperature and air flow rate. The response variable was the lycopene content of the dehydrated samples for the same humidity level. In the samples of dehydrated residues, lycopene quantities were lower than expected in relation to the concentration of solids, varying in a range from 120 to 147 mg of lycopene / kg of residues with 7% humidity. It was observed that degradation as a result of dehydration caused losses between 88 and 90%. The lycopene quantified in the dehydrated residues of tomato industrialization did not respond to the amount of water removed.

Keywords: lycopene, stability, bioactive compounds, tomato by-products.

### 1. Introducción

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden formarse espontáneamente en las células vivas durante el metabolismo normal. Los antioxidantes juegan un papel importante (como un mecanismo de defensa) en el daño inducido por las ROS. Muchos estudios indican que una dieta compuesta de una gran cantidad de frutas y verduras ricas en antioxidantes, disminuye el riesgo de contraer ciertas enfermedades como el cáncer y la aterosclerosis (Chang et al. 2006; Genkinger et al., 2004; Manda, Adams y Ercal, 2010; Orak et al., 2012; Shukla y Singh, 2007; Stoilova et al., 2007).

El licopeno es el pigmento lipofílico que confiere el color rojo característico a los tomates, es un carotenoide acíclico con una cadena alifática formada por cuarenta átomos de carbono (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) con trece dobles enlaces de los cuales once son conjugados propiedad que le confiere la

particularidad de ser muy reactivo frente al oxígeno y a los radicales libres (Meléndez Martínez et al., 2004). El interés de este compuesto, radica en sus propiedades antioxidantes y sus implicaciones beneficiosas en la salud humana, principalmente como preventivo del cáncer de próstata. Además, el Licopeno se incorpora a una amplia gama de productos, tanto de la Industria Alimentaria, como Cosmética y Farmacéutica.

En cuanto a la distribución de los compuestos bioactivos en el fruto del tomate Toor y Savage (2005) concluyeron que el 52% del total de los antioxidantes (48% licopeno, 43% de ácido ascórbico, compuestos fenólicos 53%) de la fruta se encontraban en la epidermis, superando en porcentaje a la fracción contenida en pulpa y semillas. Por otro lado, Ordóñez et al (2009) estudiando la estabilidad del licopeno en los procesos de industrialización del tomate reportaron

una concentración promedio del contenido de licopeno (en base húmeda) en tomates peritas cultivados en la provincia de Mendoza de  $111,5 \pm 4,4$  mg/kg, que luego de la operación de escaldado demostró una disminución significativa ( $90,2 \pm 6,6$  mg/kg) afirmando que en la epidermis de los tomates hay un alto contenido del carotenoide.

El Licopeno se obtiene fundamentalmente a partir de fuentes naturales, hongos y principalmente del tomate. Es altamente lipofílico, y como otros carotenoides, es degradable mediante factores físicos y químicos como exposición a la luz, al oxígeno, a condiciones extremas de pH, temperaturas elevadas y contacto con superficies activas (Torres et al., 2003; Nguyen y Schwartz, 1999). Para la extracción de este tipo de sustancias se utilizan diversas técnicas; la más común es la extracción con solventes por etapas, aunque actualmente se ha utilizado la extracción con fluidos supercríticos, con grandes ventajas sobre los demás métodos (Fernández y Fernández, 1999; Guash, 2002).

Por otro lado, la deshidratación permite preservar alimentos altamente perecederos, especialmente frutas y hortalizas, cuyo contenido de agua es típicamente superior al 90%. El objetivo principal de esta tecnología es reducir el contenido de humedad de los alimentos, lo cual disminuye su actividad enzimática y la capacidad de los microorganismos para desarrollarse sobre el alimento. Según Toor et al. (2006) las temperaturas de secado inferiores a  $65^{\circ}\text{C}$  permiten preservar el color y sabor del tomate. A estas temperaturas también se preservan mejor los compuestos, tales como polifenoles, flavonoides, licopeno,  $\beta$ -caroteno y ácido ascórbico.

Mendoza es la principal provincia productora de tomate para industria, seguida de San Juan y Río Negro, la incidencia de la producción Cuyana a nivel nacional en la temporada 2012-2013 alcanzó un 44 % (Asociación tomate 2000, 2013). Este tomate se industrializa en la región de Cuyo produciendo una gran cantidad de residuos que no tienen valor económico. Por lo expuesto, resulta de interés estudiar la factibilidad de recuperación de licopeno de los residuos de la industrialización del tomate.

El objetivo es extraer el principio bioactivo licopeno a partir de piel, fibra y semillas obtenidas del proceso de industrialización de tomate.

## 2. Materiales y métodos

Se realizó un muestreo de pieles, fibra y semillas obtenidas del proceso de elaboración de productos derivados del tomate en la Empresa La Colina S.A., de la Ciudad de San Rafael, Mendoza. Se tomaron muestras de distintos lotes de elaboración y en tres oportunidades diferentes durante la temporada 2014. Los residuos estaban formados por una mezcla de piel, fibra y semilla. Las mismas se retiraron de la

línea de preparación de jugo de tomate, donde las pieles extraídas de la peladora junto a otros tomates retirados de la cinta de inspección son recibidos por el molino bomba y luego tamizados. Esta operación tiene como resultado el jugo que se vuelve a incorporar a la línea de producción y el residuo que se elimina.

Las muestras, previo a su secado, se conservaron en un freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  a fin de impedir su deterioro. En todas las experiencias se trabajó con las mismas muestras, para poder comparar las cantidades de licopeno presentes en cada una de ellas, dependiendo de las condiciones de tratamiento durante el secado.

**Deshidratado de la muestra:** El horno de secado es del tipo túnel horizontal, de bandeja, discontinuo, con medidor de flujo, temperatura y tiempo. La circulación de aire es forzada a través de un ventilador y la energía calórica proviene de dos resistencias eléctricas. El mismo se encuentra disponible en planta piloto de la FCAI. El horno permitió disminuir la humedad de las muestras por debajo del 7% (ideal). De esta manera, se logra la reducción de humedad, volumen, peso y estabilidad de la muestra. Las muestras se secaron haciendo variar dos parámetros en forma directa: temperatura y velocidad del flujo del aire, e indirectamente el tiempo de secado.

**Diseño experimental:** Se realizó un diseño estadístico experimental del tipo  $2^3$ , las variables seleccionadas fueron temperatura y velocidad de flujo de aire. La variable de respuesta fue el contenido de licopeno de los residuos deshidratados para un mismo nivel de humedad.

### VARIABLES SELECCIONADAS:

1. Velocidad del Flujo de Aire (medidas con anemómetro):  
8 km/h, obtenidos con 50Hz de frecuencia en el ventilador; 7 km/h, obtenidos con 40Hz de frecuencia en el ventilador; 5,5-6 km/h, obtenidos con 30-35Hz de frecuencia en el ventilador.

Temperaturas:  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$

El tiempo de secado fue variable en función de la combinación de tiempo y temperatura. Cada etapa de secado llevó entre 20 y 45 minutos como máximo, en bandejas cargadas con aproximadamente 25 g muestra.

Las muestras deshidratadas se guardaron rápidamente en bolsas herméticas, para impedir que adquirieran humedad del ambiente. Las mismas se conservaron en un lugar fresco y seco, para su posterior análisis.

**Determinación de humedad:** se utiliza la técnica de secado en estufa a 105°C hasta peso constante.

**Extracción de licopeno:** Las muestras se homogeneizaron en una procesadora doméstica durante 2 minutos aproximadamente para llevarlas al estado de polvo. El licopeno se extrajo según la técnica de Sadler y col. (1990) con algunas modificaciones realizadas por nuestro grupo de trabajo. Se pesó cuantitativamente 1g de muestra en un erlenmeyer de 125 ml cubierto con papel aluminio, se agregaron 25 ml de hexano-acetona-etanol (2:1:1,v:v:v) y se agitó durante 30 minutos. Luego se adicionan 10 ml de agua destilada y se continuó la agitación durante dos minutos lo que separó el contenido en dos fases, una polar (agua, alcohol, acetona) y otra no polar (hexano, licopeno). Posteriormente se tomó la fase no polar con una pipeta Pasteur y se la colocó en un matraz cubierto con papel aluminio. Los sólidos residuales se reextrajeron para asegurar la extracción completa de licopeno. Se reunieron en un matraz las fases no polares de las dos extracciones y se llevaron a volumen con hexano. Si son necesarias pueden realizarse diluciones para cuantificar el licopeno.

**Cuantificación de licopeno:** para la medición espectrofotométrica se utilizó hexano como blanco y se realizó la lectura de la solución de licopeno a una longitud de onda de 472 nm. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración utilizando una muestra de reactivo patrón (DMS, redivivo TM, lycopene 10% WS) que contiene 10% de licopeno (soluble en agua). Se preparan soluciones de licopeno patrón a 0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,5 y 2,0 mg/l. Las mismas cumplieron con la Ley de Lambert y Beer con un alto grado de ajuste.

### 3. Resultados y Discusión

Las muestras húmedas de piel, fibra y semillas presentaron valores de pH: 4,32± 0,08; sólidos solubles de 1,8± 0,1 °Bx; humedad: 85,5± 1,4 % y licopeno: 98,6± 9 mg/Kg. De acuerdo al contenido de humedad que poseen los residuos de la industria del tomate y atendiendo al propósito de utilizarlo como una fuente de licopeno es conveniente disminuir su humedad mediante un proceso de deshidratación. Esto permitirá, en caso de encontrarse cantidades significativas del carotenoide en las muestras secas, el almacenamiento de dichos residuos de tomate en condiciones adecuadas y económicamente aceptables. Cabe destacar, que por el contenido de humedad de los residuos las condiciones para almacenar las muestras frescas sin deterioro alguno serían complejas (congelado). Por otro lado, resulta más conveniente almacenar muestras secas (bajo volumen) en un lugar fresco y en recipientes adecuados para impedir el acceso de aire húmedo.

Con respecto al proceso de deshidratación de las muestras y del análisis de datos puede observarse que los valores de humedad varían para cada uno de los experimentos (combinación de tiempo y temperatura) encontrándose los mismos comprendidos en un rango que va desde 6,5 % a 14,3 %. Esto puede deberse principalmente a las condiciones de trabajo en el momento en que se realizó el secado (condiciones externas del ambiente de planta piloto donde se encuentra el horno de secado y que agregaban cantidades de humedad significativas al aire (por trabajarse con vapor), entre otras. Además, los residuos secos presentan características higroscópicas, absorbiendo humedad del aire circundante.

**Tabla1. Valor medio de Humedad de residuos luego del proceso de secado en función de la temperatura y la frecuencia del ventilador.**

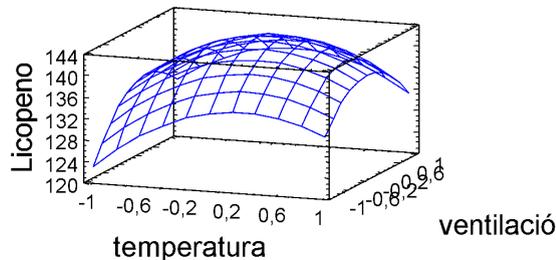
Porcentaje de humedad (H%) – valor medio			
Aire de Secado	Frecuencia en ventilador		
	24,5Hz	40Hz	50Hz
Temperatura			
50°C	9,4±0,7	8,0±0,8	9,6±1,4
60°C	8,8±0,9	<b>14,3±1,9</b>	9,3±1,1
70°C	6,5±1,5	8,3±0,7	6,8±0,9

Los valores de humedad se utilizaron para corregir, luego de la cuantificación del carotenoide, la cantidad de licopeno presente en cada muestra de residuos secos. De este modo, se puede expresar la concentración de licopeno en forma equivalente para cada muestra, en mg de licopeno/kg de residuo con un 7% de humedad.

Cuantificación de licopeno en las muestras de residuos de PFS de tomate: El deshidratado con aire caliente forzado es el método más común para secar productos alimenticios, incluyendo tomates (Doymaz, 2007). En este método, el aire caliente remueve el agua en estado libre de la superficie de los productos (Schiffmann, 1995). El incremento en la velocidad del aire y la turbulencia generada alrededor del alimento provoca una reducción de la tensión en la capa de difusión, causando una deshidratación eficiente (Cárcel et al., 2007). La deshidratación mediante este método depende de la velocidad y temperatura del aire empleado (Mulet et al., 1999). Según el diseño y los datos obtenidos el experimento en donde se obtiene la mayor cantidad de licopeno combina una temperatura de 60°C y una velocidad de flujo de 40Hz.

**Tabla 2. Contenido de licopeno de los residuos deshidratados en función de la frecuencia y la temperatura**

Licopeno (mg de licopeno/kg de residuo seco con 7% de humedad)			
Muestras deshidratadas	Frecuencia en ventilador		
	24,5Hz	40Hz	50Hz
Temperatura			
50 °C	119,2±2,5	126,8±3,7	132,5±3,9
60 °C	140,3±3,7	147,1±6,8	128,6±2,4
70 °C	130,7±2,3	142,7±3,5	135,2±4,6



**Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta del contenido de licopeno de los residuos de la industrialización de tomate en función de las variables de secado.**

De acuerdo a los datos, en las muestras de residuos deshidratados se encontraron cantidades de licopeno inferiores a lo esperado en relación a la concentración de sólidos, variando las mismas en un rango que va desde 120 hasta 147 mg de licopeno/kg de residuos con un 7% de humedad. Según varios estudios la piel del tomate es una fuente importante de licopeno. Sin embargo, la deshidratación del tomate causa alteraciones en sus niveles naturales de nutrientes y compuestos protectores, por concentración, por deshidratación y por la termolabilidad y oxidación de estos compuestos (Zanoni et al., 1998). Demiray et al. (2012) demostraron que la degradación de  $\beta$ -caroteno en cuartos de tomate puede ser de hasta un 81 % a consecuencia de la deshidratación con aire forzado a 60 °C. Pérdidas menores de  $\beta$ -caroteno (32 %) pueden obtenerse mediante una deshidratación parcial (75 %) a 60 °C (Muratore et al., 2008).

Como puede apreciarse en la figura 1 la combinación de variables en donde la cantidad de licopeno alcanza su valor máximo corresponde a una velocidad de flujo de 40 Hz y 60 °C. Sin embargo, al comparar el contenido de licopeno en la muestra húmeda y deshidratada se observó que el proceso de secado origina pérdidas entre un 88 y 90 %.

#### 4. Conclusiones

El licopeno cuantificado en los residuos deshidratados de industrialización del tomate no respondió a la cantidad de agua eliminada. Este comportamiento estaría confirmando que los carotenoides pueden fácilmente reordenarse en diferentes isómeros geométricos y oxidarse,

resultando una disminución o pérdida del mismo y de sus propiedades biológicas. Como consecuencia de este comportamiento se plantea en una próxima etapa realizar directamente la liofilización de las pieles de tomate. Se espera lograr un polvo de pieles de tomate rico en el compuesto bioactivo licopeno y estudiar su estabilidad en el tiempo.

#### 5. Referencias

Schiffmann, R. F. (1995). Microwave and dielectric drying. *En Handbook of industrial drying*. A.S. Mujumdar (Ed.), pp. 345–372. New York: USA.

Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V., Riera, E. Y Mulet, A. (2007). Influence of high intensity ultrasound on drying kinetics of persimmon. *Drying Technology*. 25:185-193.

Doymaz, I. (2007). Air-drying characteristics of tomatoes. *Journal of Food Engineering* 78(4):1291–1297.

Toor, R.K. Y Savage, G.P. (2006). Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chemistry*. 94(1):90-97.

Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., & Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478–485.

Genkinger, J. M., Platz, E. A., Hoffman, S. C., Comstock, G. W., & Helzlsouer, K. J. (2004). Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. *American Journal of Epidemiology*, 160(12), 1223–1233.

Manda, K. R., Adams, C., & Ercal, N. (2010). Biologically important thiols in aqueous extracts of spices and evaluation of their in vitro antioxidant properties. *Food Chemistry*, 118(3), 589–593.

Orak, H. H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S. S., Ekinci, N., Sahin, F. H. (2012). Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Food Science and Technology International*, 18(4), 391–402.

Shukla, Y., Singh, M. (2007). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45(5), 683–690.

Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S. (2007). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102(3), 764–770.

Meléndez-Martínez, A.; Vicario, I.; Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides

en los alimentos. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Versión impresa ISSN0004-0622. ALAN v.54 n.2 Caracas jun.

Toor, R. K.; Savage, G. P. (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. Food Chem. 99,724-727

Toor, R. K.; Savage, G. P. (2006). Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. Food Chemistry, 94, 90-97.

Nguyen, M.L., Schwartz, S.J. Lycopene: Chemical and biological properties. Food Technology 1999 Feb; 53(2):38-45.

Torres, A.M., Rojas, L.F., Mazo, J.C., Sampedro, C., Restrepo, S., Atehortúa, L. y otros (2003). Estudio de medios de cultivo para la síntesis de Licopeno a partir de *Clavibacter michiganensis* sub. *Michiganensis*. Vitae; 10 (2):37-45.

Fernández, D.P., Fernández, R. (1997) Fluidos supercríticos. Ciencia Hoy; 8(43):36-45.

Guash L. (2002) CSIC AGRO017- Supercritical fluid extraction and selective fractionation of lycopene and other carotenoids from natural sources. Oficina de patentes Venezolanas 200201310. Junio 6.

# Producción Limpia: Agresividad de Efluentes Agroindustriales Utilizados para el Riego.

## Cleaner Production: Aggressiveness of Agro-industrial Effluents Used for Irrigation.

María Esther Balanza<sup>1</sup>, Alicia Lucía Ordóñez<sup>1</sup>, Alicia María Sánchez<sup>1</sup>, María Eugenia Santibáñez<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO.

mbalanza@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

El agua subterránea de uso industrial en la región de San Rafael, Mendoza, suele tener valores de dureza y salinidad altos y carácter fuertemente incrustante, aún a temperatura ambiente. Las industrias frutihortícolas y vitivinícolas descartan más del 90% del agua utilizada en sus procesos como efluentes, previa incorporación de cantidades muy variables de materia orgánica disuelta o en suspensión, putrescible, así como algunas sustancias inorgánicas como sodio y/o cloruros, provenientes de álcalis o sal. Se determinaron los Índices de Agresividad y la Relación de Absorción de Sodio de efluentes de dichas industrias para evaluar su calidad para riego. En la mayoría de los casos los efluentes resultaron fuertemente agresivos corrosivos, requiriendo corrección para su uso. En cuanto a la calidad salina para el riego, si bien en muchos casos no presentan variación significativa respecto del agua limpia utilizada, en otros se transforman en agua de alta peligrosidad sódica y salina para los suelos.

Palabras clave: Producción limpia, agresividad de efluentes, agua riego

### Abstract

Groundwater for industrial use in the region of San Rafael, Mendoza, usually has high hardness and salinity values and is strongly fouling, even at ambient temperature. The fruit and vegetable and wine industries discard more than 90% of the water used in their processes as effluents, after incorporating highly variable amounts of dissolved or suspended organic matter, putrescible, as well as some inorganic substances such as sodium and/or chlorides from alkalis or salt. The Aggressivity Indexes and Sodium Absorption Ratio of effluents from these industries were determined to evaluate their quality for irrigation. In most cases the effluents were strongly aggressive and corrosive, requiring correction for their use. As for the saline quality for irrigation, although in many cases there is no significant variation with respect to the clean water used, in others it becomes water with high sodium and saline hazards for soils.

Keywords: Clean production, effluent aggressiveness, irrigation water

### 1. Introducción

Las industrias, en su mayoría frutihortícolas y vitivinícolas, del sur de la provincia de Mendoza, requieren para su funcionamiento importantes cantidades de agua, por lo que utilizan principalmente agua subterránea, de buena calidad microbiológica pero de alta o muy alta salinidad y alto contenido de calcio, con carácter netamente incrustante, tanto a temperaturas altas como ambiente (Balanza et al., 2012). Más del 90% del agua utilizada suele eliminarse luego como efluentes, habiendo incorporado gran cantidad de materia orgánica putrescible o modificado el contenido salino por uso de álcalis, sal y/u otros insumos en algún punto del proceso.

El comportamiento de los componentes o contaminantes químicos de las aguas naturales y residuales es función de las propiedades físico-químicas que predominan en éstas y su capacidad agresiva corrosiva o incrustante depende del equilibrio de las especies carbonatadas y el contenido de calcio, aunque con influencia del contenido de sales totales y/o de otros iones presentes en dicho equilibrio (Villar Alvarado, 2008; Rodier, 1998; Birnhack et al., 2010)

A los efectos de valorar la calidad del agua para riego, además del pH, que influye no sólo en los

índices de agresividad sino también afectando la vida vegetal y animal fuera del rango de pH 5,5 a 9,0 (valores fijados como límites en las reglamentaciones de vertidos o reúso para riego), es importante tener en cuenta parámetros que permitan valorar el peligro de salinización (sólidos inorgánicos disueltos) y de alcalinización del suelo (por contenido de sodio). Siendo que la peligrosidad sódica se contrarresta por el contenido de calcio y magnesio, uno de los parámetros más utilizados para la valoración es la relación de absorción de sodio (RAS).

El objetivo del trabajo es evaluar la calidad de los efluentes industriales frutihortícolas y vitivinícolas en relación a su agresividad y aptitud para riego.

### 2. Materiales y métodos

Se realizó el análisis fisicoquímico de 40 muestras tomadas al azar, de efluentes de industrias frutihortícolas y vitivinícolas en el momento del vertido a cauces o a uso para riego, en relación a los principales iones, conforme a los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales, de APHA-AWWA-WPFC (1995), así como pH, conductividad eléctrica (C), sólidos totales (ST) y DQO.

El carácter agresivo (ya sea corrosivo o incrustante) del agua se determinó como Índice de Agresividad

(Ia) de Langelier, o sea, la diferencia entre el pH medido del agua y el pH de equilibrio o saturación (pHs) de la misma para determinada temperatura. Los pHs para 25°C y 40°C se determinaron por cálculo (Langelier, 1936, Barceló et al., 2002) según la ecuación

$$\text{pHs} = 9,3 + A + B - C - D \quad (1)$$

donde:

$$\begin{aligned} A &= (\log \text{SDT}(\text{mg/L}) - 1) / 10 \\ B &= -13,2 * \log (T (^\circ\text{C}) + 273,2) + 34,55 \\ C &= \log \text{Ca} (\text{mg CaCO}_3 / \text{L}) - 0,4 \\ D &= \log \text{Alcalinidad} (\text{mg CaCO}_3 / \text{L}) \end{aligned}$$

La relación absorción sodio (RAS) para valoración de la aptitud para riego (Catalán- Lafuente, 1990) se determinó mediante la fórmula, donde las concentraciones se expresan en meq/L

$$\text{RAS} = \frac{\text{Na}^+}{\sqrt{\frac{\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}}{2}}} \quad (2)$$

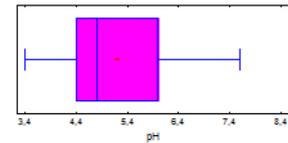
### 3. Resultados y Discusión

Los valores medios de los parámetros fisicoquímicos de los efluentes de industrias frutihortícolas y vitivinícolas, así como su variabilidad, se muestran en la tabla 1, la cual se acompaña con los gráficos de caja y bigotes para cada parámetro.

Excepto para pH y el contenido de sulfatos, que muestran coeficientes de asimetría y curtosis compatibles con una distribución normal de datos, todos los demás parámetros analizados presentan importantes asimetrías, por lo que se incluyen también en la tabla los valores máximos y mínimos y las medianas de los mismos.

A diferencia de las aguas naturales estudiadas en trabajos previos, los efluentes se caracterizan por un contenido variable de sólidos orgánicos disueltos y en suspensión que afectan fuertemente los valores de sólidos totales (ST) y de pH (por fermentación) pero

en menor cantidad a conductividad (C), que depende mayoritariamente del contenido salino.

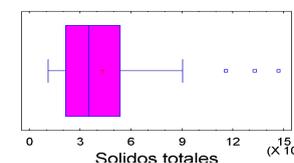
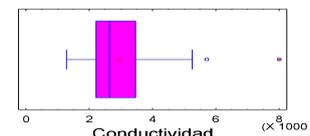


En cambio, los sólidos inorgánicos de los efluentes provienen mayoritariamente del agua usada en la industria para su funcionamiento (generalmente subterránea), con modificación de los contenidos de sodio, potasio y/o cloruros por utilización de soda cáustica (o hidróxido de potasio en su reemplazo) y/o de sal en los procesos de elaboración. Así, los valores de dureza (calcio + magnesio) y de sulfatos son similares a los encontrados en la provisión de agua. La alcalinidad, que en el agua de uso industrial está formada casi exclusivamente por bicarbonatos, tiende a disminuir en el efluente por descenso marcado del pH o a incrementarse cuando se corrigen pH demasiado alcalinos por agregado de dióxido de carbono.

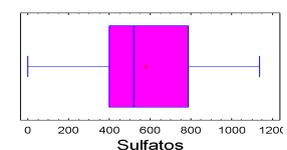
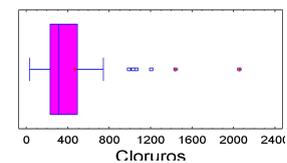
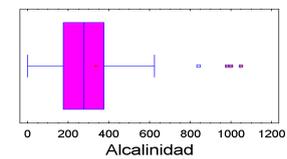
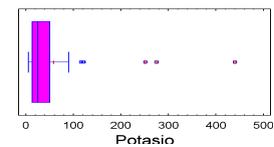
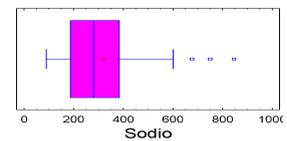
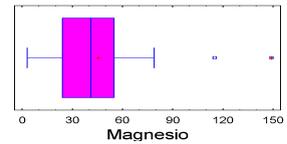
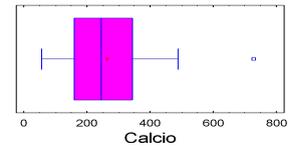
El contenido de sólidos sedimentables es muy variable, con un 15% de muestras sin sedimentos y un 20% de las mismas con valores que varían de altos (10 a 50 ml/L) a muy altos (>50 ml/L). Estos sólidos incrementan fuertemente los valores de DQO, a la vez que tienden a disminuir el pH por fermentación, ya que son altamente putrescibles.

**Tabla 1. Composición media y variabilidad de aguas residuales de industrias frutihortícolas y vitivinícolas.**

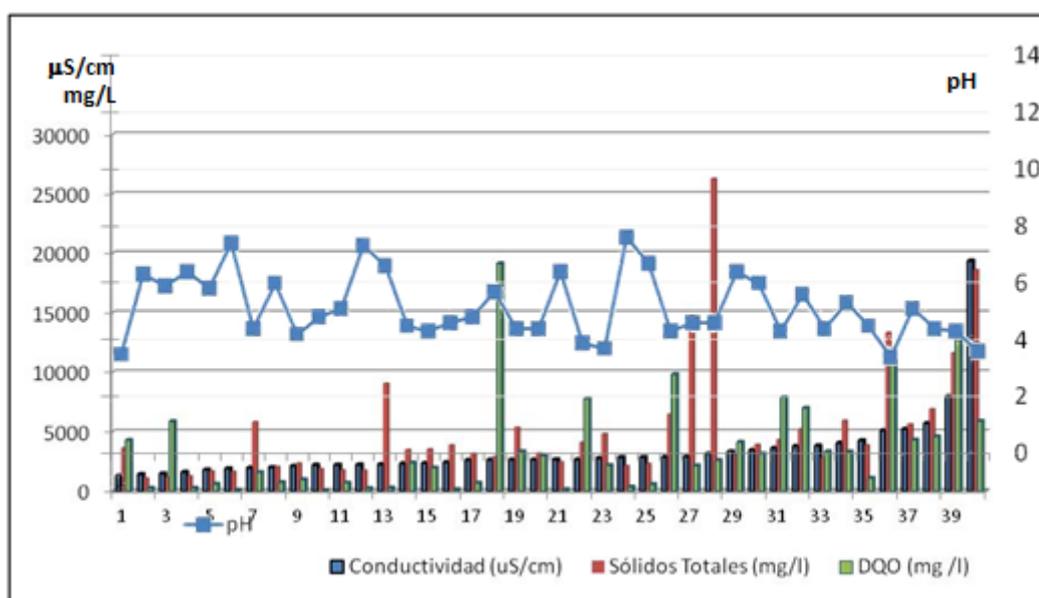
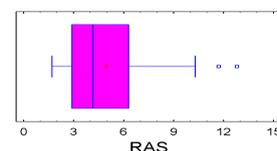
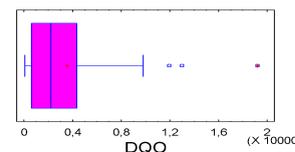
Parámetro	Promedio ± DE	CV %	Máx. Mín.	Mediana
Sólidos sedimentables en 2 h (ml/L)	20 ± 52	260	260 0	2
pH	5,2 ± 1,3	25	7,6	4,8



			3,4	
Conductividad (μS/cm)	2956 ± 1334	45	7990 1293	2650
Sólidos Totales (mg/L)	4312 ± 3203	74	14700 1080	3503
Dureza (CaCO <sub>3</sub> ) (mg/L)	945 ± 438	46	2320 200	870
Calcio (Ca <sup>++</sup> ) (mg/L)	265 ± 135	51	728 76	246
Magnesio (Mg <sup>++</sup> ) (mg/L)	45 ± 31	69	149 3	41
Sodio (Na <sup>+</sup> )(mg/L)	319 ± 185	58	847 90	279
Potasio (K <sup>+</sup> )(mg/L)	58 ± 88	152	440 5	25
Alcalinidad (CaCO <sub>3</sub> ) (mg/L)	337 ± 263	78	1049 0	278
Cloruros (Cl <sup>-</sup> )	473 ± 422	89	2059 28	312
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )(mg/L)	579 ± 285	49	1136 80	521
DQO (mg O <sub>2</sub> /L)	3526 ± 4241	120	19167 63	2184
R.A.S	4,9 ± 2,8	57	12,8 1,7	4,15
pHs 25°C	6,8 ± 0,6	9,3	9,5 6,0	6,6



pHs 40°C	6,5 ± 0,6	9,7	9,2 5,7	6,4
Índice de Agresividad a 25°C (Ia 25°C)	- 1,5 ± 1,4	93	0,8 - 6,0	- 1,6
Índice de Agresividad a 40°C (Ia 40°C)	- 1,1 ± 1,4	125	1,1 - 5,7	- 1,3

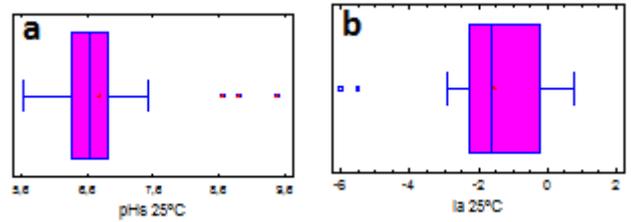


**Figura. 1. Variación de pH, conductividad, sólidos totales y DQO en las diferentes muestras.**  
Fuente: elaboración propia

Aunque el análisis de los datos muestra una correlación estadísticamente significativa a  $p = 0,01$  de la conductividad con los sólidos totales y con la DQO, en el gráfico de la fig. 1 aparece claramente visible la falta de homogeneidad de dichas relaciones. También se observa la falta de correlación de los valores de pH con los de las restantes variables, lo cual resulta de interés dado que los índices de agresividad a las diferentes temperaturas dependen del pH del agua. Más de la mitad de las muestras (56%) presentan  $\text{pH} < 5,5$ , por lo que no pueden utilizarse para riego o vertido a cauces sin tratamiento previo.

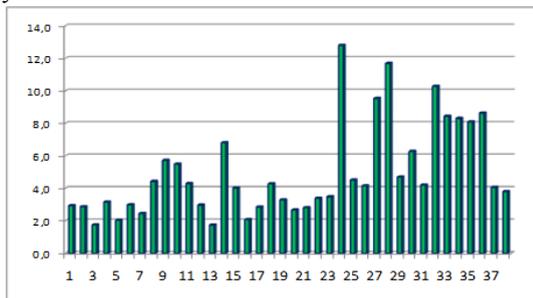
La fig. 2 muestra los modelos ajustados para las correlaciones indicadas entre la conductividad y los sólidos totales y la DQO. En el primer caso, el mayor ajuste, con  $R^2 = 0,48$  se obtuvo con el modelo doble recíproco o inverso donde  $C = 1/(0,000229214 + 0,472672/\text{ST})$ . En el segundo, el mayor ajuste lo provee el modelo raíz cuadrada-X:  $C = 1886,64 + 21,3858 * (\text{DQO})^{0,5}$ , con  $R^2 = 0,27$ . En ambos casos los valores de los coeficientes de determinación  $R^2$  muestran que ambas variables explican sólo porcentajes muy bajos de la variabilidad observada en la conductividad de los efluentes.

**Figura. 2. Gráficos de modelos ajustados para la variación de la conductividad frente a los sólidos totales (a), con  $R^2 = 0,48$  y a la DQO (b) con  $R^2 = 0,27$ . Fuente: elaboración propia**

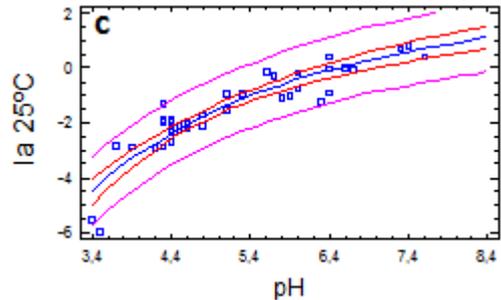


**3.1 Aptitud de los efluentes para uso en riego.**

La fig. 3 muestra los valores de RAS de las diferentes muestras analizadas y la fig. 4 el modelo de mejor ajuste ( $R^2 = 0,84$ ) para la correlación RAS y contenido de sodio.

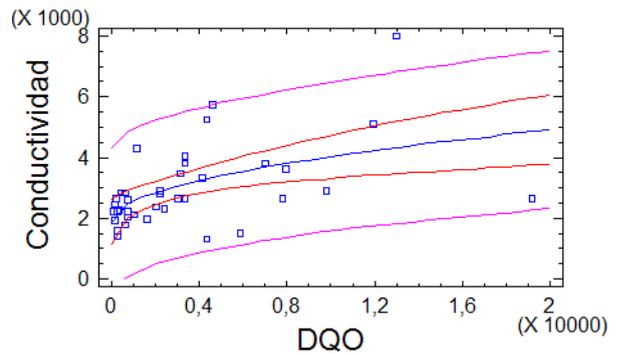
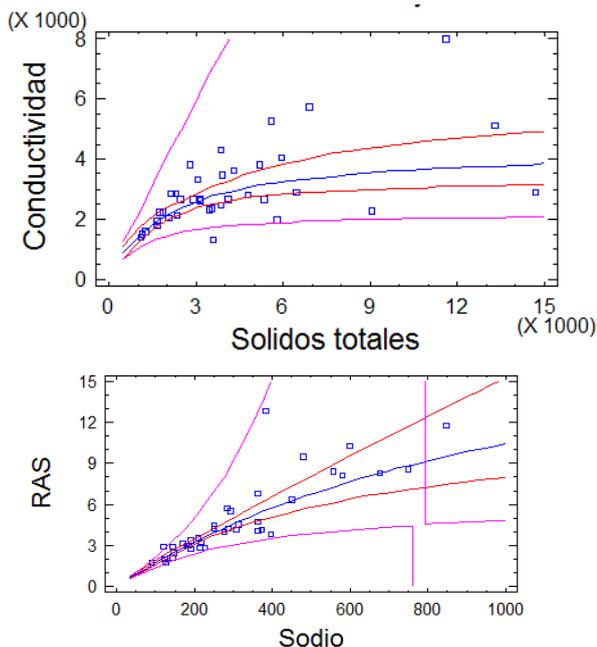


**Figura. 3. Variabilidad de Índices de Agresividad de Langelier de las muestras, a 25°C. Fuente: elaboración propia.**



expresado como  $RAS = 1/(0,0431719 + 52,6069/Na)$ .  
Fuente: elaboración propia.

Estos valores de RAS muestran que en la mayoría de los casos los efluentes frutihortícolas y vitivinícolas podrían ser aptos para riego, presentando peligros de alcalinización medios, según el contenido salino total del agua ( $RAS \leq 6$ ). Aproximadamente el 25% de las muestras presenta peligros mayores, aunque no en todos los casos valores más altos de RAS corresponden a mayor contenido de sodio, sino al escaso contenido de calcio y magnesio del efluente. Una muestra de efluente de industria olivícola, no incluida en los datos de tabla 1, muestra una  $RAS > 60$ , con muy alto contenido de sales disueltas, lo que lo torna totalmente inapto para riego, con altísimo



peligro de salinización y alcalinización en cualquier tipo de suelos.

**Figura. 4. Modelo doble recíproco o inverso, de mejor ajuste ( $R^2 = 0,84$ ) para la correlación de RAS y sodio,**

**Figura. 5. Variabilidad del pH de saturación (pHs) a 25°C (a) y el Índice de agresividad a 25°C (b) y Modelo recíproco en X, (c) de mejor ajuste ( $R^2 = 0,85$ ) para la correlación del Índice de agresividad a 25°C y el pH, expresado como  $I_a 25^\circ C = 4,9192 - 32,0742/pH$ .**

**Fuente: elaboración propia.**

Como se observa en la fig. 5a, el pH de saturación de los efluentes, obtenido por cálculo para una temperatura de 25°C, muestra una variabilidad influenciada principalmente por los puntos outliers que aparecen en muestras donde la alcalinidad es nula debido a que presentan  $pH \leq 3,5$ . En las figs. 5b y 5c se grafican tanto la variabilidad de los Índices de agresividad como el modelo de mayor ajuste de correlación de los mismos con el pH del efluente, este último con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,85$ .

En la fig. 6 se muestran los valores de los índices de agresividad para cada muestra, con sólo el 10% de las mismas con valores positivos (aguas incrustantes), el 5% inertes, otro 10% débilmente corrosivas y las restantes altamente agresivas corrosivas.

A pesar de que las aguas naturales utilizadas por las industrias tienen carácter fuertemente incrustante (Balanza et al., 2012), el uso en los procesos afecta su agresividad, requiriendo corrección del pH. Dicha corrección requiere el estudio de cada caso en particular para evitar la desaparición de especies que modifiquen sensiblemente el pHs, con el consiguiente riesgo de aparición de una corrosividad importante.

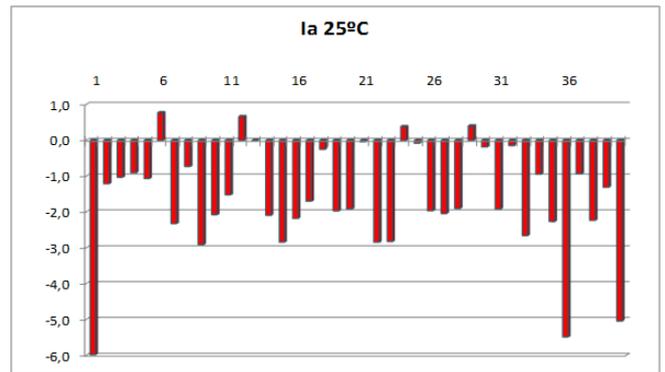
#### 4. Conclusiones

A pesar de que las agroindustrias utilizan para su funcionamiento aguas de características incrustantes, sus efluentes, por el contenido de materia orgánica (disuelta o en suspensión) incorporada resultan altamente agresivos corrosivos, requiriendo tecnologías de corrección específicas para cada caso en particular, con monitoreo permanente.

En cuanto a los contenidos salinos, si bien en muchos casos no se modifican significativamente, las industrias que utilizan álcalis o sal como insumos en sus procesos, deberían disponer de separación en la evacuación (y tratamiento) del agua con elevados contenidos de sodio y cloruros, a fin de permitir el aprovechamiento del resto de los efluentes para riego, evitando peligros de salinización y alcalinización de suelos.

#### 5. Referencias

APHA-AWWA-WPCF. (1995). Methods for the examination of water. American Public Health processes for desalinated water—A review, Desalination, doi:10.1016/j.desal.2010.11.011



**Figura. 6. Variabilidad de Índices de Agresividad de Langelier de las muestras, a 25°C.**

**Fuente: elaboración propia.**

Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington.

BALANZA, M.E.; ORDÓÑEZ, A.L., SÁNCHEZ, A.M., SANTIBÁÑEZ, M.E., GONZÁLEZ, V.N. (2012). Agresividad del agua natural del sur de la provincia de Mendoza según el método de cálculo. Memorias del Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas Clicap 2012. CD ISBN 978-987-575-106-4.

BARCELÓ, I.D., ALLENDE, I., SOLÍS, H.E., BUSSY, A.L., GONZALEZ, C. (2002). Determinación del estado de equilibrio de un sistema hídrico. Journal of the Mexican Chemical Society. Vol 46 Num 2, 93-104.

BIRNHACK, L. et al., (2010). Fundamental chemistry and engineering aspects of post-treatment

CATALÁN LAFUENTE, J. (1990). Química del agua. 2º edición. Editorial Bellisco, Madrid, España

LANGELIER, W.F. (1936). J. Am. Wat. Works Ass, (AWWA) 28, pp. 1500-1521.

RODIER, J. (1998). Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Ed. Omega S.A.121-130.

VILLAR ALVARADO, M.J.; (2008). Tesis de grado Ingeniería Química, Determinación cuantitativa de la agresividad y dureza total del agua subterránea de uso industrial, en el área metropolitana de Guatemala (Región I), a través del índice de Langelier considerando iones ajenos al sistema carbonato. Universidad de San Carlos de Guatemala.

# Enseñanza del electromagnetismo: los transformadores eléctricos

## Teaching electromagnetism: electrical transformers

Graciela Serrano<sup>1</sup>, Lidia Catalán<sup>1</sup>, Francisca Julián<sup>1</sup>, Silvia Clavijo<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO.

gserrano@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

Estudiantes universitarios de Física básica manifiestan dificultades para aprender conceptos elementales de corriente alterna y sus relaciones, en particular los vinculados a fenómenos de inducción electromagnética. Buscando revertir esta situación se diseñó e implementó una estrategia didáctica complementaria sobre el tema, a modo de taller, para un grupo voluntario de estudiantes. Se revisaron aspectos teóricos con énfasis en experiencias de laboratorio real y virtual, y en la resolución de problemas. Las respuestas a un problema a desarrollar sobre el tema “transformadores eléctricos” brindadas por los alumnos asistentes se compararon con las dadas por otros estudiantes que no participaron en el taller. Para establecer la comparación se analizaron medidas descriptivas muestrales y se realizaron test no paramétricos. Las medidas descriptivas indicaron en todas las preguntas respuestas más acertadas de parte de los alumnos que asistieron al taller, respecto a quienes no lo hicieron. Sin embargo no es posible, en general, hacer inferencias poblacionales respecto a la diferencia en las respuestas de ambos grupos.

Palabras clave: Transformador eléctrico- Electromagnetismo- Enseñanza.

### Abstract

University students of basic Physics manifest difficulties when learning elementary concepts of alternating current and their relationships, particularly those related to electromagnetic induction phenomena. Trying to reverse this situation, we have designed and implemented a complementary didactic strategy on the subject, as a workshop, for a voluntary group of students. Theoretical aspects were reviewed with emphasis on real and virtual laboratory experiences, and problem solving. The answers to a problem to be developed on the topic “electrical transformers” provided by the attending students were compared with those given by other students who did not participate in the workshop. To establish the comparison, sample descriptive measures were analyzed and non-parametric tests were performed. The descriptive measures indicated in all the questions more correct answers from the students who attended the workshop, regarding those who did not. However, it is not possible, in general, to make population inferences regarding the difference in the responses of both groups.

Keywords: Electrical Transformers-Electromagnetism-Learning

### 1. Introducción

Los estudiantes aprenden el tema de corriente alterna en un curso básico de electromagnetismo, pero este aprendizaje en general es reproductivo: no evidencia el reconocimiento ni la aplicación de leyes y fenómenos físicos. Para los estudiantes de Ingeniería, los temas aplicados son los que despiertan mayor interés al estudiarlos, y también son los que permiten a los docentes la vinculación directa de los principios y leyes de la física con temáticas específicas de la carrera. Considerando así las dificultades de los estudiantes al estudiar electromagnetismo (Catalán *et al.* 2010, Giacosa *et al.* 2014, Almudi *et al.* 2005) y las necesidades disciplinares específicas que impactan en el ciclo superior, nos preguntamos si una instancia de aprendizaje complementaria aplicada a un grupo reducido de alumnos mejoraría el aprendizaje, evidenciado por la calidad de las argumentaciones de sus respuestas, sobre el tema corriente alterna (Toulmin, 1958).

Para responder a esta pregunta se diseñó una instancia de aprendizaje complementaria opcional de corriente alterna bajo la modalidad de “taller”, al finalizar el cursado de la asignatura Física II. Si bien, habitualmente los contenidos de corriente alterna se desarrollan durante el cursado de la asignatura para todos los estudiantes, en el taller se buscó complementar este aprendizaje, brindando al estudiante posibles situaciones a resolver que favorecieran un aprendizaje significativo. Entre las actividades abordadas se encuentra el diseño de un transformador eléctrico. Durante el desarrollo de esta tarea los alumnos trabajaron en laboratorio real, discutieron la estructura del transformador eléctrico, revisaron leyes y conceptos físicos, y dedujeron fórmulas, para luego resolver problemas.

En este trabajo se analizan, con recursos estadísticos, los contenidos de las argumentaciones de las respuestas a las actividades desarrolladas, considerando que una buena argumentación científica refleja un aprendizaje de buena calidad (Henao y Stipcich, 2008). El objetivo fue comparar, a partir de cinco categorías de análisis, el

aprendizaje del tema “transformadores eléctricos” de alumnos que asistieron al Taller (grupo experimental) respecto de los que no lo hicieron pero que habían cursado regularmente la asignatura (grupo de control). Para ello se analizó el contenido de las argumentaciones usadas por los estudiantes para la resolución de una actividad solicitada sobre el tema “transformadores” y son las características de estas argumentaciones las que brindan criterios para caracterizar el aprendizaje del tema. Los resultados que se muestran representan un insumo para el diseño de futuras estrategias didácticas, que el grupo de investigadores del proyecto en el que se inserta este trabajo planea realizar, y aporta a la literatura existe en torno a la enseñanza y el aprendizaje del tema.

## 2. Materiales y métodos

**Población:** Conformada por 18 estudiantes de las carreras de Ingeniería Química, Ingeniería en Industrias de la Alimentación y Profesorado de grado universitario en Química que han cursado en diferentes años Física II (con contenidos de electromagnetismo) y deben rendir el examen final. La población se dividió en Grupo 1 y Grupo 2. El Grupo 1 es el grupo experimental (formado por 12 alumnos voluntarios que asistieron al taller de corriente alterna) y el Grupo 2 es grupo de control (6 alumnos que no asistieron al taller de corriente alterna).

**Instrumento:** Todos los alumnos respondieron por escrito el mismo problema abierto sobre el tema transformadores eléctricos, en situación de evaluación. Los alumnos del grupo experimental lo hicieron al finalizar el taller, y los del grupo de control al rendir sus exámenes finales de Física II. A partir de las respuestas de los estudiantes a la consigna “*Explique el funcionamiento de un transformador eléctrico a partir de las leyes o principios físicos que fundamentan el funcionamiento de este dispositivo (realice esquemas, obtenga expresiones para realizar cálculos en el transformador, etc.). Discuta: ¿qué ocurrirá en el transformador si el primario se alimenta con corriente continua?*”. A partir de las argumentaciones explicitadas por los alumnos, se establecieron cinco categorías de análisis vinculadas a las capacidades de los estudiantes de reconocer elementos constitutivos del transformador, esquematizar, identificar leyes o principios físicos, operar fundamentalmente para obtener expresiones simbólicas que regulen el funcionamiento del transformador y predecir comportamientos.

## 3. Resultados y Discusión

Las respuestas de los estudiantes al problema abierto fueron organizadas en cinco categorías, que consideramos como indicadores del aprendizaje del tema, y las respuestas se calificaron de 0 a 3 (ver Tabla 1). Las respuestas brindadas por los estudiantes de ambos grupos tuvieron un tratamiento estadístico con el software IBM SPSS Statistics 22.

Se recurrió para el tratamiento de las respuestas a estadísticas descriptivas y a test de naturaleza no paramétrica, debido a los tamaños muestrales y la naturaleza categórica de ambas variables (variable grupo y variable respuesta).

**Tabla 1. Organización de las respuestas y categorías de análisis**

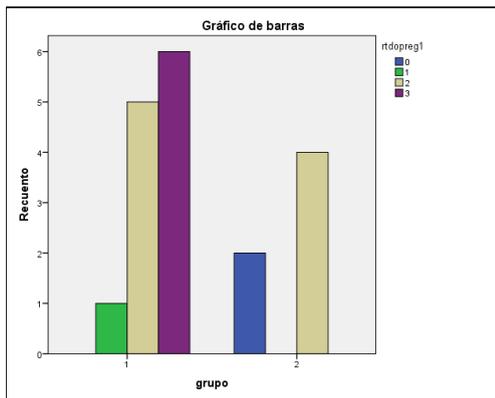
Categorías de análisis:		puntuación
1) Identificar los elementos constitutivos del transformador	Nombra <b>correctamente</b>	3
	Nombra algunos elementos	2
	Nombra con errores	1
	No contesta	0
2) Realizar esquema del transformador	<b>Completo y correcto</b>	3
	Incompleto y correcto	2
	incompleto con errores	1
	No responde	0
3) Identificar las leyes físicas involucradas en el fenómeno	Enuncia verbal o simbólicamente	3
	Enuncia solo verbal o sólo simbólicamente	2
	Enuncia con errores	1
	No identifica	0
4) Deducir fórmulas de manera justificada	Desarrollo <b>totalmente correcto</b>	3
	Desarrollo incompleto y correcto	2
	Desarrollo con errores	1
	No responde	0
5) Fundamentar el funcionamiento con corriente continua	Explica <b>correctamente</b>	3
	Responde correctamente sin justificar	2
	Respuesta con errores	1
	No responde	0

Todas las categorías fueron analizadas con medidas descriptivas y, además, en cada categoría se realizaron test no paramétricos para decidir si, a nivel estadístico puede o no considerarse la dependencia de la respuesta según el grupo de procedencia. Estos test se describen en particular para la Categoría 1.

**Categoría 1:** Identificar los elementos constitutivos del transformador

Lo deseado desde el punto de vista educativo al implementar este taller, es tener resultados que muestren que la respuesta esperada disminuye su calificación al pasar del grupo experimental (grupo 1) al grupo de control (grupo 2). La Figura 1 ilustra las respuestas dadas a la primera pregunta, tendiente al reconocimiento de los elementos constitutivos de un transformador eléctrico. Analizando las

estadísticas descriptivas (ver Tabla 1), una comparación de medias para la Categoría 1 arroja un valor de 2.42 en el grupo experimental, más de 1 punto superior a la media de 1.33 en el grupo de control. Así, se encuentra a nivel muestral una prevalencia en mayor nivel de respuestas (2 y 3) en alumnos del grupo 1 respecto a alumnos del grupo 2. Posteriormente, tratamiento de odds-ratio muestral realizado en tablas 2x2, en las que se unificaron las respuestas en correctas (respuestas 2 y 3) e incorrectas (respuestas 0 y 1) sobre las respuestas a la primera categoría indica que hay 5,5 veces más posibilidades de responder correctamente en el grupo 1(experimental) que en el grupo 2.



**Figura 1. Elementos constitutivos del transformador: Respuesta por grupos**

Se realizaron test no paramétricos para decidir la independencia de la respuesta respecto al grupo de procedencia de los estudiantes. Estos test son Chi Cuadrado de Razón de Verosimilitud y la Prueba Exacta de Fisher (en los casos donde el test Chi cuadrado no era conveniente de aplicar). Todos los test dieron respuestas coincidentes: hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis de independencia entre los valores de respuesta a la Categoría 1, obtenidos en el grupo 1 y 2 y asumir que existe algún tipo de relación estadísticamente significativa, (por ejemplo al 3% en la Prueba exacta de Fisher), entre la respuesta y el grupo de procedencia.

También se realizaron lecturas de medidas direccionales con el estadístico D de Somer, y lecturas de medidas simétricas con los estadísticos Tau-b de Kendall y Tau-c de Kendall. La Prueba U de Mann – Whitney permitió analizar la diferencia entre las medidas de tendencia central entre ambos grupos, y de la misma se concluye que las medidas de tendencia central entre ambos grupos difieren en forma significativa (p-valor = 0,041), considerando que la hipótesis alternativa planteada bajo este test es P (Puntuación obtenida en Grupo 1 > Puntuación obtenida en el Grupo 2) es distinta a 0,5. Del test unilateral derecho sobre el Test U de Mann – Whitney el p-valor=0,02 permite concluir que la

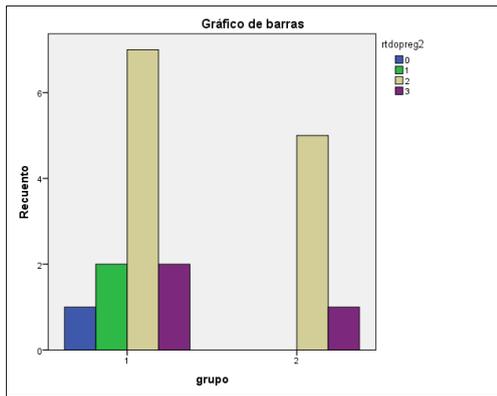
probabilidad de que se obtenga una puntuación en el grupo 1 mayor a la puntuación en el grupo 2 es mayor al 50%. La interpretación del p-valor unilateral es debido a que se pudo aplicar U de Mann Whitney para muestras grandes considerando que el tamaño del grupo experimental (Grupo 1) es mayor a 10. Sobre el test de medianas, no da significativo al 5% es decir se pueden asumir medianas iguales entre los dos grupos de respuesta. La prueba de Kolmogorov no da significativa, por lo cual a nivel de distribución de frecuencias se puede asumir respuestas similares en ambos grupos. En síntesis, las pruebas indican que hay diferencias entre los grupos y esta diferencia debe radicar en los valores de tendencia central que no sea la mediana. (Tabla 2, transcrita de la imagen brindada por SPSS)

**Tabla 2. Estadísticas de comparación de medidas de tendencia central para la Categoría 1.**

Resumen de contraste de hipótesis			
Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
Las medianas de Categoría 1 son las mismas entre los grupos	Prueba de la mediana para muestras independientes	0.054	Conserve la hipótesis nula.
La distribución de resultados de la Categoría 1 es la misma entre grupos	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	0.041	Rechace la hipótesis nula.
La distribución de resultados de la Categoría 1 es la misma entre grupos	Prueba de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes	0.270	Conserve la hipótesis nula.
Se muestran distribuciones asintóticas. El nivel de significancia es 0.05			

**Categoría 2:** Realizar esquema de un transformador eléctrico.

Para responder los alumnos debieron realizar un esquema del transformador y nombrar sus partes, además de dar indicios de las conexiones en el primario y secundario.



**Figura 2. Esquema del transformador: Respuestas por grupo.**

Del estudio de las medidas descriptivas (Tabla 1) se observa que el Grupo 1 tiene una media de respuesta (1,83) menor a la media del grupo 2 (2,17), siendo las medianas exactamente iguales. La asimetría negativa en las respuestas del primer grupo indica la presencia de respuestas incorrectas o inexistentes con calificación por debajo de la media, situación que no se observa en el segundo grupo (asimetría positiva) dado que todas las respuestas fueron correctas.

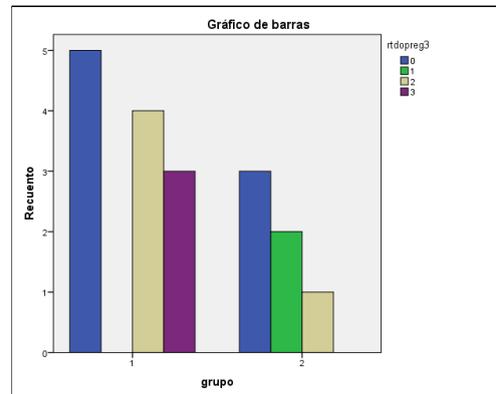
Para analizar la independencia de respuestas procedentes de ambos grupos, se realizaron test no paramétricos (Chi-cuadrado de Pearson, Razón de verosimilitud, Prueba exacta de Fisher, Asociación lineal por lineal) y sus resultados permiten descartar posible dependencia entre las respuestas de ambos grupos. Los test de medidas simétricas y direccionales dan no significativos, así podría asumirse que no hay una relación lineal entre las variables grupo de procedencia y respuesta del alumno a la pregunta 2.

**Categoría 3:** Identificar las leyes físicas involucradas.

En esta categoría se incorporan las respuestas dadas por los estudiantes buscando caracterizar el fenómeno en el que basa su funcionamiento el transformador eléctrico empleando diferentes lenguajes. Los resultados de los test no paramétricos muestran que no hay suficiente evidencia muestral de que las variables tengan algún tipo de relación. Tampoco hay suficiente evidencia estadística como para asegurar que la respuesta a la pregunta 3 dependa del grupo de procedencia, ni de que exista correlación entre las variables en estudio. No se puede considerar que la diferencia entre medianas, medias y distribución de frecuencias sea significativa en la respuesta a la pregunta 3 entre ambos grupos.

Realizando estudios descriptivos (ver Tabla 1) y odds-ratio muestral en tablas 2x2, agrupando las

respuestas en correctas (2 y 3) e incorrectas (0 y 1), se observa que hay 7 veces más de posibilidades de responder adecuadamente estando en el grupo 1 que en el grupo 2.

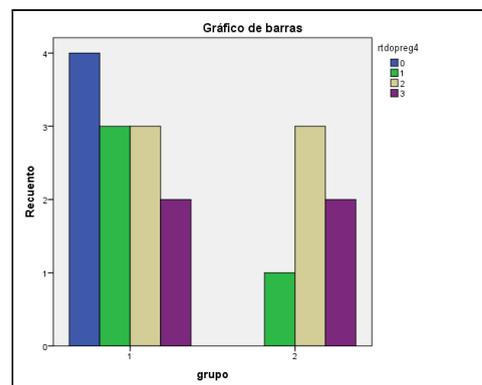


**Figura 3. Identificación de las leyes físicas: Respuesta por grupo.**

**Categoría 4:** Deducción justificada de fórmulas.

Los estudiantes debieron obtener, de manera justificada a partir de la interpretación del fenómeno de inducción electromagnética en el transformador, las relaciones que permiten modelizar el uso de este dispositivo.

Los test no paramétricos aplicados sobre las respuestas indican que no hay evidencia muestral suficiente como para asumir que haya una relación entre las respuestas de los estudiantes y el grupo de procedencia. En tanto a los estudios descriptivos, realizando odds-ratio muestral en tablas 2x2 con el criterio indicado anteriormente, se encuentra que hay 7 veces más de chance de deducir adecuadamente las fórmulas de transformador estando en el grupo 1 que en el grupo 2.



**Figura 4: Deducción de fórmulas: Respuesta por grupo.**

**Categoría 5:** Fundamenta el funcionamiento de un transformador con corriente continua.

Esta categoría surge de agrupar las respuestas de los alumnos al predecir el comportamiento de un transformador eléctrico al conectarlo a corriente continua. El odds-ratio muestral en tablas 2x2 confeccionada con la agrupación de respuestas, indicó que un alumno del grupo experimental tiene 4 veces más posibilidades de responder correctamente que un alumno del grupo de control. Sin embargo, los test no paramétricos indican que no existe evidencia estadística suficiente para decir que las respuestas de ambos grupos son diferentes.

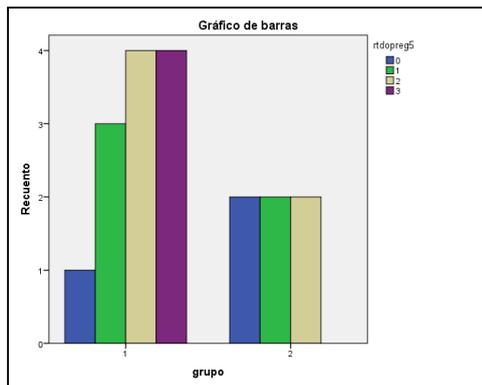


Figura 5. Fundamentación de funcionamiento: Respuesta por grupo.

#### 4. Conclusiones

Los test no paramétricos aplicados a los resultados por grupo y categoría de análisis permiten concluir que, con respecto a la primera categoría (identificación de los elementos constitutivos del transformador), existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos evaluados, se puede considerar que la respuesta es dependiente del grupo al que pertenece el alumno, favoreciendo como mejor respuesta al grupo experimental que asistió a la instancia de aprendizaje complementaria. Los resultados muestrales evidenciarían una mayor probabilidad en dar respuestas correctas (completa o parcialmente) para los alumnos del grupo experimental por sobre los del grupo de control.

Sin embargo, los test no paramétricos no muestran diferencias estadísticas significativas entre las respuestas agrupadas en las restantes categorías, es decir: no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en las categorías 2, 3, 4 y 5.

Los estudios muestrales realizados con odds-ratio muestral en tablas de respuestas agrupadas (correctas-incorrectas) 2x2 indican, en todas las categorías, una mayor posibilidad de respuesta correcta por parte de los estudiantes que asistieron al taller en esta instancia de aprendizaje complementaria.

En síntesis: si bien desde el punto de vista inferencial no puede asegurarse diferencia significativa entre las respuestas de los alumnos que asistieron al taller y los que no lo hicieron, en las tareas de representar gráficamente el transformador e identificar y aplicar las leyes que explican el fenómeno en el cual se basa su funcionamiento, sí existe diferencia en los resultados muestrales como lo indican los estadísticos muestrales y los resultados de odds-ratio. Así, considerando estos resultados muestrales y sin hacer inferencia, se estaría en condiciones de afirmar que los estudiantes que asistieron a la instancia de aprendizaje complementaria mostraron, en términos generales, mayor posibilidad de dar respuestas correctas en todas las categorías de análisis, frente a los alumnos que no asistieron a esta instancia.

Sin embargo, debe hacerse notar que los resultados estadísticos encontrados no concuerdan con los esperados: que el rendimiento del grupo que asistió al Taller fuera superior, mostrando con ello un mejor aprendizaje, evidenciado en la calidad y pertinencia de sus argumentaciones, respecto al grupo de estudiantes que no participaron en esta estrategia didáctica adicional.

#### 5. Referencias

- Almudí, M.; Zuza, C. y Bonet, E. (2005). *Explicando los fenómenos de inducción electromagnética: relevancia de su enseñanza y dificultades de aprendizaje*. Enseñanza de las ciencias, número extra, 2005.
- Catalán, L.; Caballero Sahelices, M. y Moreira, M. (2010). *Niveles de conceptualización en el Campo conceptual de la Inducción electromagnética. Un Estudio de Caso*. Latin-American Journal Physics Education. Vol. 4, No. 1, Jan. 2010
- Giacosa, N.; Zang, C. y Ramiro Galeano, A. (2014). *Oscilaciones electromagnéticas forzadas: análisis del sistema simbólico y lingüístico en libros de texto universitarios*. Revista de Enseñanza de la Física. Vol. 26, n° extra. Dic. 2014
- Henao, B. y Stipcich, M. (2008). *Educación en ciencias y argumentación: la perspectiva de Toulmin como posible respuesta a las demandas y desafíos contemporáneos para la enseñanza de las Ciencias Experimentales*. Revista Electrónica de Enseñanza de las Ciencias Vol. 7 N°1 (2008)
- Toulmin, S. 1958. *The uses of argument*. Cambridge: Cambridge University Press.

# Evaluación de las propiedades funcionales y la capacidad antioxidante de harina de remolacha (*Beta vulgaris*)

## Evaluation of the functional properties and antioxidant capacity of beet flour (*Beta vulgaris*)

R. Masciarelli<sup>1,2</sup>, H. Lucero<sup>1,2</sup>, S. A. Silvester<sup>1,2</sup>, J. Luisetti<sup>1,2</sup>  
1. Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA).  
2. Facultad Regional Rosario-UTN.  
[hectorlucero@hotmail.com](mailto:hectorlucero@hotmail.com)

### Resumen

Se estudió la influencia de las temperaturas de secado (40, 70 y 100 °C) y de diferentes mezclas extractoras etanol/agua, en los parámetros de calidad de la remolacha (*Beta vulgaris*). Se evaluó la relación de rehidratación (RR), de la capacidad de retención de agua (CRA) y del índice de pardeamiento no enzimático (IPNE). La capacidad antioxidante de los extractos, se determinó a partir del contenido de flavonoides totales (CFT), del porcentaje del radical libre DPPH residual (%DPPH\* residual) y de la presencia de los pigmentos betaxantina y la betacianina. Los mayores valores de RR e IPNE se obtuvieron para 100°C y el de CRA para 40°C. Los menores %DPPH\* residual, correspondieron a la mezcla hidroalcohólica 50:50, en las muestras secadas a 40°C. Para dicha mezcla se obtuvo el mayor CFT, para todas las temperaturas de secado. En la mezcla 50:50, se detectaron los pigmentos betaxantina y betacianina, para las temperaturas de 40 y 70°C. Se concluye que la mayor extracción de flavonoides se produjo para la mezcla etanol/agua 50:50, para las tres temperaturas de secado, lo que coincide con los mayores valores de absorbancia obtenidos para la betaxantina y betacianina.

Palabras claves: temperaturas de secado, mezclas etanol-agua, parámetros de calidad, remolacha.

### Abstract

The influence of drying temperatures (40, 70 and 100 °C) and of different ethanol / water extraction mixtures on the beet quality parameters (*Beta vulgaris*) was studied. The ratio of rehydration (RR), water retention capacity (CRA) and non-enzymatic browning index (IPNE) was evaluated. The antioxidant capacity of the extracts was determined from the content of total flavonoids (CFT), the percentage of the free radical DPPH residual (% DPPH \* residual) and the presence of the betaxanthine and betacyanine pigments. The highest values of RR and IPNE were obtained for 100 °C and that of CRA for 40 °C. The lowest residual % DPPH \*, corresponded to the 50:50 hydroalcoholic mixture, in samples dried at 40 °C. For this mixture, the highest CFT was obtained, for all drying temperatures. In the 50:50 mixture, the betaxanthine and betacyanine pigments were detected, for temperatures of 40 and 70 °C. It is concluded that the greatest extraction of flavonoids was produced for the 50:50 ethanol / water mixture, for the three drying temperatures, which coincides with the higher absorbance values obtained for betaxanthine and betacyanin.

Keywords: drying temperatures, ethanol-water mixtures, quality parameters, beet.

### 1. Introducción

En la actualidad, existe un interés creciente en los colorantes obtenidos de fuentes naturales. Esto es debido en parte a la necesidad de ampliar el grupo de los colorantes y en parte a la implicancia de que, al ser naturales, son más seguros. Los colorantes son importantes indicadores de la calidad, ya que determinan la aceptación de los alimentos por parte del consumidor. Últimamente, el mercado para la aplicación de colorantes sintéticos ha disminuido a favor de los colorantes naturales (Fletcher, 2006). Las frutas y verduras son buenas fuentes de colorantes naturales. Sin embargo, estos tienen la

desventaja de su costo superior y de su reducida estabilidad (Herbach, Stintzing y Carle, 2006).

Las betalaínas son los principales pigmentos presentes en la raíz de la remolacha (Delgado y col., 2000). Son derivados del ácido betalámico y responsables de su coloración roja característica. En el área de los alimentos han sido empleados principalmente como colorantes naturales. Estos colorantes son captadores de radicales libres, impidiendo la oxidación de las moléculas biológicas. Tienen efectos antivirales y antimicrobianos (Strack, Vogt y Schliemann, 2003) y también pueden inhibir la proliferación celular de las células tumorales humanas (Reddy, Ruby, Lindo y Nair, 2005). Las betalaínas están constituidas por dos grupos de

estructuras: las betacianinas, de color rojo-violeta, y las betaxantinas, de color amarillo-naranja. (Delgado-Vargas y col., 2000; Stintzing y Carle, 2004). Ambos grupos de moléculas son ópticamente activos ya que poseen dos centros quirales en C-2 y C-15. La diferencia estructural permite la medición espectrofotométrica simultánea del contenido del pigmento sin la necesidad de separación cromatográfica o electroforética.

Los alimentos de origen vegetal son generalmente procesados por métodos térmicos para extender su vida útil, mejorar el sabor y aumentar su palatabilidad. El procesamiento produce cambios significativos en las betalainas. La deshidratación es uno de los métodos más utilizados para la preservación de frutas y verduras. Su principal objetivo es la eliminación de agua hasta el nivel en el que el deterioro microbiano y las reacciones de deterioro se reducen al mínimo. Sin embargo, durante el secado las verduras sufren cambios físicos, estructurales, químicos y nutricionales que pueden afectar a los atributos de calidad como la textura, color, sabor y valor nutricional (Di Scala y Crapiste, 2008). La destrucción del sistema celular es uno de los más importantes cambios físicos y estructurales que se producen durante el secado (Crapiste 2000; Yadollahinia, Latifi y Mahdavi, 2009). El comportamiento en la rehidratación se considera como una medida del daño producido en el material durante el secado, tales como la pérdida de la integridad y la reducción de propiedades hidrófilas, que disminuyen la capacidad de rehidratación (Marques, Prado y Freire, 2009).

La extracción de pigmentos de fuentes vegetales utilizando solventes es un paso importante en la fabricación de suplementos dietarios, nutraceuticos, alimentos funcionales, productos farmacéuticos y cosméticos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de las temperaturas de secado en las propiedades funcionales de la remolacha y el uso de diferentes mezclas de etanol-agua en la extracción de compuestos antioxidantes de la misma.

## 2. Materiales y métodos

Las remolachas se lavaron con una solución acuosa de detergente neutro y enjuagaron con agua corriente tres veces. Con una proporción sólido-líquido de 1:10, fueron hervidas durante 30 min contados a partir de alcanzar el punto de ebullición. Esta operación se realizó a los efectos de reducir la carga microbiana, inactivar a las enzimas responsables del deterioro durante el procesamiento posterior y facilitar los procesos extractivos posteriores

(Delgado-Vargas y col., 2003). Se enfriaron a temperatura ambiente, se pelaron y se cortaron en cubos de  $1 \pm 0,2\text{cm}$ . Se colocaron en baño de solución de cloruro de sodio al 4 % a temperatura ambiente, para fijar los pigmentos (Raupp y col., 2011). Se escurrió el líquido; a posteriori, se embolsaron en film de polietileno y se guardaron en freezer a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Luego, se sometieron a tratamientos de secado mediante estufa de tiro forzado con aire a velocidad constante a las temperaturas: 40, 70 y  $100^{\circ}\text{C}$ . El proceso de secado se continuó hasta alcanzar peso constante. Las humedades finales fueron: 16,8; 15,3 y 14,3% (en base húmeda), respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En la Figura 1. Se muestra el diagrama de bloques del procesamiento de la remolacha.

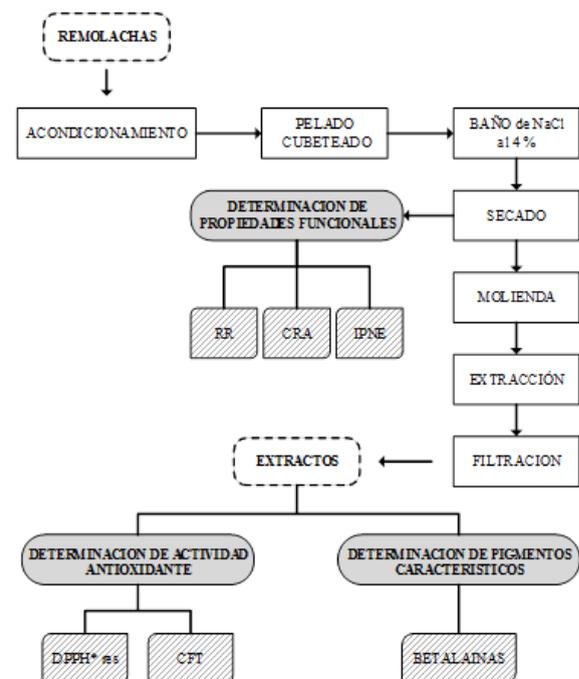


Figura 1. Diagrama de bloques del procesamiento de la remolacha

### 2.1. Propiedades funcionales del producto secado

#### 2.1.1. Análisis de rehidratación

La temperatura de secado afecta la calidad final del producto rehidratado, por lo que se utilizan índices numéricos para observar este efecto. Entre estos indicadores se destacan: la relación de rehidratación (RR) y la capacidad de retención de agua (CRA).

Los trozos de material seco se colocaron en agua destilada a 40 °C durante 6 horas, empleando una relación solido-liquido de 1:50. Luego se drenaron durante 30 segundos y se pesaron. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La RR se calculó de acuerdo a la Ecuación (1), según Vega-Gálvez y col. (2009). La CRA se determinó por centrifugación de las muestras rehidratadas anteriormente, a 3500xg durante 15 minutos a 20 °C. Se escurrió el líquido sobrenadante y se pesó el mismo. La CRA se obtuvo a partir de la Ecuación (2).

$$RR = \frac{W_{reh} * X_{reh} - W_{seca} * X_{seca}}{W_{seca} * (1 - X_{seca})} \quad (1)$$

$$CRA = \frac{W_{reh} * X_{reh} - W_l}{W_{reh} * X_{reh}} * 100 \quad (2)$$

Dónde:  $W_{reh}$  es el peso del material rehidratado;  $X_{reh}$  es la humedad del material rehidratado en base húmeda;  $W_{seca}$  es el peso del material luego del proceso de secado;  $X_{seca}$  es el contenido de humedad del material seco en base húmeda;  $W_l$  es el peso del líquido escurrido luego de la centrifugación.

### 2.1.2. Índice de pardeamiento no enzimático (IPNE)

Ya que las enzimas fueron inactivadas en el tratamiento térmico practicado inicialmente a las remolachas, se aplicó el método propuesto por Vega-Gálvez y col. (2009) para determinar el IPNE. El agua de la rehidratación anterior fue clarificada por centrifugación a 3200xg durante 15 minutos. El sobrenadante se diluyó con igual volumen de etanol al 95 % y se centrifugó nuevamente a 3200xg durante 15 minutos. El IPNE, es decir, la absorbancia a 420 nm de los extractos, se determinó en espectrofotómetro (Jasco 7800 UV-Vis, Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

## 2.2. Preparación de extractos

El material seco obtenido en cada tratamiento fue molido con molino de cuchillas hasta que el material pasó por tamiz malla 40, obteniéndose harina de remolacha. 0.6 g de la misma se extrajeron por agitación con 10 mL de solvente con relaciones etanol-agua de 100:0, 80:20 y 50:50, durante 2 horas, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. Luego, los sólidos se separaron mediante filtración (Whatman N°40). Los extractos (filtrados para cada temperatura y cada solvente) se conservaron a 4°C

en frascos herméticos de vidrio hasta su utilización en la obtención del barrido y las determinaciones analíticas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 2.3. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos

El DPPH\* es un reactivo analítico, en rigor un radical libre capaz de reaccionar con los flavonoides, polifenoles, las betalaina y con los radicales libres presentes o formados durante el tratamiento de secado y se denomina residual ya que del 100% incorporado, queda libre el resto, debido a la no presencia de las sustancias mencionadas (se comportan como radicales libres), las cuales ya fueron neutralizadas.

### 2.3.1. DPPH\* residual

La capacidad antioxidante se determinó evaluando la capacidad de captura de radicales libres mediante el ensayo con DPPH\* utilizando el método espectrofotométrico de Shimada y col. (1992), expresando los resultados como % de DPPH\* residual. Se mezcló 1 mL de cada extracto con 5 mL de una solución metanólica y 0,1 mM de DPPH\*. Luego, se midió la absorbancia a 517 nm mediante un espectrofotómetro (Jasco 7800 UV-Vis, Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). El estándar catequina se utilizó como comparación. El DPPH\* (%), se calculó según:

$$\% DPPH^* residual = 100 - \% DPPH^* \quad (3)$$

$$\% DPPH^* = \left(1 - \frac{A}{A_0}\right) * 100 \quad (4)$$

Dónde: A: absorbancia de la muestra y  $A_0$ : absorbancia del blanco de reactivo.

### 2.3.2. Contenido de flavonoides totales de los extractos

El contenido de flavonoides totales (CFT) se evaluó mediante el método de Kim y col. (2003), con modificaciones aquí introducidas para mejorar la operatividad. A tiempo cero, a 1 mL del extracto se le adicionaron 4 mL de agua bidestilada y 0,3 mL de nitrito de sodio. A los 5 min se le agregaron 0,3 mL de cloruro de aluminio al 3%, a los 6 min, 2 mL de hidróxido de sodio (1M) e, inmediatamente, 2,4 mL de agua bidestilada. La absorbancia de la mezcla se midió a 510 nm contra un blanco de reactivo, utilizando un espectrofotómetro. Los CFT son

expresados en mg de catequina equivalente (CE) / mL de solución.

#### 2.4. Determinación de pigmentos

Se realizaron los barridos de cada uno de los extractos en el rango de longitudes de onda comprendido entre 190 y 1100 nm, utilizando un espectrofotómetro (Shimadzu Modelo UV-1800, Japón). Para la mezcla etanol-agua 50:50, se debió realizar una dilución debido a que los valores de absorbancia obtenidos fueron mayores a 1.

#### 2.5. Análisis estadístico de los resultados

Los datos fueron procesados mediante el software Origin Pro 8 y, para establecer las diferencias significativas de los parámetros en estudio, se empleó análisis ANOVA. El nivel de significación se estableció para un valor  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Propiedades funcionales

En la Figura 2a se muestran los valores de RR en gramos absorbidos de agua/gramos de masa seca, mientras que en la Figura 2b se muestran los valores de CRA en gramos retenidos de agua /100 gramos de agua, para los tratamientos de 40,70 y 100 °C, respectivamente. Generalmente el aumento de la temperatura, produce una disminución de los valores del parámetro de RR y CRA. Esto se debe probablemente el colapso de los tejidos y al daño celular producido por las altas temperaturas del secado, ya que los tejidos dañados, al contraerse por efecto del secado, absorben menor cantidad de agua y no pueden retenerla (Vega- Gálvez et al., 2009). En nuestro caso observamos que los valores de RR a 40 y 70 °C, disminuyen levemente y prácticamente no presentan diferencias significativas, y el mayor valor de RR se presenta a los 100 °C. A su vez, el máximo CRA se da a los 40 °C por lo tanto, las remolachas deshidratadas a esta temperatura retienen grandes cantidades de agua.

El aumento de dichos parámetros a 100 °C, puede atribuirse, probablemente, que a dicha temperatura, con respecto a la de 70 °C, se producen una mayor proporción de compuestos altamente polares (productos de la reacción de Maillard), cuyas interacciones químicas con el agua, aumentan su capacidad de retención, lo que concuerda con los mayores valores de IPNE, como se verá más adelante. Por lo tanto a 70 °C, el tejido resulta menos dañado que a 100 °C, pero obviamente más dañado que a 40 °C.

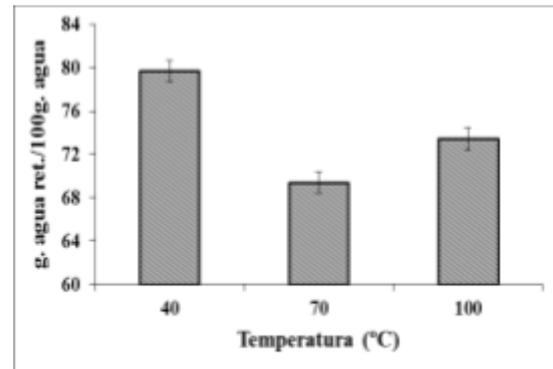
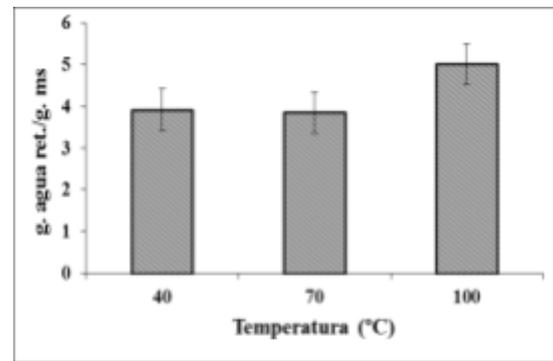


Figura 2. Efecto de la temperatura de secado en cubos de remolacha secados y rehidratados en: (a) la relación de rehidratación (RR) y (b) capacidad de retención de agua (CRA).

Los valores de IPNE se muestran en la Figura 3 para los tratamientos de 40,70 y 100 °C, respectivamente. Se observa que se produce un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del IPNE, para todos los tratamientos con el aumento de la temperatura de secado. Los compuestos de Maillard, a cuya formación se atribuye el pardeamiento no enzimático, si bien tienen propiedades antioxidantes, están asociados a la reducción del valor nutricional de los alimentos.

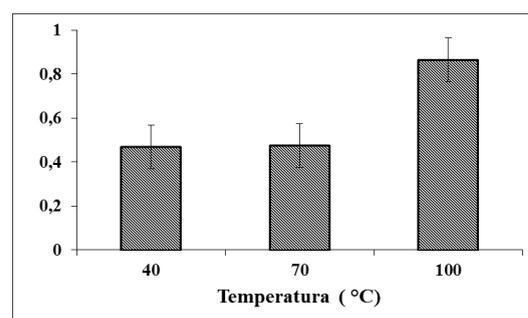


Figura 3. IPNE para tratamientos de 40,70 y 100 °C

#### 3.2. Determinación de la capacidad antioxidante

En la Figura 4a se presentan los valores de DPPH\* residual obtenidos para los diferentes extractos. Se observa que no existen diferencias significativas entre las tres temperaturas para la mezcla (100:0), de la misma manera para el solvente (80:20) para 40 y

70°C. Los extractos a 100°C presentan mayores valores de DPPH\* residual para las mezclas de (80:20) y (50:50), respecto a las otras temperaturas. Para la mezcla (50:50) a 40°C es prácticamente imperceptible el porcentaje de DPPH\* residual. A los efectos comparativos, en estudios sobre pulpa de remolacha, realizando extracciones a 40°C bajo vacío con soluciones acuosas de etanol al 50%, 80% y 100%, Sakac y col. (2004) encontraron valores de DPPH\* residual de 75,92; 81,05 y 84,94 %, para 160 mg de ms /mL, en tanto los valores obtenidos a dicha temperatura para 60 mg de materia seca (ms)/mL en este trabajo resultaron 0,26; 33 y 52 %. El DPPH\* es un radical libre capaz de reaccionar con los flavonoides, las betalainas y con los radicales libres presentes o formados durante el tratamiento de secado. El método utilizado está basado en medir la captura del radical por parte de los extractos con capacidad antioxidante. A medida que aumenta el contenido de compuestos antioxidantes el DPPH\* residual disminuye.

En la Figura 4b, se muestran los resultados obtenidos del contenido de flavonoides totales en función del solvente utilizado, para las diferentes temperaturas de secado. La mayor extracción de flavonoides se produjo para el solvente de concentración etanol- agua 50:50 y a la temperatura de secado de 70 °C. Asimismo, se puede observar que, al utilizar un solvente con mayor cantidad de agua, el contenido de flavonoides extraídos se incrementa. Con respecto a la temperatura, tanto en la remolacha secada a 40°C como a 100°C se obtuvo una menor cantidad de flavonoides respecto a la muestra de 70°C, siendo mínima con la de 100°C. Utilizando como solvente etanol puro, prácticamente no se observan diferencias significativas para las tres temperaturas de secado. A los efectos comparativos, a los efectos comparativos, Ciappini y col. (2013) obtuvieron valores de CFT para mieles de trébol, eucalipto y alfalfa comprendidos entre 0.0072 y 0.0037 mg de CE/mL. Dichos autores realizaron extracciones acuosas utilizando una relación de solido/liquido de 100 mg/mL. Mientras que en el presente trabajo utilizamos una relación de 60 mg/mL y se obtuvieron los siguientes valores máximos: 0.122, 0.1543 y 0.072 mg de CE/mL para 40,70 y 100 °C, respectivamente, empleando una solución hidroalcohólica 50:50.

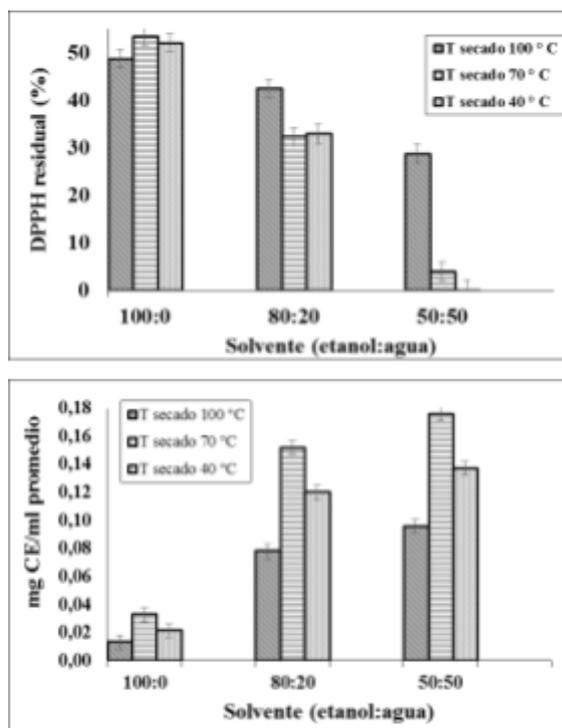


Figura 4. Determinación de: (a) DPPH\* residual y (b) Contenido de flavonoides totales

### 3.3. Barrido espectrofotométrico

En las Figuras 5a, 5b y 5c, se presentan los barridos obtenidos con las diferentes muestras de remolacha. Todas las muestras presentan un pico predominante alrededor de  $\lambda=280$  nm, el cual se puede asociar a la presencia de proteínas, según Franco Zabaleta (2004). Se puede observar que al utilizar el solvente que contiene etanol puro, no se evidencia ningún otro pico. Por el contrario, con las demás mezclas de solventes, se obtuvieron picos que se asocian a la presencia de betalainas. Las betaxantinas se identifican a  $\lambda=480$  nm y las betacianinas a  $\lambda=538$  nm, correspondiéndose a los picos observados.

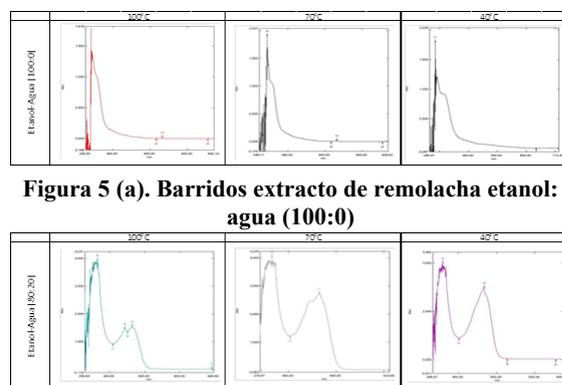
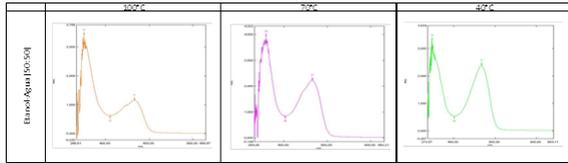


Figura 5 (a). Barridos extracto de remolacha etanol: agua (100:0)

Figura 5 (b). Barridos extracto de remolacha etanol: agua (80:20)



**Figura 5 (c). Barridos extracto de remolacha etanol: agua (50:50)**

A menor temperatura de secado la presencia de betalainas es mayor según puede observarse en las Figuras 5b y 5c. Asimismo, con una relación de solvente al 50:50, se obtiene el mayor contenido de pigmentos.

#### 4. Conclusiones

Con referencia a los parámetros de calidad, se produce un incremento del IPNE para todos los tratamientos con el aumento de temperatura de secado. Ello coincide con la evaluación del DPPH\* residual, que nos señala la formación de compuestos de Maillard con manifiesta capacidad antioxidante en particular a 100°C. Con respecto a los otros tratamientos, los menores valores del IPNE y los valores análogos del DPPH\* residual, se atribuyen a la escasa formación de los compuestos de Maillard, prevaleciendo aquellos compuestos antioxidantes naturalmente presentes en la remolacha.

La mayor extracción de flavonoides se produjo para el solvente de concentración etanol-agua al 50:50 para las tres temperaturas de secado, que coincide con los mayores valores de absorbancia obtenidos de las betalainas. Se considera que esto se debe a la alta capacidad polar tanto de los pigmentos como de los solventes. El menor porcentaje de DPPH\* residual para el solvente de concentración etanol-agua al 50:50 a 40°C está de acuerdo con una alta presencia de antioxidantes naturales como son los flavonoides y las betalainas.

Debido a que se realizaron extracciones etanólicas, en trabajos futuros se propone obtener extractos concentrados de remolacha en estado viscoso mediante evaporación bajo vacío, destacándose que no se emplearán solventes tóxicos en ningún punto del procesamiento. Luego, estos concentrados de remolacha podrían emplearse como prebióticos para reforzar la capacidad antioxidante de distintos alimentos.

#### 5. Referencias

Ciappini, M.C. Sttopani, S.F.Martinet, R. Alvarez M.B. (2013). Antioxidant activity and content of phenolic and flavonoids compounds in clovers, eucalyptus and lucerna honeys. *Revista Ciencia y Tecnología*, 15, n° 19, 45-51.

Crapiste, G. H. (2000). Simulation of drying rates and quality changes during dehydration of foodstuffs. In J. E. Lozano, M. C. Añón, E. Parada Arias, & G. V.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173–289.

Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R. and Paredes-López, O. (2003). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains, characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical Reviews in food Science and Nutrition*, 40: 173-289.

Di Scala, K. C., & Crapiste, G. H. (2008). Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *LWT: Food Science and Technology*, 41(5), 789–795.

Fletcher, A. (2006). Lycopene colorant achieves regulatory approval. [foodnavigator.com/news](http://foodnavigator.com/news).

Franco Zavaleta, M. E. (2004). Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (*Escontriachiotilla*), una cactácea subexplotada. México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation-Structural and chromatic aspects. *Journal of Food Science*, 71, R41–R50.

Kim, D., Jeoung, S., Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321-326.

Ruth, D.W.; Chany, P.S. (1999). *Relationship of Diffuse to Total Radiation in Canada*, *Solar Energy* 18 (1), 153-156.

Smith, J.P. (1990). *Handbook of Non Conventional Energy*, 2ª ed., 2358. Brooks Publishers, Londres, Inglaterra

Soares, M.E. y otros tres autores, (1983). *Process Calculations Using Equation of State In Chem. Thermodynamics* by N. Newman, pp 257-267. Ann Arbor Sci. Publishers, Michigan. USA.

Kong, S.Y.; Kugai, R.J. (2003). *Binary Diffusion Coefficients for Fatty Acids in Supercritical CO<sub>2</sub>*, 6th European Congress on Supercritical Fluids, 132-138, Tours, Francia Sept. 46.

Alarcón, R. (2003). *Determinación de Difusividades de Gases a Alta Presión en Sólidos Porosos*, Tesis de Grado, Dpto. Ing. Mecánica, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

# Levaduras vínicas autóctonas: potencial fuente de prebióticos para formular alimentos funcionales.

## Native wine yeasts: potential source of prebiotics to formulate functional foods.

María Silvina Cabeza<sup>1,2</sup>, Cecilia Adriana Flores<sup>1</sup>, Susana Gisela Ferreyra<sup>1</sup>, Carolina Adriana Herrera<sup>1</sup>, Mónica Alejandra Morant<sup>1</sup>, Sara Mabel Evangelista<sup>1</sup>, Marcela Paula Sangorrín<sup>3,4</sup>, Alicia Lucía Ordoñez<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. CONICET. 3. PROBIEN. 4. CONICET-UNCo  
mscabeza@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

En el presente trabajo se presenta la obtención de prebióticos: paredes celulares,  $\beta$ -glucanos y manoproteínas, a partir de levaduras vínicas autóctonas. La identificación de las levaduras se realiza mediante ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP y RFLP del ADN mitocondrial, para asegurar que son microorganismos GRAS. Para optimizar la producción de biomasa, se ensayó el efecto de 5 variables en las condiciones de cultivo (fuente de carbono: glucosa (2%) ó glicerol (3%); agitación: 0 y 100 rpm; temperatura: 28 y 37°C; pH del medio: 4 y 5; levadura: 8A-9 y 13A-5). Se obtuvieron paredes celulares mediante diferentes técnicas de desintegración celular: autólisis, ruptura mecánica (perlas cerámicas), ultrasonido, congelado-descongelado, hidrólisis con NaCl al 4% ó NaOH 0,1 N. Las manoproteínas fueron separadas por extracción térmica. Se analizaron 2 técnicas de extracción de  $\beta$ -glucanos: álcalis-ácido y álcalis. Se hidrolizaron las muestras para estudiar la concentración de azúcares reductores (DNS) y glucosa (ensayo enzimático). Se cuantificaron proteínas mediante la técnica de Bradford. La utilización de glucosa como fuente de carbono y temperatura de 28°C aumentó la obtención de biomasa; no se observaron diferencias significativas al evaluar las otras variables. Los tratamientos de ultrasonido y autólisis fueron elegidos para romper las células, lo que se verificó mediante observación en microscopio y azul de metileno. La mayor proporción de  $\beta$ -glucanos se alcanzó partiendo de levaduras autolizadas, a diferencia de las manoproteínas, donde su extracción se vio favorecida a partir de levaduras tratadas con ultrasonido. Se concluye que se debe emplear distinta ruptura celular dependiendo del producto deseado.

Palabras clave: levaduras vínicas autóctonas, paredes celulares de levaduras,  $\beta$ -glucanos, manoproteínas.

### Abstract

This paper presents prebiotics obtention: cell walls,  $\beta$ -glucans and mannoproteins, from native wine yeasts. The identification of yeasts is done by ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP and RFLP of mitochondrial DNA, to ensure that microorganisms are GRAS. To optimize biomass production, the effect of 5 variables on culture conditions was tested (carbon source: glucose (2%) or glycerol (3%); stirring: 0 and 100 rpm; temperature: 28 and 37°C; pH of the medium: 4 and 5; yeast: 8A-9 and 13A-5). Cell walls were obtained by different cell disintegration techniques: autolysis, mechanical rupture (ceramic beads), ultrasound, frozen-thawed, hydrolysis with 4% NaCl or 0.1 N NaOH. Mannoproteins were separated by thermal extraction. Two techniques for the extraction of  $\beta$ -glucans were analyzed: alkali-acid and alkali. Samples were hydrolyzed to study the concentration of reducing sugars (DNS) and glucose (enzymatic assay). Proteins were quantified using Bradford technique. The use of glucose as source of carbon and a temperature of 28°C increased the obtaining of biomass; no significant differences were observed when evaluating the other variables. The ultrasound and autolysis treatments were chosen to break the cells, which was verified by microscopic observation and methylene blue. The highest proportion of  $\beta$ -glucans was achieved starting from autolysed yeasts, unlike mannoproteins, where their extraction was favored from yeasts treated with ultrasound. It is concluded that different cell rupture should be used depending on the desired product.

Keywords: native wine yeasts, yeast cell walls,  $\beta$ -glucans, mannoproteins.

### 1. Introducción

Los prebióticos son ingredientes no digeribles de alimentos que afectan la salud del hospedador humano por estimulación selectiva de microorganismos potencialmente beneficiosos, es decir, modificando la composición de la microbiota del intestino (Duncan *et al.*, 2003; Roberfroid, 2001). Pueden reducir el crecimiento de organismos patogénicos o virulentos e inducir efectos que promuevan la salud (Duncan *et al.*, 2003). Para ser

más efectivos, deben ser capaces de alcanzar el intestino largo y ser utilizados específicamente por aquellos microorganismos que promueven efectos probados en la salud (Macfarlane y Cummings, 1999). Algunos ejemplos: mananoligosacáridos, lactosa, galactoglucomanos, oligofructosa, inulina. Muchos son carbohidratos, principalmente cadenas cortas de 3 a 10 unidades de monosacáridos, derivados de plantas o componentes de paredes celulares de levaduras.

La pared celular de levadura (15-30% del peso seco de la misma), constituida principalmente por fibra dietética insoluble en agua:  $\beta$ -glucano y  $\alpha$ -manano (prebiótico), y de proteína digerible unida al  $\alpha$ -manano (manoproteínas), también considerada un componente beneficioso para la salud. Las paredes celulares de levadura pueden reducir el colesterol (Hitomi *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Htwe *et al.*, 2008), mejorar la hiperlipidemia (Hitomi *et al.*, 2002b), aumentar la actividad antioxidante (Jaehrig *et al.*, 2007), modificar la respuesta biológica del huésped, estimulando mecanismos de defensa del sistema inmune, frenando todo cambio producido por una agresión bacteriana, viral y fúngica (Swamy *et al.*, 2003; Akay y Dawson, 2003; Romero y Gómez Basauri, 2003). El mecanismo de acción de los mananoglicósidos en la aglutinación de bacterias con fimbrias tipo 1, como *Salmonella* y *E. coli*, produce el bloqueo de la colonización y proliferación de estas poblaciones en el intestino (Bahurhoo *et al.*, 2007; Borowsky *et al.*, 2009).

La pared celular tiene una estructura dinámica que puede adaptarse a cambios fisiológicos y morfológicos. Además, se activan mecanismos compensatorios en la pared celular en respuesta a agentes perturbadores o mutaciones de la pared celular, lo que le permite remodelar la pared celular para combatir la lisis celular (Orlean, 1998; Klis *et al.*, 2002). El control de la composición de la pared celular podría ser relevante para propósitos tecnológicos, como en la producción de  $\beta$ -glucanos y mananos para producción de alimentos u otros (Donzis, 1996; Jozef *et al.*, 1999). Las condiciones de crecimiento afectan la composición de esa pared celular.

Los alimentos suplementados con manoproteínas inhiben la colonización por *Salmonella* y otras bacterias intestinales en animales (Ishihara *et al.*, 2000; Czerucka *et al.*, 2007; Naughton *et al.*, 2000). Las manoproteínas son todavía poco utilizados en la industria alimentaria, pese a su fácil obtención, bajo costo y numerosas propiedades. Algunas posibles aplicaciones tecnológicas e industriales: control de patógenos en la industria cárnica y avícola, aumento de la respuesta inmune y mejoras en la digestión y absorción de nutrientes en animales destinados al consumo humano, mejora de diversas características organolépticas del vino y diversos procedimientos enológicos (Gañán *et al.*, 2008). Extractos de manoproteínas obtenidos a partir de levaduras vínicas reducen significativamente la colonización de células intestinales por *Campylobacter* spp. (Gañán *et al.*, 2009). Los mananos no alteran sus propiedades por el calor, mejoran la viscosidad de preparaciones y pueden usarse como agentes ligantes en productos que contienen almidón (Wagner *et al.*, 2008).

Los  $\beta$ -glucanos de las levaduras presentan largas cadenas de glucosa con uniones  $\beta$ -(1-3) y (1-6) (Gardiner, 2004). Son ingredientes funcionales muy

valorados y existen varias técnicas para su extracción. La elección de la técnica de extracción apropiada es importante porque afecta la calidad, estructura, propiedades reológicas, peso molecular y otras propiedades funcionales del producto. Pueden aplicarse en varias matrices de alimentos (Ahmad *et al.*, 2012). Como función tecnológica (aditivos alimentarios), los  $\beta$ -glucanos obtenidos de levaduras pueden utilizarse en alimentos como espesantes, ligantes de agua y agentes ligantes de aceite, estabilizantes de emulsiones y como sustitutos de grasas, entre otras (Lee, 2002; Jong, 2002; Thammakiti *et al.*, 2004). Varios estudios indican la efectividad de los  $\beta$ -glucanos frente a varias enfermedades y desórdenes: tendencia a reducir el cáncer colorrectal (Dongowski *et al.*, 2002), evitan la constipación (Odes *et al.*, 1993), reducen el índice glucémico y los niveles de colesterol sérico (Delaney *et al.*, 2003), previenen enfermedades coronarias (Jinshui *et al.*, 2002), entre otros.

El trabajo se enfoca en obtener ingredientes de origen regional (a partir de levaduras ecotípicas de San Rafael) con propiedades funcionales (prebióticas) que permitan dar valor agregado a materias primas regionales y contribuir a la salud humana, reforzando el potencial económico de la región.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Análisis molecular para identificación de levaduras y discriminación de cepas

Se identificarán mediante biología molecular (ITS1-5.8S-ITS2 PCR-RFLP y RFLP de ADN mitocondrial) las levaduras empleadas con el objetivo de asegurar que se trata de microorganismos GRAS.

La identificación taxonómica de las levaduras autóctonas se realizó por análisis del polimorfismo en los tamaños de los fragmentos obtenidos por restricción (RFLP) con endonucleasas específicas de la región génica ITS1-ADNr 5.8S-ITS2, previamente amplificada por PCR, como describe Esteve-Zaroso *et al.* (1999). La identificación de las levaduras se realizó comparando los tamaños de los amplificadores y de los fragmentos de restricción obtenidos experimentalmente con aquellos reportados en la base de datos [www.yeast-id.com](http://www.yeast-id.com) para cepas tipo de colección.

Por otra parte, se analizaron patrones de mtADN-RFLP para todos los aislados identificados como pertenecientes al género *Saccharomyces*. La extracción de ADN total se realizó de acuerdo a Querol *et al.* (1992) modificado por López *et al.* (2001). El ADN total de las levaduras fue digerido con enzima de restricción HinfI (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y los fragmentos se separaron en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo TAE (Tris-acetato-EDTA).

### 2.2 Obtención de biomasa de levaduras vínicas autóctonas:

Se realizó una prueba rápida para determinar las variables significativas que afectan la obtención de biomasa de levaduras. Se estudió el efecto de 5 variables, en dos niveles cada una, utilizando un diseño estadístico factorial completo (25 ensayos), basado en los trabajos de Bzducha-Wróbel *et al.* (2013, 2015) y Aguilar-Uscanga y François (2003):

- Temperatura de incubación: 28 y 37°C
- pH del medio de cultivo: 4 y 5
- Agitación: sin agitación y a 100 rpm
- Fuente de carbono: glucosa (2%) ó glicerol (3%)
- Levadura empleada: 8A-9 y 13A-5

### 2.3 Extracción de paredes celulares de levaduras.

Las células se resuspendieron y se lisaron mediante 6 métodos diferentes:

- Autólisis: 55°C y pH 5,0 durante 24 h (Thanardkit *et al.*, 2002). Luego, se lleva el autolisado a 80°C durante 15 minutos para inactivar las enzimas endolíticas (Varelas *et al.*, 2016)
- Ruptura mecánica: con esferas cerámicas de 1/4" y ultrasonido, en 3 ciclos de 7 minutos de trabajo y 7 minutos de descanso (modificado de Bzducha-Wróbel *et al.*, 2015)
- Ultrasonido: se prepara una suspensión de levaduras en pH 7 y se lo trata en el lavador ultrasónico (Testlab –potencia ultrasónica: 80 W, frecuencia: 40 Hz) durante 14 minutos. Luego se lo lleva a 121°C durante 1,5 hs (modificado de Tam *et al.*, 2013)
- Hidrólisis con una solución salina hipertónica: la suspensión de levaduras se trata con NaCl al 4% y se las deja a 45°C durante 24 horas (Giraudó *et al.*, 2009)
- Hidrólisis con NaOH 0,1 N: la suspensión de levaduras es tratada con la base hasta pH 9,25 y se las deja a 45°C durante 24 horas (Giraudó *et al.*, 2009)
- Congelado-descongelado: se llevó la suspensión de levaduras en agua a -40°C durante 24 hs. Y posteriormente se lo descongela a temperatura ambiente.

Para la separación de la pared celular, se homogeniza la suspensión acuosa de levaduras, se centrifuga posteriormente (13.000 rpm/4°C/10 min) y se lava dos veces con agua destilada para retirar los componentes del citosol (insoluble: pared celular y soluble: extracto de levadura). Se asume que los precipitados obtenidos por centrifugación contienen la pared celular de levaduras.

La efectividad de la obtención de paredes celulares y su purificación de los componentes citosólicos fue observada al microscopio por tinción con azul de metileno (Bzducha-Wróbel, 2014).

## 2.4 Caracterización de los ingredientes y/o principios activos la pared celular de la levadura.

### 2.4.1 Manoproteínas:

Las manoproteínas son obtenidas por extracción térmica. Para ello, se prepara una suspensión de pared de levaduras (pH 7,2), y se calienta a 80-85°C en un baño termostático con agitación durante 24 h. Se centrifuga a 13.000 g durante 10 min y 4°C (Gañán *et al.*, 2009).

### 2.4.2 $\beta$ -Glucanos:

Los  $\beta$ -Glucanos se obtienen por dos métodos diferentes, con el objetivo de determinar cuál es el más efectivo.

A – Alcalino: 5 volúmenes de NaOH 1 N a 90°C por 2 h (Suphantharika *et al.*, 2003). Enfriar a temperatura ambiente.

B – Álcis-Ácido: 5 volúmenes de 1,0 N NaOH a 80±5°C por 2 h, seguido de 5 volúmenes de 0,5 N Ácido acético a 75±5°C por 1 h (Thammakiti *et al.*, 2004).

Los preparados de manoproteínas y los de  $\beta$ -Glucanos, se centrifugan a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante. El residuo se lava 3 veces y se recuperó por centrifugación.

### 2.5 Determinación de proteínas, azúcares reductores y glucosa

Los precipitados obtenidos se secaron en estufa a 30°C durante 24 hs.

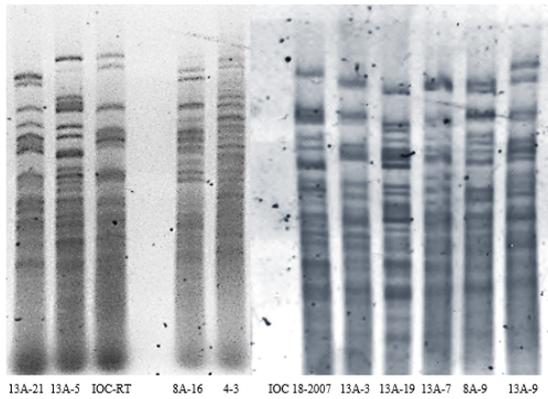
Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (1976) empleando suero albúmina bovina como patrón.

Para la cuantificación de azúcares y glucosa, se realiza una hidrólisis previa por adición de 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta que la concentración de muestra sea 2 mg/ml durante 24 h a 50°C. Luego se neutraliza con 2 M NaOH (Javmen *et al.*, 2012). Se determina la concentración de azúcares reductores con DNS (Miller *et al.*, 1959) utilizando glucosa como estándar; y glucosa por el método de glucosa oxidasa (GOD-PAP, GT Lab).

## 3. Resultados y Discusión

### 4.1 Identificación molecular de levaduras vínicas autóctonas

Se estudiaron 56 cepas de levaduras vínicas autóctonas de la región vitícola San Rafael aisladas anteriormente como *Saccharomyces* por las características macroscópicas desarrolladas en medio WL. Se confirmó que pertenecían a este género mediante los patrones de restricción generados de la región interna entre ITS 1 y 2 y el gen rRNA 5.8S y YeastID.com como base de datos. Mediante RFLP del ADN mitocondrial se identificaron las cepas diferentes de *Saccharomyces* autóctonas, determinadas por poseer un perfil de restricción diferente, como puede observarse en la Figura 1.



**Figura 1. Perfiles de restricción de RFLP del ADN mitocondrial de levaduras vínicas autóctonas y levaduras comerciales**

#### 4.2 Biomasa

Distintos investigadores han observado que el uso de medio de cultivo con 2-3% de glicerol aumentaba la cantidad de  $\beta$ -(1,3/1,6)-glucano e intensificaba la biosíntesis de manoproteínas en la pared celular de levaduras. Esto se debe a una adaptación de las células al medio ambiente y al mismo tiempo señala diferente estructura de la pared en células procedentes de diversos cultivos. La respuesta de las células en diferentes condiciones de cultivo parece ser una característica individual de cada cepa, dependiendo de la concentración de glicerol y el pH del medio utilizado (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2013). El incremento del espesor de la capa de manoproteínas en levaduras cultivadas en medio con la adición de glicerol se debería a la biosíntesis de glicoproteínas necesarias durante el metabolismo del glicerol y la regulación de los cambios de la presión osmótica causados por la fuente de carbono. Las manoproteínas sirven de protección a las células de levadura frente al estrés osmótico (Bzducha-Wróbel *et al.*, 2015).

Aguilar-Uscanga y François (2003) encontraron mayor velocidad de crecimiento, cantidad de quitina, de  $\beta$ -glucanos totales y relación  $\beta$ -1,6-glucano/glucano total cuando la levadura crecía a 37°C.

Los resultados obtenidos durante el ensayo se registraron en la Tabla 1:

**Tabla 1. Análisis de Varianza para Biomasa - Suma de Cuadrados Tipo I**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A: Agitación	0,0011	1	0,0011	0,01	0,9073
B: Fuente de Carbono	1,7340	1	1,7340	22,43	<b>0,0001</b>
C: Levadura	0,0336	1	0,0336	0,43	0,5155
D: pH	0,0183	1	0,0183	0,24	0,6308
E: Temperatura	2,5634	1	2,5634	33,16	<b>0,0000</b>
RESIDUOS	2,0102	26	0,0773		

TOTAL (corregido)	6,3606	31			
-------------------	--------	----	--	--	--

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ , con un 95,0% de nivel de confianza) en la obtención de biomasa cuando se utilizó diferente fuente de carbono y temperatura. En oposición a lo anteriormente expuesto, ambas levaduras no fueron capaces de crecer a 37°C y prefirieron como fuente de carbono a la glucosa. De acuerdo a estos resultados, se decide proseguir los estudios empleando los siguientes parámetros: temperatura de incubación: 28°C; pH del medio de cultivo: 5; sin agitación; fuente de carbono: glucosa (2%); levadura empleada: 13-A-5.

#### 4.3 Extracción de pared

La localización de  $\beta$ -glucanos en la estructura de la pared celular requiere su disrupción lo que habilita a la producción de paredes celulares y luego al aislamiento del polímero buscado. La pérdida de manoproteínas no afectaría la integridad de la pared, sino más bien su porosidad (Hernawan y Fleet, 1995). La observación directa en microscopio permite estimar el número de células lisadas o desintegradas.

En la Figura 2 se observan diferencias en la cantidad y en el tamaño de levaduras muertas (inferior al de las células vivas) según el tratamiento de disrupción celular. La reducción del tamaño se debe a que las levaduras han perdido su citoplasma porque sus paredes están dañadas.

Al utilizar el método de congelación-descongelación, pese a que se trabajó a muy baja temperatura, prácticamente no se obtuvieron paredes de levaduras, lo que puede ser atribuido a que sólo se realizó un ciclo de congelado-descongelado.

El método de ruptura mecánica tampoco fue efectivo. Probablemente las perlas cerámicas empleadas son muy grandes (0,625 cm) para el objetivo propuesto y el método de agitación empleado no sea el más apropiado (ultrasonido de baja frecuencia).

La autólisis no afecta las paredes celulares pero es útil para descartar las sustancias intracelulares durante la preparación de las paredes celulares. El tratamiento con agua caliente (en nuestro caso, ultrasonido seguido de autoclave) provoca un aumento significativo de la pared celular mientras que las células tienen mucho menor tamaño (Liu *et al.*, 2008).

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, se eligieron 2 métodos de disrupción celular: ultrasonido y autólisis para proseguir el estudio y determinar la mejor técnica de extracción de  $\beta$ -glucanos y de manoproteínas.

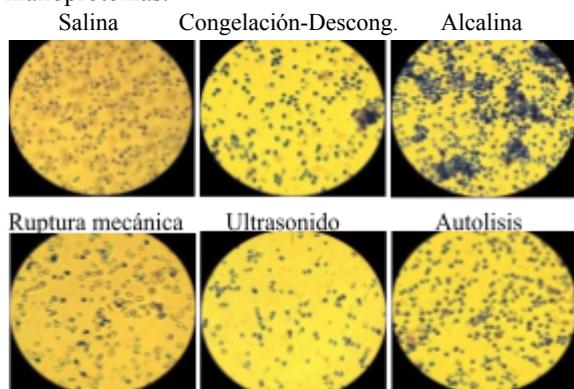


Figura 2. Distintas metodologías de disrupción celular vistas en microscopio (1000X)

#### 4.4 Caracterización de los ingredientes y/o principios activos la pared celular de la levadura

Varelas *et al.* (2015) reportan que todos los métodos y patentes publicadas para la extracción de  $\beta$ -glucanos de la pared celular de levaduras se basan en la misma idea, primero, obtener las paredes celulares de levaduras y luego debe quitarse gradualmente los otros componentes de la pared celular. Las diferencias radican en las técnicas aplicadas en la disrupción y la extracción para la producción de  $\beta$ -glucano. La elección del método apropiado depende de la combinación de parámetros tales como el uso adicional de  $\beta$ -glucano soluble o insoluble producido (incorporación en medicamentos y alimentos funcionales), la pureza, el rendimiento, el costo, el tiempo, el equipo necesario, etc. Las lías de vino y la levadura de cerveza agotada tras la finalización de la fermentación alcohólica se pueden utilizar para la producción de  $\beta$ -glucano de levadura.

La mayor presencia proteínas se observa en las paredes de levadura obtenidas por autólisis (Tabla 2). Sin embargo, el tratamiento de extracción de manoproteínas más efectivo se advierte partiendo de paredes de levadura obtenidas con ultrasonido, eligiéndose esta técnica para estudios posteriores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bzducha *et al.* (2014). No hay diferencias significativas en las muestras de  $\beta$ -glucano, exhibiendo valores cercanos a 0  $\mu\text{g}/\text{mg}$  muestra, resultado esperable.

En relación a azúcares reductores y glucosa, la mayor cantidad se encuentra en las muestras de  $\beta$ -glucano, lo que demostraría una buena obtención de este polisacárido de glucosa. Para ambas técnicas

de extracción, se observaron mejores resultados al emplear paredes celulares obtenidas por autólisis. Bzducha *et al.* (2014) también observaron que el tratamiento con autoclave conduce a una pérdida de parte de los  $\beta$ -glucanos solubles bajo tales condiciones.

Tabla 2. Caracterización de los productos obtenidos

	Azúcares reductores (mg Glu/mg muestra)		Glucosa (mg/mg muestra)		Proteína (mg/mg muestra)	
	Media	GH	Media	GH	Media	GH
PCL Autólisis	0,047	X X	0,023	X	15,97	X
PCL Ultrasonido	0,045	X X	0,176	X X	9,23	X
M Autólisis	0,059	X	0,073	X	7,33	X
M Ultrasonido	0,041	X	0,216	X X	14,14	X
$\beta$ -g técnica a Autólisis	0,187	X	0,215	X X	0	X
$\beta$ -g técnica a Ultrasonido	0,037	X	0,098	X X	0,88	X
$\beta$ -g técnica b Autólisis	0,172	X	0,268	X	0,86	X
$\beta$ -g técnica b Ultrasonido	0,054	X X	0,081	X	0,06	X

GH: Grupos homogéneos; PCL: Pared celular de levadura; M: Manoproteína;  $\beta$ -g:  $\beta$ -glucano

#### 4. Conclusiones

Se identificaron distintas cepas de levaduras vínicas autóctonas del género *Saccharomyces*, asegurando que se trabajaba con microorganismos GRAS.

Se optimizaron las condiciones de cultivo para obtención de mayor cantidad de biomasa: 28°C; pH: 5; sin agitación; fuente de carbono: glucosa (2%); levadura empleada: 13-A-5.

Se logró obtener paredes celulares utilizando diferentes técnicas de desintegración celular, eligiendo como más adecuadas ultrasonido y autólisis.

Se extrajeron los ingredientes funcionales buscados con elevado grado de rendimiento.

Se debe emplear distinta metodología de ruptura celular de las levaduras de acuerdo al ingrediente funcional que se desee obtener:  $\beta$ -glucano o manoproteína.

#### 5. Referencias

Aguilar-Uscanga, B.; François, J.M. (2003). *A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of*

- cultivation, *Letters in Applied Microbiology*, 37, 268-274.
- Ahmad, A.; Anjum, F.M.; Zahoor, T.; Nawaz, H.; Dilshad S.M.R. (2012). *Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 201-212.
- Akay, V.; Dawson, D. (2003). *Mycotoxins and milk safety*, *Proceeding of Alltech 19th Annual Symposium*.
- Baurhoo, B.; Phillip, L.; Ruiz-Feria, C.A. (2007). *Effects of purified lignin and mannanoligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens*, *Poultry Science*, 86, 1070-1078.
- Borowsky, L.; Corção G.; Carsoso M. (2009). *Mannan oligosaccharide agglutination by Salmonella enterica strains isolated from carrier pigs*, *Braz. J. Microbiol.*, 40 (3), 458-464.
- Bradford, M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding*, *Anal. Biochem.*, 72, 248-255.
- Bzducha-Wróbel, A.; Błażej, S.; Kawarska, A.; Stasiak-Róžańska, L.; Gientka, I.; Majewska, E. (2014). *Evaluation of the Efficiency of Different Disruption Methods on Yeast Cell Wall Preparation for  $\beta$ -Glucan Isolation*, *Molecules*, 19, 20941-20961.
- Bzducha-Wróbel, A.; Błażej, S.; Molenda, M.; Reczek, L. (2013). *Biosynthesis of  $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucans of cell wall of the yeast *Candida utilis* ATCC 9950 strains in the culture media supplemented with deproteinated potato juice water and glycerol*, *Eur. Food Res. Technol.*, 240, 1023-1034.
- Bzducha-Wróbel, A.; Kieliszek, M.; Błażej, S. (2013). *Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source*, *Eur. Food Res. Technol.*, 237, 489-499.
- Czerucka, D.; Piche, T.; Rampal, P. (2007). *Yeast as probiotics*, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 26 (6), 767-778.
- Delaney, B.; Nicolosi, R.J.; Wilson, T.A.; Carls, T.; Frazer, S.; Zheng, G.H.; Hess, R.; Ostergren, K.; Haworth, J.; Knutson, N. (2003).  *$\beta$ -Glucan fractions from barley and oats are similarly antiatherogenic in hypercholesterolemic Syrian golden hamsters*, *J. of Nutr.*, 133, 468-475.
- Dongowski, G.; Huth, M.; Gebhardt, E.; Flamme, W. (2002). *Dietary fiber rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats*, *J. of Nutr.*, 132, 3704-3714.
- Donzis, R.A. (1996). *Substantially purified beta (1,3) finely ground yeast cell wall glucan composition with dermatological and nutritional uses*, US Patent 5576015.
- Duncan, S.H.; Scott, K.P.; Ramsay, A.G.; Harmsen, H.J.M.; Welling, G.W.; Stewart, C.S.; Flint, H.J. (2003). *Effects of alternative dietary substrates on competition between human colonic bacteria in an anaerobic fermentator system*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1136-1142.
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. (1999). *Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers*, *Int J. Syst. Bacteriol.*, 49, 329-337.
- Gañán, M.; Carrascosa, A.V.; Martínez-Rodríguez, A. (2008). *Manoproteínas derivadas de la pared celular de levaduras y su aplicación en la industria alimentaria*, *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 396, 70-74.
- Gañán, M.; Carrascosa, A.V.; De Pascual-Teresa, S.; Martínez-Rodríguez, A.J. 2009. *Inhibition by Yeast-Derived Mannoproteins of Adherence to and Invasion of Caco-2 Cells by *Campylobacter jejuni**, *Journal of Food Protection*, 72 (1), 55-59.
- Gañán Martínez-Ballesta, M. (2009). *Estudio de diferentes estrategias encaminadas a la disminución de la incidencia de *Campylobacter* spp. en la cadena alimentaria*, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Gardiner, T. (2004). *Beta-glucan biological activities: A review*, 1-39- Accessed on August 7, 2005 from Internet: [www.usa.glycoscience.com](http://www.usa.glycoscience.com).
- Giraud, M.; Vicente, F.; Scollo, D.; Ugarte, M.; Kulhawiuk, D.; Fomicz, S.; Mora, V. (2009). *Determinación de glucomanos en pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por electroforesis capilar de zona*, *ACE: Revista de enología*, 104.
- Hernawan, T.; Fleet, G. (1995). *Chemical and cytological changes during the autolysis of yeast*, *J. Ind. Microbiol.*, 14, 440-450.

- Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Mizutani, M.; Nakamura, T.; Shirasu, Y. (2002). *Effects of brewer's yeast cell wall on fecal steroid excretion in rats*, J. Oleo Sci., 51, 335-346.
- Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Mizutani, M.; Nakamura, T.; Shirasu, Y. (2002b). *Effects of brewer's yeast cell wall on serum lipid levels in rats fed a high cholesterol and fat diet*, J. Oleo Sci., 51, 141-144.
- Htwe, K.; Yee, K.S.; Tin, M.; Vandenplas, Y. (2008). *Effect of Saccharomyces boulardii in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study*, Am. J. Trop. Med. Hyg., 78, 214-216.
- Ishihara, N.; Chu, D.C.; Akachi, S.; Juneja, L.R. (2007). *Preventive effect of partially hydrolyzed guar gum on infection of Salmonella enteritidis in young and laying hens*, Polt. Sci., 79, 689-697.
- Jaehrig, S.C.; Rohn, S.; Kroh, L.W.; Fleischer, L.G.; Kurz, T. (2007). *In vitro potential antioxidant activity of (1-N3), (1-N6)-b-D-glucan and protein fractions from Saccharomyces cerevisiae cell walls*, J. Agric. Food. Chem., 55, 4710-4716.
- Javmen, A.; Grigiškis, S.; Gliebutė, R. (2012).  *$\beta$ -glucan extraction from Saccharomyces cerevisiae yeast using Actinomyces rutgersensis 88 yeast lyzing enzymatic complex*. Biologija, 58 (2), 51–59.
- Jinshui, W.; Cristina, M.R.; De-Barbera, C.B. (2002). *Effect of the addition of different fibers on wheat dough performance and bread quality*, Food Chem., 79, 221-226.
- Jong, S.C. (2002). *Fungal cell-wall glycans* In Biopolymers, 6 (polysaccharides 2) by Vandamme, E.J.; De Baets, S.; Steinbuchel, A. (Eds.), pp. 159-177. Wiley VCH Verlag, Weinheim.
- Jozef, S.; Kogan, G.; Kačuroková, M.; Machová, E. (1999). *Microbial (1,3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity*, Carbohydrate Polymers, 38, 247-253.
- Kim, K.S.; Yun, H.S. (2006). *Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*, Enzyme and Microbial Technology, 39, 496-500.
- Klis, F.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. (2002). *Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae*, FEMS Microbiology Reviews, 26, 239-256.
- Lee, I.Y. (2002). *Curdlan* In Biopolymers, 5 (Polysaccharides 1), by Vandamme, E.J., De Baets, S.; Steinbuchel, A. (Eds.), pp. 135-158. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Liu, X.-Y.; Wang, Q.; Cui, S.W.; Liu, H.-Z. (2008). *A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae*, Food Hydrocolloids, 22, 239-247.
- López, V.; Querol, A.; Ramón, D.; Fernández-Espinar, M.T. (2001). *A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts*, Int. J. Food Microbiol., 68, 75-81.
- Macfarlane, G.T.; Cummings, J.H. (1999). *Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?* West J. Med., 171, 187-191.
- Miller, G.L. (1959). *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Analytical Chemistry, 31 (3), 426-428.
- Morales López, R. (2007). *Las paredes celulares de levadura de Saccharomyces cerevisiae: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde*, Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Nakamura, T.; Hitomi, Y.; Yoshida, M.; Shirasu, Y.; Tsukui, T.; Shimasaki, H. (2002). *Effect of yogurt supplemented with brewer's yeast cell wall on levels of blood lipids in normal and hypercholesterolemic adults*, Journal of Oleo Science, 51 (5), 323-334.
- Naughton, P.J.; Grant, G.; Bardicz, S.; Pusztai, A. (2000). *Modulation of Salmonella infection by the lectins of Canavalia ensiformis (Con A) and Galanthus nivalis (GNA) in a rat model in vivo*, J. Appl. Microbiol., 88, 720-727.
- Odes, H.S.; Lazovski, H.; Stern, I.; Madar, Z. (1993). *Double-blind trial of high dietary fiber, mixed grain cereal in patients with chronic constipation and hyperlipidaemia*, Nut. Res., 13, 979-985.
- Orlean, P. (1988). *Cell Wall Biogenesis* In The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, pp. 229-362. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Otero Rambla, M.A.; Cabello Balbín, A.J. (2007). *Procesamiento de levadura para la obtención de derivados. Diferentes alternativas*, ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, XLI (1), 2-11.

- Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. (1992). *A comparative study of different methods of yeast-strain characterization*, Syst Appl Microbiol, 15, 439-446.
- Roberfroid, M.B. (2001). *Prebiotics: preferential substrates for specific germs?*, Am. J. Clin. Nutr., 73, 406S-409S.
- Romero, R.; Gómez Basuri, J. (2003). *Yeast and yeast products, past, present and future*, Proceeding of Alltech 19th Annual Symposium.
- Suphantharika, M.; Khunrae, P.; Thanardkit, P.; Verduyn, C. (2003). *Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon**, Bioresource Technology, 88, 55–60.
- Swamy, H.; Smith, T.K.; Macdonald, E.J.; Karrow, N.A.; Woodward, B.; Boermans, H.J. (2003). *Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent*, Journal of Animal Science, 81, 2792-2803.
- Tam, T.M.; Duy, N.Q.; Minh, N.P.; Dao, D.T.A. (2013). *Optimization of Beta-Glucan extraction from waste brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* using autolysis, enzyme, ultrasonic and combined enzyme-ultrasonic treatment*, American Journal of Research Communication, 1 (11), 149-158.
- Thammakiti, S.; Suphantharika, M.; Phaesuwan, T.; Verduyn, C. (2004). *Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry*, Int. J. Food Sci. Technol., 39, 21-29.
- Thanardkit, P.; Khunrae, P.; Suphantharika, M.; Verduyn, C. (2002). *Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed*, World J Microbiol Biotechnol, 18, 527–539
- Torabizadeh, H.; Shojaosadati, S.A.; Tehrani, H.A. (1996). *Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products*, Lebensm.-Wiss. u-Technol., 29, 734-737.
- Varelas, V.; Liouni, M.; Calokerinos, A.C.; Nerantzis, E.T. (2015). *An evaluation study of different methods for the production of  $\beta$ -D-glucan from yeast biomass*, Drug Test. Analysis, 8, 46-55.
- Varelas, V.; Tataridis, P.; Lioni, M.; Nerantzis, E.T. (2016). *Application of different methods for the extraction of yeast  $\beta$ -glucan*. e-Journal of Science & Technology, 11.
- Vasallo, M. del C.; Puppo, M.C.; Palazolo, G.G.; Otero, M.A.; Beress, L.; Wagner, J.R. (2006). *Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: Surface and emulsifying properties*, LWT – Food Science and Technology, 29, 729-739.
- Wagner, J.R.; Otero Rambla, M.A.; Guerrero Legarreta, I. (2008). *Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos*, Buenos Aires, Universidad Nacional de Quilmes.

# Evaluación de configuraciones inversas en hornos de deshidratado de ciruela.

## Evaluation of inverse configurations in plum dehydration ovens.

Delia Paola Urfalino<sup>1</sup>, Alicia Lucía Ordoñez<sup>2</sup>, Jesica Worlock<sup>1</sup>, Martín Daniele<sup>1</sup>.

1.INTA EEA Rama Caída. 2.Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO.

urfalino.delia@inta.gob.ar

### Resumen

El deshidratado de ciruelas se realiza habitualmente en hornos a gas. Existen dos configuraciones típicas; en corriente paralela (CP) y en contracorriente (CC), siendo la segunda opción la más usual en Argentina. El propósito del trabajo fue comparar ambas disposiciones en iguales condiciones de operación para analizar si se justifica el cambio de logística en las empresas que trabajan a CC. Para ello, se determinaron tiempos de residencia de la fruta dentro del horno y temperatura y humedad entre la fruta. La reducción de peso final deseada se logró en tiempos equivalentes en ambas configuraciones, por lo cual no se justificaría el cambio de configuración. En el sistema de CC se presenta un incremento continuo en la temperatura y una disminución continua en la humedad entre la fruta. Mientras que en CP se pueden observar distintas etapas o pulsos en las cuales la temperatura es alta inicialmente y baja abruptamente con el ingreso de un nuevo carro en el sistema, lo cual también trae aparejado un aumento de humedad. El efecto de las variaciones de temperatura y humedad dentro del sistema debe complementarse con estudios de calidad en el producto final.

Palabras clave: ciruelas deshidratadas, corriente paralela, contracorriente, hornos.

### Abstract

Plum drying is usually carried out in gas dehydrators. There are two typical operations; parallel flow (PF) and counterflow (CF), being the second option the most common in Argentina. The objective of this study was to compare both operation methods under the same functioning conditions to analyze whether the change in logistics is justified. For this, residence times of the fruit within the dehydrator and temperature and humidity among the fruit were determined. The desired final weight reduction was achieved in equivalent times in both operations methods; therefore, an operation change would not be justified. In CF system there is a continuous increase of temperature and a continuous decrease of humidity among the fruit. While in PF, different stages or pulses can be observed in which the temperature is initially high and drops abruptly with the entry of a new car into the system, which also increases the humidity. The effect of variations of temperature and humidity within the system must be complemented with quality studies of the final product.

Keywords: dried plums, parallel-flow, counter-flow, dehydrators.

### 1. Introducción

Las ciruelas deshidratadas o ciruelas pasas son producidas generalmente mediante la deshidratación en hornos de túneles. Las variedades de ciruelas utilizadas con este fin son d'Agen, d'Ente y Stanley. Todas ellas contienen un alto contenido de sólidos solubles (Newman et al., 1996). La variedad d'Agen representa el 84% de la producción argentina, siendo este país el cuarto productor mundial de ciruelas. En el sur de la provincia de Mendoza, se deshidrata aproximadamente el 70% de la ciruela d'Agen de Argentina (censo 2010, IDR). Su destino es mayormente la exportación, prácticamente no hay consumo interno. Sin embargo, Argentina presenta desventajas en competitividad con respecto a otros países productores, lo cual no le permite mantener estabilidad en el mercado.

La deshidratación es un proceso complejo que involucra la transferencia simultánea de calor y masa. La cantidad de energía requerida para secar un producto en particular depende de múltiples factores, tales como el contenido inicial de humedad, el contenido de humedad final deseado, la temperatura de secado, la humedad relativa y la velocidad del aire (Karim y Hawlader, 2005). En el caso del deshidratado de ciruelas, el proceso implica la eliminación de humedad hasta llevar a la fruta a un contenido de 18 – 20% de humedad final y una actividad acuosa ( $a_w$ ) de 0,65 – 0,68. En este rango de  $a_w$ , se evitan problemas de desarrollo microbiano, lo cual permite almacenar la fruta largos periodos de tiempo (Newman et al., 1996). El proceso de secado se lleva a cabo normalmente en túneles a gas en los cuales las temperaturas del aire de proceso rondan los 65 a 85°C. El costo de la energía utilizada para este proceso es elevado, constituyendo

aproximadamente un cuarto del costo total de producción (Sabarez y Price, 1999).

En la actualidad hay dos configuraciones típicas de flujo de aire para los túneles de deshidratación, la disposición en corriente paralela (CP) y en contracorriente (CC), siendo la segunda opción la más usual en Argentina. En la configuración en CP el aire de admisión y la entrada de la fruta se hayan en el mismo extremo y, por consiguiente, las ciruelas experimentan inicialmente el contacto con aire a alta temperatura (80 - 90°C) y baja humedad y al finalizar el proceso la temperatura del aire es menor y presenta mayor humedad. Este sistema está caracterizado por poseer condiciones de secado muy rápidas en la zona del túnel en donde la fruta se encuentra con alto contenido de humedad; el enfriamiento originado por la evaporación de la humedad superficial de la fruta permite utilizar temperaturas elevadas sin dañar el producto (Miller, 1964). Por otro lado, los secaderos a CC tienen el ingreso de la fruta y la admisión del aire en extremos opuestos, por lo cual la fruta queda expuesta a menor temperatura (60 - 70°C) y mayor humedad al inicio del proceso y a mayor temperatura y menor humedad al finalizar el mismo.

Cuando las industrias que deshidratan ciruela d'Agen en Argentina tienen la posibilidad de ampliar su capacidad de producción o desean optimizarla, comienza la discusión sobre la configuración a emplear en la construcción de nuevos túneles de secado, y sobre la conveniencia de modificar la logística de las plantas procesadoras. Sin embargo, al no disponer de evidencia científica que fundamente el cambio, el cual implica elevados costos, en la mayoría de los casos se continúa con el sistema tradicional.

La información publicada sobre que configuración posee mayor capacidad de producción es antigua y se han realizado sugerencias sin utilizar los mismos parámetros de proceso en ambas configuraciones. En 1964 Miller, comparó un horno a CC operando a temperatura máxima de 74°C versus un horno en CP operando a una temperatura máxima de 90°C y concluyó que el sistema en CP permite un incremento del 37% de su capacidad debido a que el proceso es más rápido, pero incrementa el consumo de combustible en un 12%.

Se han publicado una serie de ventajas y desventajas por configuración. La configuración a CC presenta la ventaja de que cuando disminuye el ingreso de fruta a la planta elaboradora no es necesario mantener el túnel lleno de carros (Gentry, 1965) y la desventaja de que, en el extremo caliente del túnel, se pueden presentar problemas de sobresecado o quemado en las bandejas superiores (Gentry, 1965). Mientras que, la configuración a CP, presenta la ventaja de que el enfriamiento originado por la

evaporación de la humedad superficial de la fruta permite utilizar temperaturas elevadas sin dañar el producto (Miller, 1964; Gentry, 1965) y las desventajas de que, en el extremo caliente del túnel, se pueden presentar daños en la piel y pérdidas de jugo (Christie, 1926, citado en Miller 1964; Sabarez 1997). A su vez, requiere mantener el túnel lleno de carros, aunque éstos se encuentren sin fruta, lo que requiere bandejas adicionales y una estricta programación de la distribución de la carga, por lo cual el régimen de carga debería realizarse automatizadamente (Gentry, 1965).

Por otro lado, se desconoce el comportamiento real y dinámico de los parámetros de proceso dentro de los túneles, y no hay antecedentes de cómo estos puedan afectar la calidad (aspecto, sabor o aroma, color y valor nutricional).

El propósito del presente trabajo fue comparar ambas configuraciones (CP y CC) para determinar los tiempos de residencia de la fruta dentro del horno en iguales condiciones de temperatura de regulación del quemador (o sea igual gasto energético) y la obtención de los perfiles reales de temperatura y humedad entre la fruta dentro de los túneles de configuraciones inversas.

Los datos obtenidos en este trabajo sumado al modelado y a los análisis comparativos de la calidad del producto obtenido según la configuración de los túneles de secado (los cuales no se presentan en este trabajo) constituirán herramientas para decidir si se justifican o no los cambios de logística necesarios en las empresas existentes en la Argentina para trabajar con el sistema en CP en lugar del sistema tradicional a CC.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materia prima

Se utilizó ciruela (*Prunus domestica*) variedad d'Agen, proveniente de los montes frutales de la colección de INTA Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rama Caída, (georreferencia: 34°40'03.93" S 68°23'37.80" O).

La misma se cosechó con un grado de madurez óptimo, correspondiente a un contenido de sólidos solubles mayor a 22 °Brix y 3 a 4 libras de presión por pulgada cuadrada. Estas determinaciones se realizaron tomando muestras aleatorias dentro del lote a cosechar. Los °Brix se midieron con un refractómetro digital Arcano DBR0045nD, mientras que la firmeza se determinó con un penetrómetro Turoni FT 327. Posteriormente, la fruta se cosechó manualmente y se cargó en cajones de 20 kilogramos.

Las ciruelas se clasificaron por tamaño y se seleccionaron las de calibre mediano (diámetro transversal mayor a 30,5 y menor a 35 mm). Los

cajones de fruta permanecieron en la planta piloto a temperatura ambiente por un lapso de tiempo no mayor a un día antes de iniciar su procesado.

Posteriormente, las ciruelas se lavaron (para eliminar restos de tierra y hojas) en una lavadora rotatoria de tambor y se distribuyeron en una sola capa sobre las bandejas, obteniendo un peso aproximado de  $12,8 \pm 1$  kg por bandeja. Las mismas se colocaron en pilas de 26 unidades sobre los carros los cuales fueron trasladados en los rieles hacia el horno piloto.

## 2.2. Horno piloto

Para realizar los ensayos a escala semi-industrial se utilizó un horno con un túnel perteneciente a la Planta Piloto de Deshidratado de Frutas de la Estación Experimental Agropecuaria (E. E. A.) Rama Caída (Figura 1).



Figura 1. Horno Piloto INTA EEA Rama Caída.

El horno está construido en un contenedor aislado térmicamente con una capacidad interna de  $33,1 \text{ m}^3$  y un potencial de carga máxima aproximada de 2 toneladas de ciruela fresca. El horno posee carros, que circulan por rieles, cada carro puede apilar 26 bandejas, conteniendo aproximadamente  $315 \pm 15$  kg de ciruela fresca.

El horno piloto cuenta con:

- Un quemador EQA modelo 181 serie 9250 para gas natural.

- Un sistema automatizado de apertura y cierre de la puerta externa y lateral interna para recirculación de aire, con control automático a distancia desde PC o manual.

- Un ventilador con regulador de velocidad entre 1 y 5 m/s.

- Una balanza Balcopan de peso continuo (capacidad máxima de 600 kg), diseñada para

alta temperatura, la cual emite una señal a la PC permitiendo registrar el peso en forma continua.

## 2.3. Deshidratación

Se efectuaron 3 repeticiones por configuración, en contracorriente (CC) y en corriente paralela (CP), regulando en ambos casos el quemador a una temperatura de corte de  $90^\circ\text{C}$  (para asegurar que la temperatura máxima entre la fruta fuera  $85 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ), la velocidad de aire se reguló a flujo constante de 2,5 m/s.

Para evaluar la configuración a CC, el horno piloto se cargó inicialmente con 4 carros. Cuando el carro que se ubicaba frente al quemador alcanzó 1/3 de su peso inicial, se retiró e ingresó en el sistema un nuevo carro (carro N°5), en ese momento se consideró que el horno se hallaba en régimen. Luego, cada vez que se retiró un carro por el extremo de mayor temperatura del horno se repuso un carro con fruta fresca en el extremo de menor temperatura del mismo.

Para la configuración a CP, el horno piloto se cargó inicialmente con un solo carro ubicado frente al quemador, este permaneció en esa posición durante 5 horas. Luego se fueron introduciendo de a un carro (carros N° 2, 3 y 4), cada uno de ellos estuvo 5 horas frente al quemador. Posteriormente, cuando el carro N° 1 alcanzó 1/3 de su peso inicial se repuso un carro con fruta fresca por el extremo de mayor temperatura (carro N° 5), en ese momento se consideró que el horno se hallaba en régimen. Luego, cada vez que se retiró un carro por el extremo de menor temperatura del horno se repuso un carro con fruta fresca en el extremo de mayor temperatura del mismo.

En cada configuración ensayada (CC y CP) se procedió como se describe a continuación:

Para evaluar la capacidad de producción se determinó el tiempo de residencia de los carros en régimen dentro del horno, registrando la hora de ingreso y egreso de los carros dentro del período de reposición constante (carros 5 al 13, 9 repeticiones, Tabla 1).

Tabla 1. Esquema de repeticiones y muestreo en horno piloto para comparar configuraciones (CC y CP)

N° carro	1	...	4	5	...	9	...	13	14	15	16
CC				*R1		*R2		*R3			

CP				*R1			*R2			*R3			
	CARGA INICIAL	HORNOS EN RÉGIMEN						DESCARGA					

\*R1: 1er Repetición y muestreo  
 \*R2: 2da Repetición y muestreo  
 \*R3: 3er Repetición y muestreo

Asimismo, en los carros N° 5, 9 y 13, se colocaron sensores i-button de temperatura/humedad entre la fruta en las bandejas 2 y 22 para identificar la máxima temperatura y mínima humedad a la que está expuesta la fruta durante el procesado. El proceso finalizó cuando la fruta llegó a 1/3 del peso inicial.

La pérdida de masa se registró en forma continua, para ello se colocó una balanza sobre la base de los carros (5, 9 y 13) y se ubicaron sobre la misma las bandejas con fruta. El peso se registró cada treinta minutos.

Se tomaron muestras representativas (aproximadamente 4,5 kilogramos) de la segunda bandeja de los carros 5, 9 y 13 de ambas configuraciones ensayadas. Las mismas se dividieron al azar en subgrupos y se colocaron en bolsas individuales de polietileno de alta densidad, a temperatura ambiente, para su posterior análisis de actividad acuosa ( $a_w$ ).

### 2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2016).

La evaluación de los tiempos de residencia, de  $a_w$  y de la humedad se realizaron mediante pruebas de normalidad de los datos, análisis de la varianza (ANOVA) y comparación de las medias por test Least Significant Difference (LSD) (Balzarini et al., 2011). En todos los análisis efectuados se utilizó un nivel de confianza del 95%.

### 3. Resultados y Discusión

Los tiempos promedio de residencia en el proceso de deshidratación en planta piloto a CC y a CP se detallan en la Tabla 2. Los datos presentaron una distribución normal ( $p = 0,5654$ ) considerando un nivel de confianza del 95% (test de Shapiro-Wilks modificado). A CC el tiempo de residencia promedio fue  $21,06 \pm 1,53$  horas y en el caso de la configuración a CP fue  $20,72 \pm 2,50$  horas. Mediante un ANOVA se comprobó que los tiempos de residencia no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos tratamientos según la configuración empleada ( $p = 0,7375$ ). Asimismo, en el test LSD Fisher se observaron letras iguales indicando que no

hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un  $\alpha=0,05$ .

Carro N°	Tiempo de residencia CC (horas)	Tiempo de residencia CP (horas)
5	19,5	19
6	21,5	19,5
7	20,5	23
8	20	22,5
9	22	18
10	21	16,5
11	24	22
12	19	23
13	22	23
Promedio	$21,06 \pm 1,53$	$20,72 \pm 2,5$

Tabla 2. Tiempos de residencia a CC y CP

En la Figura 2 se observa el comportamiento de la temperatura del aire entre la fruta en un carro en el interior de un horno de deshidratación a CC. La temperatura se incrementa sostenidamente a medida que el carro avanza dentro del túnel.

Por otro lado, en el caso de la configuración en CP, se pueden observar distintas etapas (o pulsos), en las cuales la temperatura va incrementándose y luego baja abruptamente con el ingreso de un nuevo carro en el sistema (Figura 3).

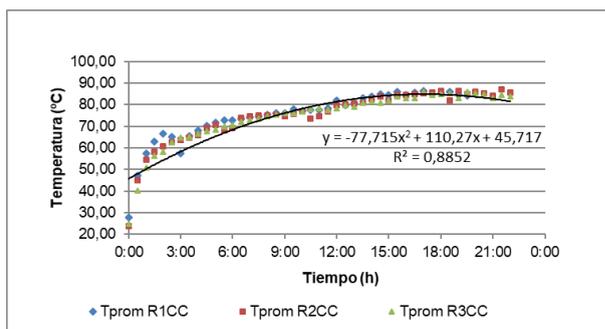
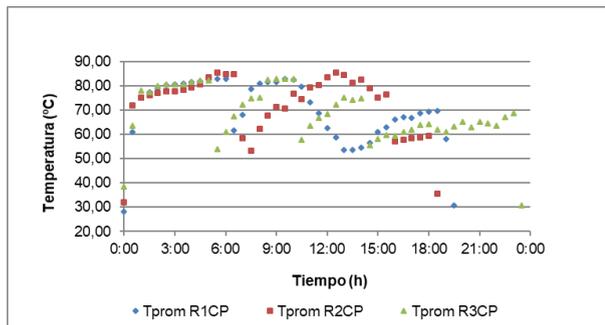
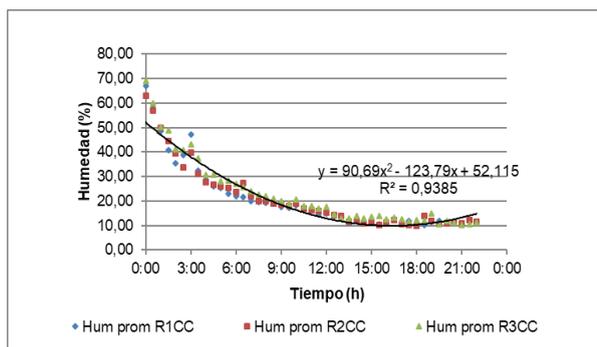


Figura 2. Temperatura entre la fruta durante la deshidratación a CC.



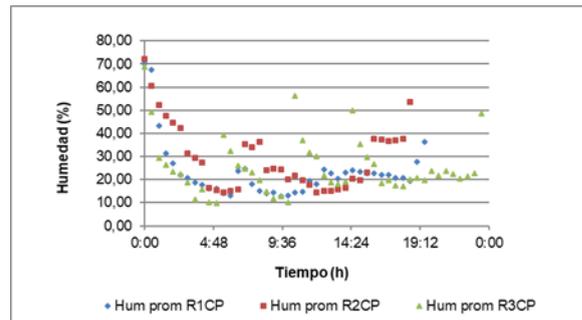
**Figura 3. Temperatura entre la fruta durante la deshidratación con configuración en CP.**

Respecto a la humedad del aire entre la fruta, en la configuración a CC, esta disminuye a medida que el carro avanza dentro del túnel alcanzando humedades mínimas promedio entre la fruta de  $12 \pm 2\%$  (Figura 4).



**Figura 4. Humedad entre la fruta durante la deshidratación a CC.**

En el caso de la configuración CP, la humedad del aire entre la fruta presenta un comportamiento por pulsos, disminuyendo al aumentar la temperatura y aumentando con el ingreso de un nuevo carro con fruta fresca en el sistema (Figura 5). Las humedades mínimas promedio entre la fruta son de  $12,5 \pm 2,5\%$ .



**Figura 5. Humedad entre la fruta durante la deshidratación a CP.**

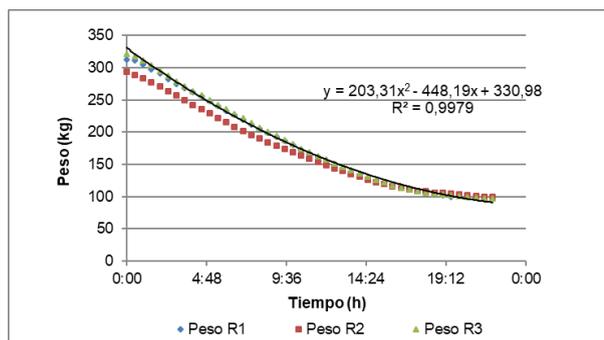
En el presente ensayo se observó que al evaluar la deshidratación a CC versus CP, con temperatura máxima del aire inferior a  $90^{\circ}\text{C}$  y velocidad constante de  $2,5 \text{ m/s}$ ; no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos de residencia de los carros dentro de los túneles. Por lo tanto, ambas configuraciones poseen la misma capacidad de secado. Este resultado es contrario a la afirmación realizada por Miller M. W. en 1964, quien concluyó que el utilizar una configuración a CP permite un incremento del 37% de su capacidad debido a que el proceso es más rápido (menor tiempo de residencia), pero incrementa el consumo de combustible en un 12%. A partir de esta publicación, en E.E.U.U se recomendó el cambio de configuración en los hornos de deshidratado de ciruelas de CC a CP. Sin embargo, la comparación que realizó Miller no fue correctamente planteada ya que comparó un horno a CC operando a temperatura máxima de  $74^{\circ}\text{C}$  versus un horno en CP operando a una temperatura máxima de  $90^{\circ}\text{C}$ . El resultado del incremento en la velocidad de deshidratación hallado por Miller no puede atribuirse al cambio de configuración, si no al incremento de la temperatura. Lo cual no justificaría un cambio en la configuración, sino un aumento controlado de la temperatura de corte del quemador.

Por otro lado, en 2012 Sabarez realizó un modelado computacional en el cual simuló un horno funcionando a CP y uno funcionando a CC, con el objetivo de comparar la eficiencia de ambos sistemas. Los ensayos se realizaron en un horno de laboratorio, sin realizar ensayos en planta piloto, ni en industria debido a los costos y dificultades logísticas asociadas. Con dicho modelado se obtuvo un tiempo promedio de residencia de 17,4 horas para CP y de 18,6 horas para CC. Lo cual implica una diferencia de los tiempos de residencia menor al 6,5%. Para la realización de este modelado se supuso que en CP la temperatura del aire de secado era inicialmente de  $85^{\circ}\text{C}$  y decrecía linealmente

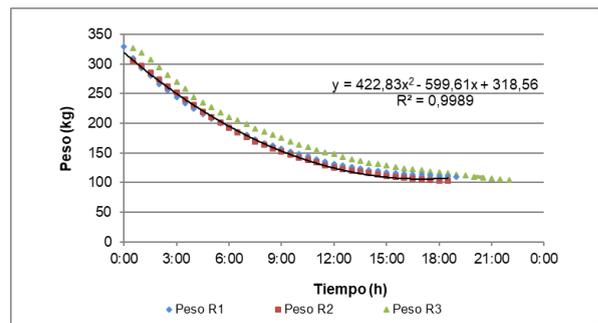
hasta llegar a 70°C, mientras que la humedad relativa del aire aumentaba de 15% a 30% (también de manera lineal); mientras que en CC el proceso era inverso.

En el presente ensayo pudo observarse que la variación de temperatura y humedad en el interior del túnel no ocurre de manera lineal, y que los comportamientos de estos parámetros en la configuración a CC y a CP no son exactamente inversos (Figuras 2 a 5). En el caso de CC, la temperatura aumenta y la humedad disminuye, de manera sostenida (no lineal). Mientras que, en el caso de CP, la temperatura y la humedad oscilan en pulsos. Los tiempos de residencia no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de ambos tratamientos según la configuración empleada. Por lo tanto, podría inferirse que, la diferencia de 6,5% hallada por Sabarez en 2012 podría atribuirse a los supuestos del modelado más que a una diferencia real entre los tiempos promedio de residencia según la configuración.

El peso registrado cada 30 minutos se presenta en las Figuras 6 y 7 para cada configuración ensayada. En las mismas puede apreciarse que la pérdida de peso inicial es más rápida en la configuración en CP. Cuando se parte de un peso inicial promedio de 300 kg por carro, éste se reduce a la mitad en 12,36 horas en el caso de la configuración en CC y en 9,48 horas en CP. Sin embargo, la reducción final deseada o sea 1/3 del peso inicial, se logra en tiempos de residencia similares, ya que esta velocidad disminuye en el tiempo, por lo cual no influiría en la economía global del proceso en las condiciones evaluadas.



**Figura 6. Evolución del peso en el tiempo en configuración en CC.**



**Figura 7. Evolución del peso en el tiempo en configuración en CP.**

Con respecto a las características de la ciruela deshidratada obtenida mediante configuraciones inversas, la actividad acuosa ( $a_w$ ) se determinó en el producto final como indicador de que el proceso había sido equivalente en ambos casos. La  $a_w$  promedio en el proceso de deshidratación a CC fue de  $0,656 \pm 0,035$  y en el caso de la configuración a CP fue de  $0,656 \pm 0,028$ .

Los datos presentaron una distribución normal ( $p_{a_w} = 0,0824$ ) considerando un nivel de confianza del 95% (test de Shapiro-Wilks modificado). Mediante un ANAVA se comprobó que no hubieron diferencias estadísticamente significativas en la actividad acuosa ( $p_{a_w} = 0,9923$ ), en ambas configuraciones ensayadas. Asimismo, en el test LSD Fisher se observaron letras iguales indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas con un  $\alpha=0,05$ .

#### 4. Conclusiones

Los tiempos de residencia a CC y CP no presentaron diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto, ambas configuraciones poseen la misma capacidad de secado.

La variación de temperatura y humedad del aire en el interior del túnel no ocurre de manera lineal. En CC la temperatura aumenta y la humedad disminuye, de manera sostenida. En CP la temperatura disminuye y la humedad aumenta oscilando en pulsos.

La pérdida de peso inicial es más rápida en la configuración en CP. Sin embargo, la reducción final deseada o sea 1/3 del peso inicial, se logra en tiempos de residencia equivalentes para ambas configuraciones.

La  $a_w$  de las ciruelas deshidratadas obtenidas a CC y a CP no presentaron diferencias estadísticamente significativas independientemente de la configuración evaluada.

Los resultados demuestran la relevancia que tiene para el sector industrial el disponer de información que contribuya a la toma de decisiones en la industria. El conocimiento de las ventajas y desventajas de cada configuración, de sus condiciones óptimas de operación, así como la necesidad de monitorear y controlar dichas condiciones durante la deshidratación industrial de ciruelas es indispensable para la optimización de los procesos.

El cambio de configuración y de la logística no se justifica económicamente por motivos vinculados a las capacidades de producción ni al gasto energético ya que operados de manera eficiente ambas configuraciones son equivalentes en dichos aspectos.

## 5. Referencias

Balzarini M., Di Rienzo J., Tablada M., González L., Bruno C., Córdoba M., Robledo W., Casanoves F. (2011). Introducción a la bioestadística, Aplicaciones con Infostat en Agronomía. Editorial Brujas. ISBN: 978-987-591-251-9, 383.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>

Gentry J. P. (1965). Problems and possibilities with parallel-flow prune dehydration. Universidad de California Davis. URL: <http://ucanr.edu/repositoryfiles/1965-28.PDF-78493.pdf>

INSTITUTO DE DESARROLLO RURAL, MENDOZA – ARGENTINA. (2010). Ciruela para industria, censo frutícola provincial 2010, Mendoza – Argentina. URL: <http://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2012/07/Informe-Ciruela-Industria.pdf>

Karim, M. A.; Hawlader, M. N. A. (2005). Drying characteristic of banana: theoretical, modeling and experimental validation. Journal of Food Engineering, 70: 35-45.

Miller, M. W. (1964). Progress report on parallel and counter flow dehydration of prunes. California Dried Plum Board. Research reports, 12 - 14.

Newman, G. M.; Price, William E.; Woolf, Lawrence A. (1996). Factors influencing the drying of prunes 1. Effects of temperature upon the kinetics of moisture loss during drying. Food chemistry, 57(2), 241-244.

Sabarez H. (2012). Computational modelling of the transport phenomena occurring during convective

drying of prunes. Journal of Food Engineering, 111, 279-288.

Sabarez, H.; Price, W.E. (1999). A diffusion model for prune dehydration. Journal of food engineering, 42, 167-172.

Sabarez, H.; Price, W.E.; Back, P.J.; Woolf, L.A. (1997). Modelling the kinetics of d'Agen plums (*prunus domestica*). Food chemistry, 60(3), 371-382.

# Producción de enzimas pectinolíticas por fermentación: Eficacia del método de producción y *downstream*

## Production of pectinolytic enzymes by fermentation: Effectiveness of the production method and downstream

María Carolina Martín<sup>1,2</sup>, Vilma Inés Morata de Ambrosini<sup>1,2</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. CONICET.

mcmartin@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el método de producción enzimática y *downstream* a partir de *Bacillus* sp. CH15 pectinolítico, para la obtención de una preparación enzimática con potencial aplicación en la industria vitivinícola. Los métodos de producción incluyeron: i) cultivos estáticos, utilizando frascos de 1 L de capacidad incubados en condiciones controladas, y ii) biorreactor semiautomático de laboratorio. Los mejores resultados fueron obtenidos para el cultivo desarrollado en el biorreactor, alcanzándose una biomasa significativamente mayor y una rápida producción de enzimas pectinolíticas. La concentración enzimática se llevó a cabo con un evaporador rotativo a presión reducida, y como parte del proceso de *downstream* se utilizó la ultrafiltración, a través de un filtro tangencial con membranas de *cut-off* de 10 KDa. En este sentido, la ultrafiltración no permitió alcanzar una adecuada purificación de las enzimas de interés, debido a que se observaron grandes pérdidas de la actividad enzimática durante el proceso. Sin embargo, mediante la concentración se obtuvo un producto con un 40% más de actividad enzimática respecto a la inicial, el cual resultaría apropiado para su potencial aplicación en la maceración y clarificación de mostos y vinos.

Palabras clave: Producción Enzimática, Pectinasas, "Fermentación Sumergida", Purificación.

### Abstract

The aim of this work was to evaluate enzymatic production and downstream methods from *Bacillus* sp. CH15 pectinolytic, for the enzyme preparation with potential application in winemaking. The production methods included: i) static cultures, using flasks of 1 L capacity incubated under controlled conditions; ii) semi-automatic laboratory bioreactor. The best results were obtained for the bioreactor culture, reaching a significantly higher biomass and rapid production of pectinolytic enzymes. Enzymatic concentration was carried out with a rotary evaporator under reduced pressure, and ultrafiltration was used as part of the downstream process, through a tangential filter with 10 KDa cut-off membranes. In this sense, ultrafiltration did not achieve suitable purification of the enzymes of interest, because large losses of enzymatic activity were observed during the process. Nevertheless, a product with 40% more enzymatic activity than the initial one was obtained by concentration, which would be appropriate for its potential application in the maceration and clarification of musts and wines.

Keywords: Enzymatic Production, Pectinases, "Submerged Fermentation", Purification.

### 1. Introducción

Las enzimas pectinolíticas o pectinasas son polisacaridasas que degradan la pectina presente en la lamela media y pared celular primaria de las células vegetales. Esta capacidad es ampliamente utilizada en la elaboración de vinos ya que las pectinasas pueden ayudar a mejorar la clarificación y filtrabilidad de los vinos, y aumentar el rendimiento en mosto así como la extracción de compuestos polifenólicos y de color atrapados en los hollejos (Martín y Morata de Ambrosini, 2014).

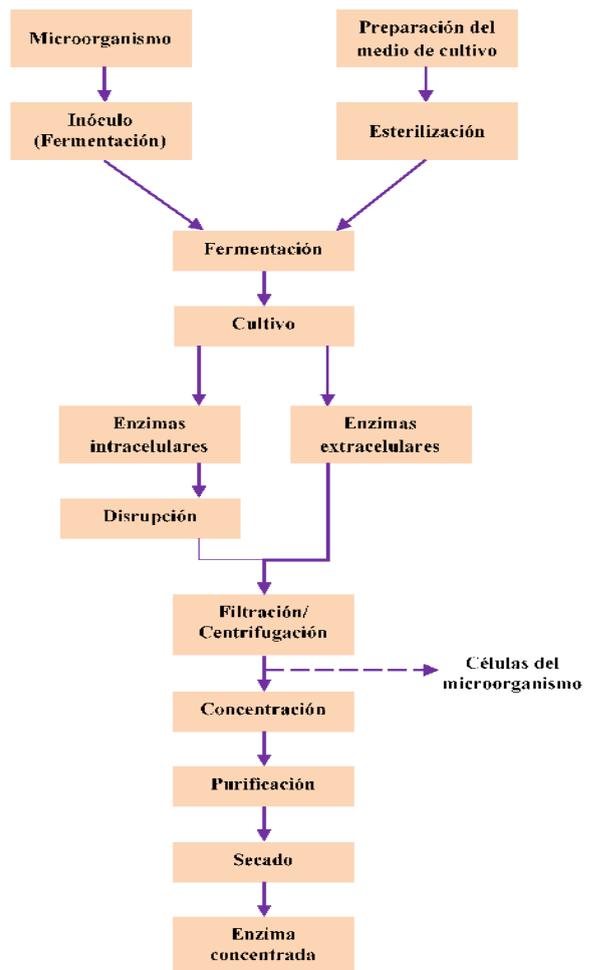
En enología, las preparaciones enzimáticas son producidas por algunas cepas de microorganismos, principalmente hongos, no modificados genéticamente, y contienen numerosas actividades enzimáticas, predominando una de ellas. Las cepas normalmente utilizadas son *Aspergillus niger* y *Trichoderma harzianum*, debido a la facilidad para

obtener pectinasas y glucanasas, respectivamente, de estos hongos. Estas cepas son reconocidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) y su uso está aceptado por la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino).

La producción de pectinasas, a partir de cepas fúngicas o bacterianas, puede llevarse a cabo tanto por fermentación sumergida (FSum), como por fermentación en sustrato sólido (FSS) (Pedroni *et al.*, 2009). Un proceso industrial típico de producción enzimática es la FSum, la cual implica un cultivo líquido del microorganismo productor de la enzima, normalmente en condiciones aeróbicas, desarrollado en un biorreactor agitado. Por su parte, en la FSS se hace uso de un medio simple, consistiendo normalmente en un producto de la agricultura no refinado, el cual le provee al microorganismo un medio soporte para inmovilizarlo y todos los nutrientes necesarios para

el crecimiento microbiano. Los sustratos más empleados son los subproductos agro industriales, tales como bagazo de caña de azúcar, salvado de trigo, bagazo de manzana y cítricos, pulpa de café, orujo de uva agotado, etc. Éstos, generalmente, se utilizan en combinación y/o complementados con fuentes de carbono y energía fácilmente metabolizables (melazas, maltodextrinas, polisacáridos, etc.) y otros nutrientes (sales de calcio, urea, fosfatos, etc.). Sin embargo, la recuperación de las enzimas y purificación en este método resulta más difícil y costosa, además de requerir mayores tiempos de fermentación (Uzuner y Cekmecelioglu, 2015). Por otro lado, la Fsum es más fácil de controlar a mayor escala y ha sido exitosamente usada para la producción de distintos metabolitos desde la década del 40. Particularmente, la producción de pectinasas a partir de distintas especies de *Bacillus* por FSum ha sido reportado exitosamente por muchos autores (Sharma y Satyanarayana, 2006; Ahlawat *et al.*, 2009; Joshi *et al.*, 2013).

La Figura 1 muestra el *flowchart* del proceso de fermentación (Fsum) y *downstream* de una preparación enzimática de origen microbiano. El proceso de *downstream* comprende los pasos de aislamiento de la enzima y de purificación y formulación de la preparación enzimática. Este es un paso muy importante en biotecnología debido a los costos de recuperación, concentración y purificación del producto final. Una alta concentración de la enzima en el sobrenadante o dentro de la célula y una eficiente purificación son aspectos relevantes en la manufactura de enzimas para uso industrial (Werner *et al.*, 2002). Para lograr una purificación completa de las enzimas se utilizan técnicas analíticas como la filtración en gel o cromatografía de exclusión en gel, en la cual las enzimas, y otras macromoléculas, se pueden separar por su tamaño. A partir de las enzimas purificadas, se puede realizar un estudio profundo de caracterización enzimática, como los mecanismos de degradación del sustrato, condiciones de actividad óptimas y mecanismos de regulación de síntesis de la enzima (Pedroni *et al.*, 2009).



**Figura 1. Flowchart del proceso de fermentación y downstream de una preparación enzimática.**

Fuente: Modificado de *Collection of Information on Enzymes* (Werner *et al.*, 2002).

El grado de pureza de las enzimas comerciales varía desde muy poco purificadas (extractos enzimáticos crudos) a enzimas altamente purificadas, y depende de su aplicación industrial. Con frecuencia, algunas enzimas pueden ser purificadas cientos de veces pero el rendimiento de la producción enzimática puede ser muy pobre, hasta un 10% de la actividad del material de partida. Por el contrario, a nivel industrial, las enzimas deben ser purificadas lo menos posible, solamente otras enzimas o compuestos interferentes en la actividad catalítica de la enzima en estudio deben ser removidos. Debe evitarse una purificación innecesaria ya que etapas adicionales son costosas en términos de equipamiento, manufactura y, en especial, pérdida de actividad enzimática. Como resultado, algunas preparaciones de enzimas comerciales consisten esencialmente del caldo de fermentación concentrado, acompañado de aditivos que garantizan la estabilización y actividad catalítica de la enzima. Sin embargo, el contenido de la enzima requerida en una preparación debe ser lo más alto posible (por ej.

un 10% p/p de las proteínas) para facilitar los pasos del proceso de *downstream*. Esto puede alcanzarse optimizando las condiciones de cultivo de la cepa, o a menudo drásticamente, por ingeniería genética, sobreexpresando la actividad enzimática en cuestión.

El **objetivo** del presente trabajo fue evaluar diferentes métodos de producción enzimática y procesos de *downstream* o purificación parcial, a partir de cultivos de una cepa bacteriana productora de enzimas pectinolíticas, para la obtención de una preparación enzimática a escala piloto o industrial con potencial uso en la industria vitivinícola.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Microorganismo:

Como microorganismo productor de enzimas pectinolíticas (pectinasas) se utilizó la cepa *Bacillus* sp. CH15, la cual fue previamente aislada desde la superficie de uvas para vinificación provenientes de la región vitivinícola San Rafael, Mendoza, Argentina (Cabeza *et al.*, 2011). Dicha cepa fue estudiada y seleccionada por su capacidad de producir pectinasas extracelulares ácidas y “activas en frío (Martín y Morata de Ambrosini, 2013). Además, el efecto de dicha preparación enzimática sobre la extracción y evolución del color de vinos Malbec fue oportunamente estudiado, mediante ensayos de microvinificaciones llevados a cabo a bajas temperaturas de maceración (Martín y Morata de Ambrosini, 2014).

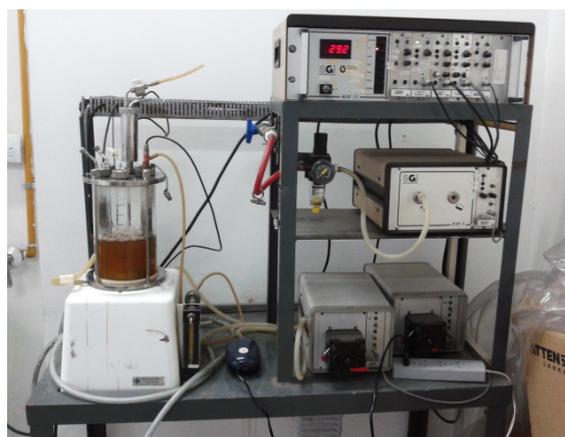
### 2.2. Producción enzimática:

Para la producción de las enzimas pectinolíticas, así como también primeramente para la producción del inóculo, se utilizó el medio de cultivo líquido diseñado y optimizado por Kobayashi *et al.* (2001), con algunas modificaciones, conteniendo pectina cítrica (60% de metilación) como principal fuente de carbono. La composición del mismo se detalla en la Tabla 1.

**Tabla 1. Composición del medio de cultivo Kobayashi *et al.* (2001) parcialmente modificado.**

Componentes	Composición (g/L)
Pectina cítrica (60% metilación)	5
Peptona de carne	2,5
Peptona de soja	2,5
Extracto de levadura	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,05
Aqua (c.s.p.)	1L
Agar pH = 5	15

La fermentación se llevó a cabo en dos sistemas de producción diferentes: a) en frascos de cultivos de 1 L de capacidad conteniendo 800 mL de caldo, incubados a 30°C por un período de 72 h, sin agitación (lotes 1 y 2), y b) en un biorreactor SGI SET002M (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia) conteniendo 1 L de caldo de cultivo, con control automático de temperatura a 30°C, mantenido durante 24 h con aireación intermedia (lote 3) (Figura 2). El inóculo fue al 2%, tratándose de un cultivo activo con DO (560 nm) no menor de 0,600.



**Figura 2. Biorreactor SGI SET002M (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia)**

### 2.3. Recuperación de la enzima en estudio:

A partir de los cultivos celulares se procedió a la recuperación de las enzimas de interés. Por tratarse de enzimas extracelulares, directamente se procedió a eliminar los microorganismos y recuperar el sobrenadante libre de células (SLC), al cual se lo llamó SLC crudo. Las células fueron removidas, en primer lugar, por centrifugación (15 min a 3000 x g), y seguidamente por filtración, utilizando un filtro vertical a vacío con membranas de poro de 0,45 µm.

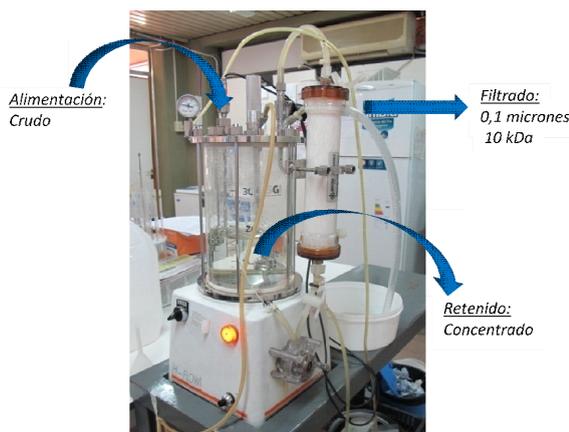
### 2.4. Purificación parcial y concentración:

Los SLC crudos fueron sometidos, por un lado, directamente a concentración (lote 1), y por otro, a purificación parcial y concentración por ultrafiltración (lotes 2 y 3). Para la concentración directa se utilizó un evaporador rotativo a presión reducida (Rotavapor Fbr® Decalab S.R.L., MERCOSUR) bajo las siguientes condiciones: 40±2 °C, vacío de 90 KPa, baja agitación (4-8 rpm), 180 min (Figura 3). Mientras que para la ultrafiltración se utilizó el equipo piloto de filtración tangencial HI-FLOW (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia), acoplado con módulos de filtración de *cut-off* de 10 KDa (SGI 30 UFIB/1/S18/10KD)

(Figura 4). Dicha filtración se llevó a cabo en condiciones de refrigeración, con una presión de 0,5 bar, durante 30-40 min.



**Figura 3. Evaporador rotativo a presión reducida (Rotavapor Fbr® Decalab S.R.L., MERCOSUR).**



**Figura 4. Sistema piloto de ultrafiltración tangencial HI-FLOW (Setric Genie Industriel, Toulouse, Francia).**

## 2.5. Ensayo de actividad enzimática

La actividad pectinolítica se cuantificó mediante la liberación de azúcares reductores desde una dispersión de pectina (0,25% de pectina en buffer acético/acetato 50 mM, pH 4,0) usando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959) y ácido galacturónico como estándar. La relación enzima:sustrato fue 1:10 (v/v) y las condiciones de reacción enzimática 20°C, pH 4,0 y 15 min. Una unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de grupos reductores (expresados como ácido monogalacturónico) por minuto bajo las condiciones del ensayo.

La actividad enzimática específica (UE/mg) se evaluó determinando la concentración de proteínas, de acuerdo al método de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como estándar para la reacción.

## 3. Resultados y Discusión

La cepa *Bacillus* sp. CH15 fue cultivada por fermentación sumergida para la producción de enzimas pectinolíticas. Dicha producción enzimática fue diferente en los distintos sistemas de producción utilizados. Mientras que dos lotes fueron producidos por fermentación en frascos de cultivos estáticos (lotes 1 y 2), un único lote fue obtenido por fermentación en el biorreactor (lote 3).

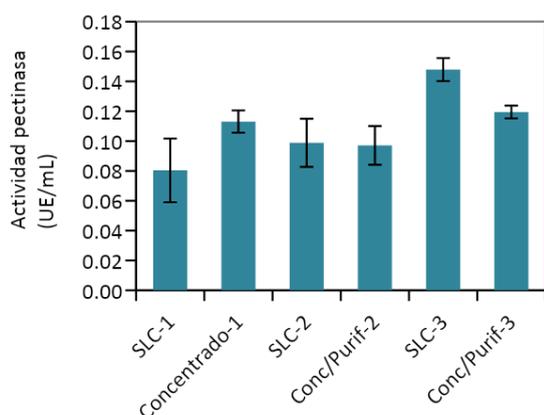
La recolección de las células y obtención del extracto enzimático se realiza, normalmente, en la etapa final de crecimiento exponencial, cuando la secreción enzimática es máxima, de acuerdo a experiencias previas. Sin embargo, los cultivos fueron procesados según se mencionó en la sección anterior, a tiempos de crecimiento definidos. Así, los cultivos de los lotes 1 y 2 alcanzaron una densidad óptica (DO) de solamente 0,200 unidades en 72 h, mientras que el lote 3 alcanzó una DO de 1,015 en tan solo 24 h. Con respecto a los dos primeros casos, la DO alcanzada es significativamente baja, lo cual indicaría que los cultivos se encuentran en etapas tempranas de fase exponencial. El tiempo de cultivo (72 h) fue definido en base a experiencias previas de cultivos estáticos, llevadas a cabo en iguales condiciones, excepto por el volumen del material de partida (100-250 mL, *datos no mostrados*). Probablemente esta última variable (volumen de medio de cultivo) esté relacionada con los cambios observados en el crecimiento celular.

Seguidamente, los SLC crudos fueron sometidos, por un lado, directamente a concentración en rotavapor a presión reducida (lote 1), y por otro, a purificación parcial y concentración por ultrafiltración (lotes 2 y 3). La actividad pectinolítica de las diferentes preparaciones enzimáticas se muestra en la Figura 5.

Por un lado, se puede observar que la fermentación en el biorreactor (SLC-3) fue la que alcanzó la mayor actividad enzimática en el extracto crudo en muy corto período de tiempo ( $0,148 \pm 0,008$  UE/mL). Mientras que los cultivos producidos en frascos en condiciones estáticas (SLC-1 y SLC-2) mostraron valores de  $0,080 \pm 0,021$  y  $0,099 \pm 0,016$  UE/mL. Estos últimos son un 54 y 67% de la actividad alcanzada en el biorreactor, a pesar de la baja DO alcanzada por los cultivos.

Por otra parte, la actividad pectinolítica de la preparación enzimática concentrada en el rotavapor (Concentrado-1) aumentó un 40%, respecto al

material de partida (SLC-1). Sin embargo, se constató una pérdida de actividad pectinolítica neta, lo cual llevó a obtener una recuperación de las pectinasas en el concentrado de un 67%. Cabe mencionar que la concentración total, en las condiciones dadas, fue de 2,1 veces (v/v).



**Figura 5. Actividad pectinolítica de las preparaciones enzimáticas.** SLC: Sobrenadante libre de células “crudo” (lotes 1, 2 y 3); Concentrado-1: SLC concentrado en rotavapor (lote 1); Conc/Purif: SLC concentrados por ultrafiltración (lotes 2 y 3). Los barras son el promedio de tres determinaciones y los segmentos verticales corresponden a las desviaciones estándar.

En cuanto a los concentrados obtenidos por ultrafiltración (Conc/Purif) puede observarse que la actividad en dichos concentrados fue prácticamente la misma o incluso menor que la actividad del SLC de partida. Por lo que un efecto nulo o levemente negativo se obtuvo en cuanto a concentración de la actividad enzimática. Solamente una significativa reducción de volumen y desalado parcial pudo alcanzarse, lo cual resultaría importante para la producción de enzimas de uso industrial.

Cabe mencionar que los SLC filtrados por membrana de corte de 10 KDa (fracción no concentrada) retuvieron enzimas con actividad pectinolítica, con valores de actividades de  $0,063 \pm 0,007$  y  $0,075 \pm 0,005$  UE/mL en los lotes 2 y 3, respectivamente (actividades no mostradas en la Figura 5). Esto indicaría, preliminarmente, la presencia de enzimas de pesos moleculares

relativamente bajas (menores de 10 KDa) con este tipo de actividad. La presencia de pectinasas en esta fracción no sería conveniente en vista de la producción de una preparación enzimática parcialmente purificada y concentrada, porque si bien la actividad mostrada no es demasiado alta, sí lo es el volumen de dichos extractos, conllevando esto a una importante pérdida de actividad enzimática en la fracción concentrada.

En general, el peso molecular de las enzimas pectinolíticas depende del tipo de enzima que se trate, tomando valores muy variables, comprendido en un rango de entre 35 y 140 KDa (Kashyap *et al.*, 2001). Con respecto a las pectinasas reportadas para el género *Bacillus*, la mayoría de las enzimas identificadas hasta el momento en este género son pectato liasas, siendo las liasas de la familia PL1 las más numerosas, con pesos moleculares entre 30 y 50 kDa. La familia PL3 contiene pectato liasas de un menor tamaño molecular, entre 20 y 25 kDa, mientras que la familia PL9 contiene pectato liasas con un tamaño molecular superior a 72 kDa.

Por otra parte, el rendimiento del proceso de purificación por ultrafiltración en los lotes de producción 2 y 3 se muestra la Tabla 2. En este sentido, en ambos lotes se observó una significativa pérdida de actividad enzimática al pasar por el módulo de filtración de 10 KDa, siendo más drástica en el lote 3. Esto conllevó a que la producción sea muy baja en las fracciones concentradas, aproximadamente un 20 y 30% en los lotes 2 y 3. Con respecto a la concentración de proteínas totales, hubo una recuperación adecuada en las fracciones concentrada y filtrada, respecto a la de partida. Sin embargo, en las fracciones de mayor interés, es decir los concentrados (Conc/Purif), las actividades específicas son muy bajas e inferiores a las de partida, por lo que no pudo lograrse una correcta purificación enzimática. Por su parte, en las fracciones filtradas, se constata la actividad de enzimas pectinolíticas en las mismas, siendo particularmente en el lote 2 considerablemente mayor la producción debido al gran volumen de dicha fracción.

**Tabla 2. Evaluación de los procesos de purificación enzimática por ultrafiltración en dos lotes de producción**

Muestras	Actividad enzimática (UE/mL)	Volumen de muestra (L)	Proteínas (mg)	Actividad pectinásica neta (UE)	Actividad específica (UE/mg)	Fold purification	Producción (%)
SLC-2	0,099	1,550	43,70	153,21	3,51	-	-
Conc/Purif 10KD-2	0,097	0,315	23,68	30,58	1,29	0,37	19,96
Filtrado10KD-2	0,063	1,150	25,22	71,96	2,85	0,81	46,97
SLC-3	0,148	0,650	29,52	96,14	3,26	-	-
Conc/Purif 10KD -3	0,119	0,240	16,91	28,67	1,70	0,52	29,82

Filtrado10KD-3	0,075	0,280	5,70	21,11	3,70	1,14	21,95
----------------	-------	-------	------	-------	------	------	-------

Los resultados precedentes están en concordancia con lo reportado para la producción de preparaciones de enzimas comerciales, en el sentido de minimizar pasos de purificación que resultarían innecesarios, debido a la potencial pérdida de estabilidad y de la actividad catalítica de las enzimas cuando se modifica el medio en el que se encuentran activas, además del correspondiente aumento en los costos de producción.

#### 4. Conclusiones

De acuerdo a los sistemas de producción enzimática evaluados en el presente trabajo, se puede observar que el método más conveniente es la fermentación en el biorreactor, ya que con éste se alcanzó una alta densidad celular en muy corto período de tiempo y la mayor actividad enzimática en el extracto crudo. Esto puede ser atribuido especialmente a las condiciones de aireación constante del cultivo, teniendo en cuenta que se trata de un microorganismo aeróbico. Otros métodos de cultivos no estáticos, como la fermentación en estufas o baños termostáticos agitados sería una alternativa interesante de estudiar.

Con respecto al proceso de *downstream* realizado por ultrafiltración tangencial, con membranas de *cut-off* de 10 KDa, este no resultó un método adecuado para lograr una correcta purificación de las enzimas de interés, debido a que se observaron grandes pérdidas de la actividad enzimática. Sin embargo, una concentración en volumen fue lograda, a expensas de un mantenimiento en los niveles de actividad enzimática respecto a los SLC de partida, obteniéndose un producto final apto para su potencial aplicación industrial.

#### 5. Referencias

Aberer Werner y otros 6 autores, (2002). *Collection of Information on Enzymes*. Final Report. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.

Ahlawat, S.; Dhiman, S.S.; Battan, B.; Mandhan, R.P.; Sharma, J. (2009). *Pectinase production by Bacillus subtilis and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric*, Process Biochemistry 44(5), 521-526.

Bradford M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry 72, 248-254.

Cabeza M.S.; Baca F.L.; Muñoz Puntos E.; Loto F.; Baigorri M.D.; Morata V.I. (2011). *Selection of*

*psychrotolerant microorganisms producing cold-active pectinases for biotechnological processes at low temperature*, Food Technology and Biotechnology 49(2), 187-195.

Joshi, M.; Nerurkar, M.; Adivarekar, R. (2013). *Use of citrus limetta peels for pectinase production by marine Bacillus subtilis*. Innovative Romanian Food Biotechnology 12, 75-83.

Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). *Applications of pectinases in the commercial sector: a review*, Bioresource Technology 77, 215-227.

Kobayashi, T. y otros 6 autores, (2001). *Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of Bacillus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 65, 842-847.

Martín, M.C.; Morata de Ambrosini, V.I. (2013). *Cold-active acidic pectinolytic system from psychrotolerant Bacillus. Application in pigment extraction from red grapes*. American Journal of Enology and Viticulture 64(4), 495-504.

Martín, M.C.; Morata de Ambrosini, V.I. (2014). *Effect of a cold-active pectinolytic system on colour development of Malbec red wines elaborated at low temperature*, International Journal of Food Science & Technology 49(8), 1893-1901.

Miller, G.L. (1959). *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, Analytical Chemistry 31, 426-428.

Pedrolli, D.B.; Monteiro, A.C.; Gomes, E.; Carmona, E.C. (2009). *Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes*, Open Biotechnology Journal, 9-18.

Sharma, D.C.; Satyanarayana, T. (2006). *A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by Bacillus pumilus dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods*, Bioresource Technology 97(5), 727-733.

Uzuner, S., & Cekmecelioglu, D. (2015). *Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of Bacillus subtilis growing on hazelnut shell hydrolyzate*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 113, 62-67.

# Modificación Estructural de Bentonitas por Intercalación de Polihidroxidaciones de aluminio

## Structural Modification of Bentonites by Intercalation of Aluminum Polyhydroxidations

Rogelio Di Santo<sup>1</sup>, Laura Lucero<sup>1</sup>, Irene Carbajal<sup>1</sup>, Marina Debernardi<sup>1</sup>, Olivia López<sup>2</sup>, Gisela A. Quiroga<sup>1</sup>, Mario D. Ninago<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. Universidad Nacional del Sur.

rdisanto@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

Mediante un proceso de intercalación seguido de radiación por microondas, se realizó la modificación estructural de una bentonita de calidad enológica. A partir de técnicas complementarias de caracterización se demostró que el proceso de pilarización induce cambios estructurales, modificando la distribución de tamaño de las partículas y su estabilidad térmica. En tal sentido a través de microscopía electrónica de barrido, se observó que las bentonitas modificadas presentaron una mayor porosidad con la presencia de cavidades y poros de mayor tamaño. A partir de ensayos de difracción laser, se observaron incrementos en el tamaño promedio final de las partículas luego del proceso de pilarización. Por otra parte, mediante difracción de rayos X, se corroboró el desplazamiento del plano basal (001) hacia ángulos menores y se observó incrementos en el espaciado interlamina de las láminas de la bentonita modificada. Finalmente, por análisis termogravimétrico, se corroboró la formación de pilares a través de la observación de nuevas etapas de degradación, presentes en las bentonitas pilarizadas.

Palabras clave: Bentonita, polihidroxidaciones de aluminio, radiación de microondas, caracterización estructural.

### Abstract

Through a process of intercalation followed by microwave radiation, the structural modification of an oenological quality bentonite was performed. From complementary characterization techniques it was shown that the pillarization process induces structural changes, modifying the particle size distribution and its thermal stability. In this sense, through scanning electron microscopy, it was observed that the modified bentonites presented a greater porosity with the presence of larger pockets and pores. From laser diffraction tests, increases in the final average particle size were observed after the pillarization process. On the other hand, by X-ray diffraction, the displacement of the basal plane (001) towards smaller angles was corroborated and increases in the interlamina spacing of the modified bentonite sheets were observed. Finally, by thermogravimetric analysis, the formation of pillars was corroborated through the observation of new stages of degradation, present in pillarized bentonites.

Keywords: Bentonite, aluminum polyhydroxidations, microwave radiation, structural characterization.

### 1. Introducción

La bentonita es una arcilla que puede ser definida como un silicato de alúmina hidratado que posee iones intercambiables (principalmente calcio, sodio, magnesio y potasio). Está conformada principalmente por minerales filosilicatos, y otras sustancias incluyendo fragmentos de roca, óxidos hidratados, geles y sustancias orgánicas. Físicamente es un sistema multicomponente, de partículas pequeñas de superficie lisa, pudiendo presentar sustitución parcial o total de aluminio por magnesio, hierro y/o elementos alcalinos o alcalinotérreos, y diversas coloraciones según las impurezas que contiene. Desde el punto de vista industrial, las bentonitas son ampliamente usadas en la industria alimenticia como agente floculante durante la etapa de clarificación del vino. En farmacia se las emplea como excipiente de fármacos debido a su inocuidad y fácil purificación, además es empleada en la

elaboración de papel. Debido al elevado grado de hidratación e hinchamiento que presentan en agua, son usadas como agente de sellado durante la construcción de pozos de extracción de petróleo. En tal sentido, las arcillas naturales y modificadas representan una alternativa promisorio para ser empleadas en la remediación de efluentes líquidos debido a su inocuidad y amplia disponibilidad, siendo atractivas tanto desde el punto de vista económico, como así también del ambiental (Tan & Ting, 2014, Zhou et al., 2014).

Por otra parte, el proceso de pilarización consiste en la intercalación de complejos catiónicos de gran tamaño que son insertados entre las láminas de la arcilla y que luego de ser sometidos a procesos de calcinación conforman estructuras estables (pilares) que mantienen separadas dichas láminas (Manohar et al 2006). En este sentido, el uso de radiación de

microondas en condiciones suaves es un proceso menos investigado que podría ser usado para reemplazar la calcinación de arcillas minerales, siendo, por lo tanto, una alternativa más amigable con el medio ambiente (Olaya et al 2009). Así, las arcillas pilarizadas forman estructuras porosas, donde la longitud y frecuencia de los pilares, modifican tanto el espaciado interlamiar, como así también, el ancho de poro conduciendo a la formación de estructuras de mayor tamaño. En este trabajo se realizó la intercalación de polihidroxidaciones de aluminio y su posterior tratamiento térmico de microondas en condiciones suaves. La efectividad del proceso de pilarización se determinó a partir del análisis estructural de las bentonitas modificadas empleando técnicas complementarias de caracterización. En tal sentido, mediante Microscopía Electrónica de Barrido, SEM, se estudió la morfología desarrollada. A partir de ensayos de Dispersión Laser, LD se determinó el tamaño promedio final de las partículas. Finalmente, mediante Difracción de Rayos X, DRX y análisis Termogravimétrico (TGA) se estudió la estructura cristalina y la estabilidad térmica de las bentonitas con y sin tratamiento de pilarización.

## 2. Materiales y métodos

Se empleó una bentonita nacional de calidad enológica (Gabriel Bouillard & Cia.), utilizada en procesos de clarificación de vinos debido a su capacidad para formar flóculos con material en suspensión. La solución pilareante usada se obtuvo a partir de la hidrólisis de una solución de  $\text{AlCl}_3$  (0,4 M) mediante adición lenta de  $\text{NaOH}$  (0,4 M) a  $60^\circ\text{C}$  manteniendo una relación molar  $\text{OH}/\text{Al} = 2,2$ . Finalizada la adición de la base, se realizó el envejecimiento de la solución (2 h a  $80^\circ\text{C}$  y 24 h a temperatura ambiente). La solución pilareante fue agregada a una dispersión de bentonita en agua destilada al 2% (m/v) a  $60^\circ\text{C}$ , manteniendo una relación de 12 mmoles  $\text{Al}/\text{g}$  de arcilla. Finalizada la adición del agente pilareante, se procedió al proceso de intercalación para lo cual se mantuvo la solución a  $80^\circ\text{C}$  durante 2 h.

Las bentonitas intercaladas fueron exhaustivamente lavadas con agua destilada para remover los agentes sin reaccionar. Finalmente, las arcillas intercaladas y secas fueron sometidas a irradiación por microondas (100 W, 10 min) como una alternativa que permita el desarrollo de los pilares reduciendo los tiempos de calcinación.

### 2.1 Caracterización de las bentonitas

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La morfología y microestructura de las bentonitas fue observada con un microscopio electrónico de barrido (SEM515 Philips Electron Microscope).

Difracción Laser (LD). La distribución de tamaño de partícula de las muestras fue estudiada a través de un analizador de tamaño de partículas Horiba LA-950.

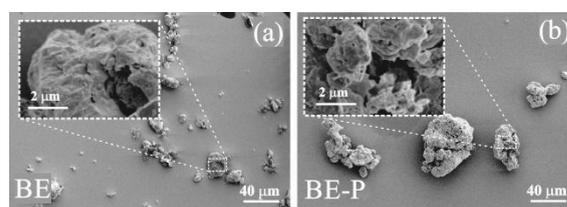
Difracción de Rayos X (DRX). Los ensayos de Difracción de Rayos X (XRD) se realizaron en un difractómetro Philips PW1710 con ánodo de cobre y monocromador curvo de grafito, operado a 45KV y 30 mA. Los difractogramas se tomaron con un paso de  $0.025^\circ$  y tiempo de conteo de 1s.

Análisis Termogravimétrico (TGA). Los ensayos termogravimétricos se realizaron en una balanza de la serie Discovery TGATM. Se registró la variación de masa entre  $35$  y  $700^\circ\text{C}$  a una velocidad de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  bajo atmósfera de nitrógeno.

## 3. Resultados y Discusión

En la figura 1 se observan las micrografías SEM de partículas de bentonita enológica (a) y bentonita enológica pilarizada (b). Para ambas partículas, en la región ampliada de las micrografías (Figuras 1 a y b) se observa una microestructura asociada a arcillas con morfologías de tipo “corn-flake” (Modabberi et al 2015, Sun et al. 2015, Choo & Bai 2015). Para BE se observaron dos poblaciones de partículas con tamaños promedio de  $\sim 3,5\mu\text{m}$  y

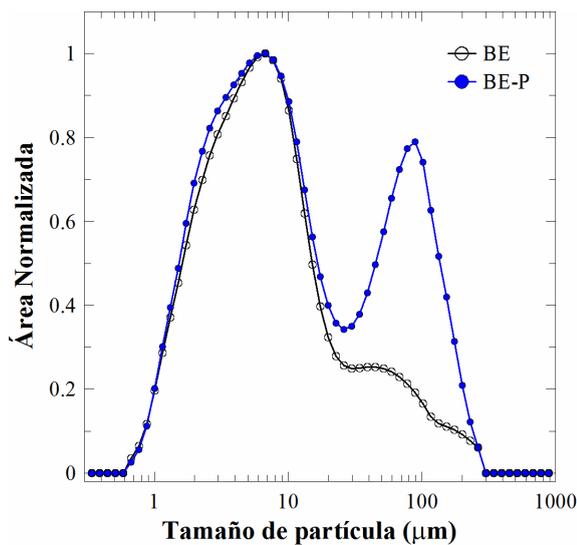
$\sim 13\mu\text{m}$  (Figura 1a). En el caso particular de la bentonita pilarizada (Figura 1b), se observó una mayor cantidad de poros, intersticios, cavidades. En este sentido, aunque se evidenció una distribución de tamaño de partícula bimodal, se observó una población predominante de  $\sim 84\mu\text{m}$ . Este aumento en el tamaño de las partículas podría estar relacionado con la conformación de pilares entre las capas de arcilla, en este sentido Sanabria et al (2008), reportó similares resultados en arcillas modificadas por intercalación y posterior calcinación.



**Figura 1. Micrografía SEM a 1000x de partículas de bentonita enológica (a) y bentonita enológica pilarizada (b). Región ampliada (25000x).**

En la Figura 2, se muestran las distribuciones de tamaño de partículas estimadas por difracción láser (LD) de BE y BE-P. En el caso de BE se observó una distribución bimodal de partículas, con tamaños promedio de  $\sim 5,8\mu\text{m}$  y  $\sim 35,2\mu\text{m}$ . En este sentido,

es importante destacar que para BE, las partículas más pequeñas representaron hasta el 90% del total de muestra ensayada. Por otra parte, en las bentonitas pilarizadas se observó un incremento en el tamaño final de las partículas, alcanzando valores de  $\sim 72 \mu\text{m}$  y que representaron hasta un 60% de la muestra ensayada. Así, los procesos de intercalación seguidos de radiación de microondas corroboraron la efectividad del proceso de pilarización, siendo estos resultados equivalentes a los observados por SEM.

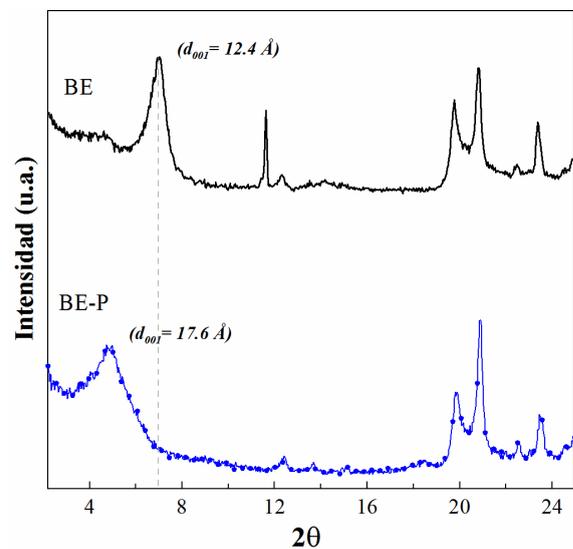


**Figura 2. Distribución de tamaño de partículas de bentonita enológica (BE) y bentonita enológica pilarizada (BE-P) determinados por D.L.**

En la figura 3, se muestran los patrones de difracción de bentonita enológica y bentonita pilarizada, respectivamente. A partir de este análisis se determinó que las bentonitas estudiadas están compuestas básicamente por montmorillonita. En este sentido, se detectó el reflejo del plano basal (001) en  $2\theta = 7.1^\circ$  con una distancia de separación interlaminar de  $d_{001} = 12,4 \text{ \AA}$ . Por otra parte, en las arcillas modificadas se detectaron minerales adicionales, tales como cuarzo y feldespato. Es importante destacar que luego del proceso de pilarización, el plano basal (001) se desplazó hacia ángulos más bajos y por consiguiente se produjo un aumento en el espaciado interlaminar  $d_{001} = 17,6 \text{ \AA}$ .

De acuerdo a lo reportado por Bertella y Pergher (2015), este aumento en el espaciado basal respecto a la de la arcilla sin modificar indica que los cationes de la arcilla fueron intercambiados por otros polihidroxidaciones. Estos resultados demostraron la idoneidad de la utilización de radiación de

microondas a baja potencia para favorecer la exfoliación de la arcilla como una alternativa a los métodos convencionales, tales como calcinación (H. Jobstmann et al. 2001, Bertella y Pergher 2015).



**Figura 3. Espectros DRX de bentonita enológica (BE) y bentonita pilarizada (BE-P).**

La figura 4 muestra las curvas de TGA de pérdida de peso de bentonita enológica y bentonita pilarizada. Como se puede observar, el perfil de descomposición térmica de la BE, presenta diferencias respecto a la BE-P. En la curva TGA se observó una pérdida inicial de peso de 5,2% para BE y 9,6% para BE-P, respectivamente. Este evento térmico, que se amplió hasta  $\sim 110 \text{ }^\circ\text{C}$ , es característico de las arcillas minerales y se asocia a un proceso de deshidratación por la eliminación de moléculas de agua adsorbidas entre las láminas de la arcilla (Tomul 2012).

El hecho de que en la bentonita modificada se evidencie un mayor porcentaje de pérdida de agua podría estar asociada a los cambios estructurales inducidos por los procesos de intercalación y tratamientos térmico. Así, la BE-P podría adsorber físicamente una mayor cantidad de moléculas de agua que BE. Por otro lado, en ambas arcillas se observó un segundo evento de descomposición térmica a  $456 \text{ }^\circ\text{C}$  para BE y  $420 \text{ }^\circ\text{C}$  para BE-P, el cual podría atribuirse a la eliminación de los grupos hidroxilo presentes en las capas de silicato.

En el caso de las bentonitas modificadas, esta pérdida de peso resultó más evidente debido a la deshidroxilación de los pilares que ocurre en esta etapa de degradación. En este sentido, Soliman et al

(2014), reportó similares comportamientos térmicos en arcillas modificadas por procesos de pilarización.

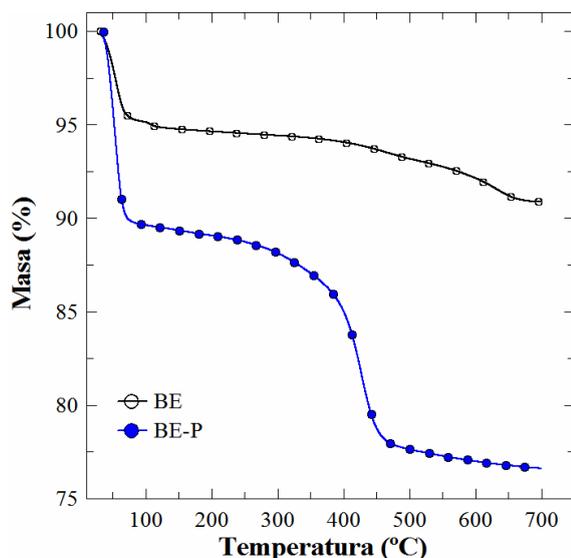


Figura 4. Curvas TGA correspondientes a bentonita enológica (BE) y bentonita enológica pilarizada (BE-P).

#### 4. Conclusiones

A partir de procesos de intercalación seguidos de radiación de microondas, se obtuvo una bentonita modificada con pilares de aluminio. La efectividad del proceso empleado se evidenció mediante técnicas analíticas complementarias. A partir de ensayos SEM y LD se observó un incremento en el tamaño promedio de las partículas obteniéndose materiales de mayor porosidad. Por otra parte, mediante DRX y TGA se corroboró la formación de pilares a través del aumento del espaciado interlamilar y la presencia de nuevos eventos de degradación en las arcillas pilarizadas.

#### 5. Referencias

Bertella, F.; Pergher, S. B. C. (2015). *Pillaring of bentonite clay with Al and Co. Microporous and Mesoporous Materials*, Vol. 201(C), 116–123.

Choo, K. Y.; Bai, K. (2015). *Effects of bentonite concentration and solution pH on the rheological properties and long-term stabilities of bentonite suspensions*. *Applied Clay Science*, Vol. 108, 182–190.

Jobstmann, H.; Singh, B. (2001). *Cadmium sorption by hydroxy-aluminium interlayered montmorillonite*. *Water, Air, and Soil Pollution*, Vol. 131, 203–215.

Manohar, D. M.; Noeline, B. F.; Anirudhan, T. S. (2006). *Adsorption performance of Al-pillared bentonite clay for the removal of cobalt(II) from aqueous phase*. *Applied Clay Science*, Vol. 31(3-4), 194–206.

Modabberi, S.; Namayandeh, A.; Lopez-Galindo, A.; Viseras, C.; Setti, M.; Ranjbaran, M. (2015). *Characterization of Iranian bentonites to be used as pharmaceutical materials*. *Applied Clay Science*, Vol. 116-117, 193–201.

Olaya, A.; Moreno, S.; Molina, R. (2009). *Synthesis of pillared clays with aluminum by means of concentrated suspensions and microwave radiation*. *Catalysis Communications*, Vol. 10(5), 697–701.

Sanabria, N.; Álvarez, A.; Molina, R.; Moreno, S. (2008). *Synthesis of pillared bentonite starting from the Al-Fe polymeric precursor in solid state, and its catalytic evaluation in the phenol oxidation reaction*. *Catalysis Today*, Vol. 133-135, 530–533.

Soliman, E. A.; Furuta, M. (2014). *Influence of Phase Behavior and Miscibility on Mechanical, Thermal and Micro-Structure of Soluble Starch-Gelatin Thermoplastic Biodegradable Blend Films*. *Food and Nutrition Sciences*, 05(11), 1040–1055.

Sun, Z.; Qu, X.; Wang, G.; Zheng, S.; Frost, R. L. (2015). *Removal characteristics of ammonium nitrogen from wastewater by modified Ca-bentonites*. *Applied Clay Science*, Vol. 107, 46–51.

Tan, W. S.; Ting, A. S. Y. (2014). *Alginate-immobilized bentonite clay: Adsorption efficacy and reusability for Cu(II) removal from aqueous solution*. *Bioresource Technology*, Vol. 160, 115–118.

Zhou, K.; Zhang, Q.; Wang, B.; Liu, J.; Wen, P.; Gui, Z.; Hu, Y. (2014). *The integrated utilization of typical clays in removal of organic dyes and polymer nanocomposites*. *Journal of Cleaner Production*, Vol. 1–9. Grado, Dpto. Ing. Mecánica, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

# Evaluación de la bioactividad in vitro de recubrimientos compuestos de chitosan/Bioglass®/TiO<sub>2</sub>

## Evaluation of the in vitro bioactivity of chitosan/Bioglass®/TiO<sub>2</sub> composite coatings

Silvia Clavijo<sup>1</sup>, Paola Torres<sup>1</sup>, Sofía Elena Santillán<sup>2</sup>, María José Santillán<sup>1,3</sup>

1.Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. Facultad de Ciencias Médicas-UNCUYO.

3-Facultad de Ingeniería-UNCUYO.

scclavijo@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

Desde el descubrimiento de Bioglass®, una gran cantidad de materiales cerámicos han sido investigados para uso potencial en el campo de la ingeniería de tejidos. En este ámbito es bien conocida la habilidad que exhiben los materiales bioactivos para unirse al tejido óseo a través de la formación de una capa de hidroxiapatita cristalina, al ponerlos en contacto con fluidos fisiológicos simulados o reales. En el área de materiales bioactivos, los recubrimientos compuestos representan una opción muy atractiva para promover propiedades funcionales diferentes a las que presentan los materiales individualmente. Con el propósito de obtener recubrimientos compuestos con alta bioactividad se fabricaron por deposición electroforética (EPD) recubrimientos de chitosan/Bioglass®/TiO<sub>2</sub>. Se desarrolló una serie de experimentos para optimizar la calidad de las películas depositadas por EPD teniendo en cuenta la densidad y adherencia de los depósitos al sustrato, donde se incluyó la evaluación de parámetros tales como tiempo de deposición, voltaje aplicado, pH de la suspensión, y conductividad. Posteriormente, los depósitos obtenidos fueron sumergidos en fluido fisiológico simulado (SBF) a pH de 7.25 y una temperatura de 37°C por un periodo de 14 y 21 días. Los cambios microestructurales generados durante la reacción ocurrida en la superficie del material compuesto fueron caracterizados empleando microscopía electrónica de barrido (MEB). De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se demostró la formación de una capa densa y homogénea de hidroxiapatita cristalina sobre la superficie de todos los depósitos compuestos obtenidos. Los resultados obtenidos indican que los materiales compuestos conformados a partir de chitosan y Bioglass® son materiales altamente potenciales para la regeneración de tejido óseo.

Palabras clave: deposición electroforética, materiales bioactivos, chitosan, vidrio bioactivo

### Abstract

Since the discovery of Bioglass®, a large number of ceramic materials have been investigated for potential use in the field of tissue engineering. The ability of bioactive materials to bind to bone tissue through the formation of a crystalline hydroxyapatite layer upon contact with simulated or real physiological fluids is well known in this field. In the area of bioactive materials, composite coatings represent a very attractive option to promote functional properties different from those of individual materials. In order to obtain composite coatings with high bioactivity, chitosan/Bioglass®/TiO<sub>2</sub> coatings were fabricated by electrophoretic deposition (EPD). A series of experiments were developed to optimise the quality of the EPD deposited films taking into account the density and adhesion of the deposits to the substrate, including the evaluation of parameters such as deposition time, applied voltage, pH of the suspension, and conductivity. Subsequently, the obtained deposits were immersed in simulated physiological fluid (SBF) at pH 7.25 and a temperature of 37°C for a period of 14 and 21 days. The microstructural changes generated during the reaction on the surface of the composite material were characterised using scanning electron microscopy (SEM). According to the results obtained in the present work, the formation of a dense and homogeneous layer of crystalline hydroxyapatite on the surface of all the composite deposits obtained was demonstrated. The results obtained indicate that composite materials made from chitosan and Bioglass® are highly potential materials for bone tissue regeneration.

Keywords: electrophoretic deposition, bioactive materials, chitosan, bioactive glass

## 1. Introducción

Desde la década de 1970 hasta la actualidad, los materiales cerámicos bioactivos han sido utilizados para la regeneración o remplazo total de tejido óseo dañado. La aplicación de tales materiales, promueve la unión entre la prótesis y el tejido circundante a partir de la formación de una capa de hidroxiapatita similar a la ósea, originando una continuidad fisicoquímica, reduciendo de este modo el rechazo del tejido al material implantado (Hutmacher et al. 2007). Los materiales más estudiados en el área de biocerámicos incluyen diferentes tipos de vidrios bioactivos principalmente: vidrios silicatos (Yao, et al. 2015) fosfatos (Ahmed et al. 2008) y boratos (ElBatal et al. 2016). Los vidrios bioactivos, en particular los vidrios en base sílice como el Bioglass®, presentan una alta bioactividad y por ende son materiales potenciales para diversas aplicaciones de reemplazo óseo.

El Bioglass® (45S5) tiene la siguiente composición en peso: 45% óxido de silicio (II)  $\text{SiO}_2$ , 24.5% óxido de calcio (CaO), 24.5% óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), y 6% de pentóxido fosforoso ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) porcentaje en peso. El material Bioglass® está compuesto de minerales que se encuentran naturalmente en el cuerpo ( $\text{SiO}_2$ , Ca,  $\text{Na}_2\text{O}$ , H, and P), y las proporciones moleculares de óxidos de calcio y fósforo son similares a las encontradas en los huesos (Krishnan *et al.* 2013). Recubrimientos de quitosan/Bioglass® se han obtenido anteriormente por deposición electroforética (EPD) sobre sustratos metálicos (Pishbin *et al.* 2011).

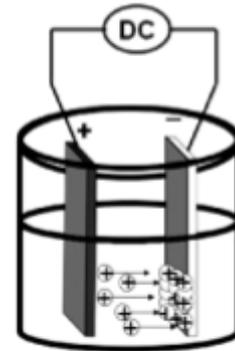
En este trabajo se empleó la técnica de EPD para obtener recubrimientos de quitosan/Bioglass®/ $\text{TiO}_2$  sobre sustratos de acero inoxidable. La EPD es una técnica ampliamente utilizada para el procesamiento de biomateriales debido a su buena relación costo-efectividad y versatilidad. En los últimos años, la EPD ha despertado interés en el campo biomédico, debido a la posibilidad de producir novedosas micro y nanoestructuras, así como combinaciones de materiales de gran interés para aplicaciones biomédicas (Corni *et al.* 2009). La deposición electroforética (EPD) implica la deposición sobre un sustrato conductor de carga opuesta (electrodo de deposición) de partículas cargadas que se encuentran suspendidas en un medio líquido cuando se aplica un campo eléctrico (Zheng *et al.* 2014).

El módulo de Young y la resistencia a la compresión son parámetros importantes para caracterizar las propiedades mecánicas en los

materiales compuestos que van a ser utilizados en sustitución ósea. El Módulo de Young, que es la pendiente de la curva tensión-deformación en la región elástica, proporciona información sobre la rigidez del compuesto. Teniendo en cuenta que la carga sobre los huesos en el cuerpo es por lo general a la compresión, es importante estudiar el límite de elasticidad. La tenacidad a la fractura da información importante acerca de la energía que se absorbe hasta la fractura. Ante esto, el objetivo de este trabajo consistió en la fabricación de recubrimientos aptos para ser utilizados en ingeniería de tejidos por lo cual se realizó la medición del módulo de Young y resistencia a la compresión de los mismos, a la vez que se investigó la biocompatibilidad de estos materiales sintéticos utilizando simulador de fluido corporal (SBF) acelarar.

## 2. Metodología Empleada

La EPD consta de dos etapas. La primera etapa es la migración de partículas cargadas suspendidas en el medio líquido hacia el electrodo de deposición; la segunda etapa es la deposición de partículas en el electrodo de deposición formando un depósito o película compacto denso y homogéneo (Figura 1).



**Figura 1 – Esquema de una celda de EPD. Las partículas con carga superficial positiva se depositan sobre el electrodo de deposición para formar un depósito denso y compacto.**

La deposición electroforética se puede clasificar en dos tipos de acuerdo a cuál sea el electrodo de deposición (ánodo o cátodo). Cuando las partículas en suspensión tienen carga positiva, la deposición se lleva a cabo en el cátodo y el proceso se llama deposición electroforética catódica (ver Figura 1). Si las partículas en suspensión se cargan negativamente la deposición tiene lugar en el ánodo y el proceso se llama deposición electroforética anódica. Por lo tanto por modificación adecuada de la carga superficial de las partículas, se puede lograr cualquiera de los dos modos de deposición.

Los pasos necesarios para realizar el recubrimiento del sustrato metálico son los siguientes:

1) Preparación de la superficie: consiste en la limpieza adecuada del objeto con acetona y posterior enjuague con agua destilada.

2) La preparación de una suspensión estable a ser utilizada en deposición electroforética implica colocar los reactivos chitosan (MW=80 kDa) con grado de deacetilación de 85% (Sigma-Aldrich), Bioglass® en polvo 45S5 y nanopartículas de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>-P25) (80% anatasa y 20% rutilo con área superficial de cerca de 50 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> y tamaño medio de partícula de 21 nm, Degussa Co, Germany) en solución acuosa de ácido acético 0,01 M. Dicha suspensión se coloca en agitador magnético durante 30 minutos y luego 2 horas en ultrasonido.

3) Una placa de acero AISI 316L con dimensiones de 20 mm x 30 mm se elige como sustrato y se lo emplea como cátodo en el interior de una cuba que contiene la suspensión. Se utilizó un ánodo de acero inoxidable, ambos separados por una distancia de 15 mm. Los electrodos se conectaron a una fuente de corriente continua PASCO SE-9721A (PASCO Instrument, Roseville, USA). Al concluir el proceso de EPD, se extrajo el sustrato recubierto del baño y se introdujo en un desecador.

4) Las muestras se sometieron a pruebas de bioactividad *in vitro* por medio de la inmersión de las mismas durante diferentes periodos de tiempo (14 y 21 días), manteniendo constantes las condiciones fisiológicas (pH= 7.25 y 37°C). Se utilizó una solución de fluido corporal simulada (SBF). Dicha solución SBF se preparó por disolución de los siguientes reactivos en agua desionizada: NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub> CNH<sub>2</sub> y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de acuerdo al procedimiento descrito por Kokubo (Kokubo, 1991). El pH de la solución se ajustó a 7.25 con tris-hidroximetil-aminometano y HCl 1N y se realizó a 36.5±0.5°C. El SBF utilizado posee una concentración iónica inorgánica similar a la del plasma sanguíneo humano, ver Tabla 1.

**Tabla 1. Concentración iónica del fluido fisiológico simulado (SBF) y del plasma sanguíneo humano.**

Concentración iónica (nM)	Plasma sanguíneo humano	SBF
Na+	142	142
K+	5	5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Cl-	103	147.8

HCO <sub>3</sub> -	27	4.2
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1	1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5

5) Medición de propiedades mecánicas: La resistencia a la compresión y la elongación porcentual (%) se determinaron en un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems (Inglaterra) mediante ensayos según la norma ASTM D638-01 (2001). Para los ensayos se utilizaron probetas circulares de 6 cm de longitud y diferentes espesores producidas por EPD. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software Texture Expert Exceed.

6) Caracterización de recubrimientos: Se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido MEB (JEOL JSM-7000F) para caracterizar la uniformidad de la microestructura de recubrimientos, porosidad residual, así como para evaluar la presencia de bioactividad en los recubrimientos.

### 3. Resultados y Discusión

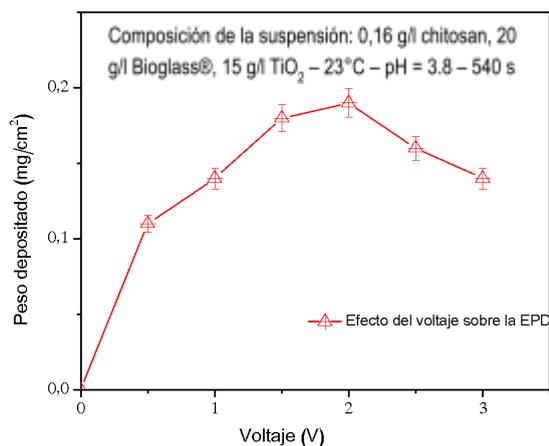
#### 3.1. Deposición Electroforética (EPD)

Debido a que el chitosan es un polication, se estimó que el proceso electroforético catódico se podía emplear para preparar películas de chitosan. El chitosan no se disuelve adecuadamente en agua pura y precipita cuando se emplean valores altos de pH (Pishbin, *et al.*2011), por lo que se utilizó una solución acuosa de ácido acético 0,01 M para obtener una suspensión con 0,16 g/l de chitosán, 20 g/l de Bioglass® y 15 g/l de TiO<sub>2</sub>. Trabajando a temperatura ambiente, se aplicó un voltaje continuo de 2 V y se observó la formación de un depósito sobre el cátodo durante el proceso de EPD.

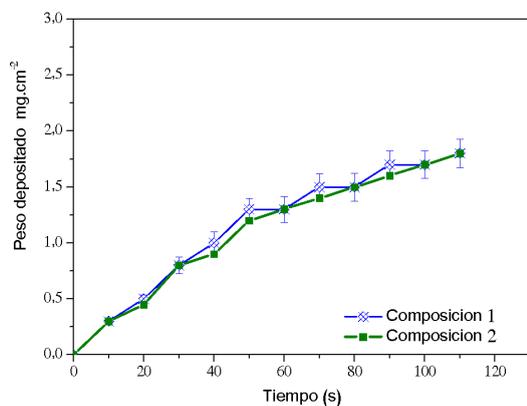
Se desarrollaron varias series de experimentos a fin de optimizar los parámetros de EPD. Una de ellas involucró el proceso de deposición a concentración de sólidos constante variando el voltaje entre 0 y 3 V (Figura 2).

En la Figura 3 podemos observar el peso depositado por unidad de área de recubrimiento cuando se han seleccionado dos suspensiones de composición diferente y se han realizado deposiciones a diferentes tiempos de control.

En la Figura 4 es posible observar las características microestructurales por medio de microscopía SEM de los depósitos chit-BG-TiO<sub>2</sub> sobre sustratos metálicos planos obtenidos por deposición electroforética (EPD) operando a temperatura ambiente.



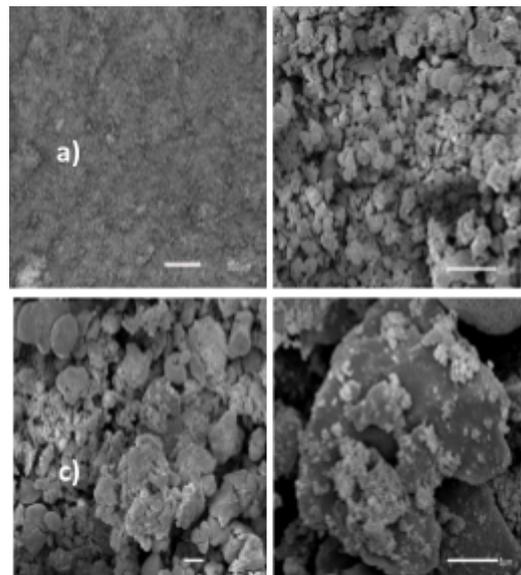
**Figura 2.** Efecto del voltaje sobre el peso de recubrimiento de Chit-BG-TiO<sub>2</sub> depositado por EPD



**Figura 3.** Peso depositado vs. tiempo para suspensiones de Chit-BG-TiO<sub>2</sub>: 2 V

A bajas magnificaciones (Fig. 4 a y b) las partículas de vidrio bioactivo y nanopartículas de TiO<sub>2</sub> están incrustados en la matriz de chitosan pero su distribución no es uniforme. Se pueden observar, aglomeraciones de partículas que pueden ser atribuidas posiblemente a Bioglass®. La figura 5 muestra el espectro EDS correspondiente a la muestra observada en la Figura 4.

Los picos corresponden a C, Si, Na, O, Ca y Ti (C: 68%; Si: 2%; O: 19%; Ca:9%). El espectro de EDS obtenido de la muestra es consistente con los elementos presentes en los recubrimientos compuestos de Ch-BG-Ti.

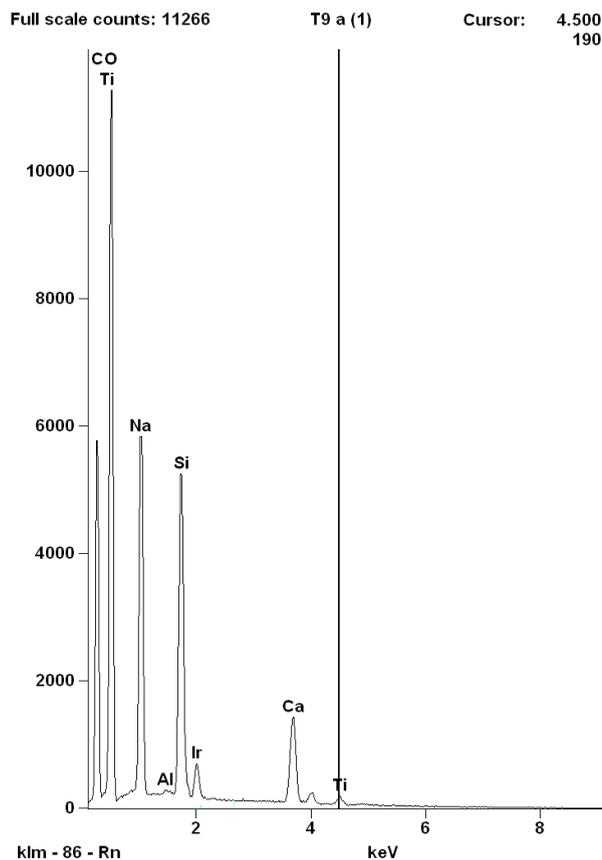


**Figura 4.** Morfología superficial de recubrimientos de Chit-BG-TiO<sub>2</sub> obtenidos por EPD a 2 V DC (Composición 1 fig. 3).

### 3.2. Propiedades mecánicas

#### 3.2.1 Medición de la resistencia a la compresión y Módulo de Young

El Módulo de Young y la resistencia a la compresión del hueso humano están en el rango de 1-20 GPa y 1-200 MPa (Hench, 1998), respectivamente. Con el aumento de la densidad ósea tanto el Módulo de Young como la resistencia a la compresión aumentan significativamente. Dado que el objetivo de realizar recubrimientos bioactivos de chit-BG-TiO<sub>2</sub> sobre sustratos metálicos se centra en estudiar su posible aplicación como material para ingeniería de tejidos, el estudio de la resistencia a la compresión y módulo de Young permite establecer si el material tendrá un comportamiento similar al hueso.



**Figura 5. Espectro EDS correspondiente al recubrimiento observado en la figura 4.**

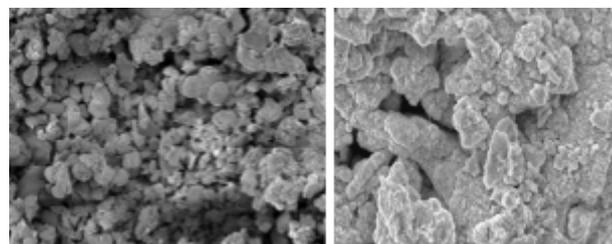
La resistencia a la compresión del recubrimiento de la figura 4 es de 16 MPa. Dicho recubrimiento sin Titania presenta una resistencia a la compresión de 12 MPa. El valor del módulo de Young para la película de chit-BG-TiO<sub>2</sub> es de 62,63 MPa mientras que es 41,63 MPa cuando el composite no tiene Titania. En este caso. Como podemos apreciar, el valor de las propiedades mecánicas de los recubrimientos es inferior al del hueso, por lo cual este material debe ser sinterizado si se desea utilizarlo como reemplazo de estructuras óseas.

### 3.3. Evaluación de la bioactividad

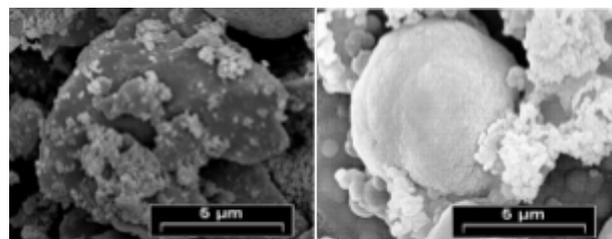
T. Kokubo propuso que para que un material artificial pueda crear un enlace directo con el hueso, luego de ser implantado en el cuerpo humano, era necesaria la formación de una capa de apatita similar a la del hueso en su superficie, Esta formación puede ser reproducida en un fluido corporal simulado (SBF – simulated body fluid) que contiene concentraciones de iones similares a las del plasma sanguíneo humano (ver Tabla 1), por lo que la bioactividad de un material puede ser predecida por medio de la formación de apatita en su superficie cuando se lo sumerge en SBF. Por otro

lado, también existen resultados cuantitativos (Takadama 2006) que muestran que el grado de formación de apatita de los materiales inmersos en SBF predice el grado de formación que puede inducir in vivo.

Se evaluó la bioactividad de los recubrimientos compuestos de chit-BG-TiO<sub>2</sub> sobre acero 316L, utilizando el SBF como medio de inmersión, el cual fue renovado semanalmente; ya que, en el cuerpo, existe una renovación continua del fluido fisiológico. Según L.M. Grover y colaboradores, la renovación del medio incrementa la formación de la capa de hidroxiapatita. Imágenes SEM de las películas de chit-BG-TiO<sub>2</sub> luego de 14 días de inmersión se muestran en las figuras 6 y 7. Una notable precipitación homogénea de hidroxiapatita (partículas de forma esférica pequeñas) se puede observar que se ha formado sobre la superficie del recubrimiento.



**Figura 6. Micrografías SEM a baja magnificación de recubrimientos de chit-BG-TiO<sub>2</sub> a) Antes de su inmersión en SBF y b) después de haber permanecido 14 días en baño de SBF.**



**Figura 7. Micrografías SEM en alta magnificación de recubrimientos de chit-BG-TiO<sub>2</sub> a) Antes de su inmersión en SBF y b) después de 14 días en SBF.**

## 4. Conclusiones

Este trabajo ha demostrado que se pueden producir recubrimientos uniformes de chitosan/Bioglass®/TiO<sub>2</sub> sobre acero inoxidable 316L utilizando deposición electroforética (EPD) como técnica de fabricación. Las mejores condiciones de deposición fueron obtenidas usando suspensiones con 20 g/l de Bioglass®, 15 g/l de TiO<sub>2</sub>, 1,6 g/l de chitosan en un solvente compuesto por ácido acético 0,01 M aplicando 2 V cuando se emplea un tiempo de deposición de 540 segundos, y el pH de la suspensión se ha ajustado a 3,8

trabajando a 25° C. La morfología y densidad superficial de los recubrimientos de quitosán/Bioglass®/TiO<sub>2</sub> sobre acero demostraron ser reproducibles, y de esta forma la EPD, puede ser considerada una alternativa de bajo costo para producir películas compuestas sobre sustratos metálicos que pueden ser empleados en aplicaciones en ingeniería de tejidos. Se comprobó que adicionar nanopartículas de TiO<sub>2</sub> a los recubrimientos de quitosán/Bioglass® mejora las propiedades mecánicas de éstos. Sin embargo, los depósitos obtenidos deben ser sinterizados a fin de alcanzar propiedades mecánicas comparables a las del hueso cortical humano. A fin de estudiar si las películas compuestas obtenidas son bioactivas las muestras se limpiaron con agua destilada y se sumergieron en SBF por períodos de tiempo de 14 a 21 días. Al cabo de los primeros 14 días se observó el crecimiento de partículas semiesféricas sobre los depósitos que presumiblemente son de hidroxiapatita (HA).

## 5. Referencias

- AHMED, I., PARSONS, A. J., RUDD C. D., NAZHAT S. N., KNOWLES J. C. (2008). *Comparison of phosphate-based glasses in the range 50P2O5-(50-x) CaO-xNa2O prepared using different precursors.* Eur. J. Glass Sci. Technol. A, 49 (2), 63-72
- CORNI I., NEUMANN, N., NOVAK S., VERONESI P., CHEN Q., RYAN M., BOCCACCINI A.R. (2009). *Electrophoretic deposition of PEEK-nano alumina composite coatings on stainless steel.* Surface & Coatings Technology 203, 1349-1359
- DAIXIONG ZHANG, XUEMING LI, XIAOGANG GUO, CHUAN LAI. (2014). *Fabrication of cobalt oxide (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) coating by electrophoretic deposition.* Materials Letters 126: 211-213
- FATMA H. ELBATAL, MONA A. OUIS, HATEM A. ELBATAL A. (2016). *Comparative studies on the bioactivity of some borate glasses and glass-ceramics from the two systems: Na<sub>2</sub>O-CaO-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and NaF-CaF<sub>2</sub>-B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.* Ceramics International, Volume 42, Issue 7, 8247-8256
- GROVER L. M., KNOWLES J. C., FLEMING J. C. BARRALET J.E. (2003). *In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement.* Biomaterials 24: 4133-4141.
- HENCH, LL., *Bioaeramics.* Journal of American Ceramics Society 81: 1705-1728.
- HUTMACHER, J.T., SCHANTZ CH., LAM X., TAN T., LIM CH. (2007). *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from biomaterials perspective.* J. Tissue Eng. Regen. M., 1, 245-260.
- PISHBIN F., SIMCHI A., RYAN M. P., BOCCACCINI A. R. (2011). *Electrophoretic deposition of chitosan/45S5 bioglass® composite coatings for orthopaedic applications.* Surf. Coat. Technol. 205, 5260-5268.
- KOKUBO T. (1991). *Bioactive glass ceramics. Properties and applications.* Biomaterials 12: 155-163
- KRISHNAN V., LAKSHMI T. (2013). *Bioglass: A novel biocompatible innovation.* J Adv Pharm Technol Res. Apr-Jun; 4(2): 78-83.
- QINGQING YAO, WEI LI, SHANSHAN YU, LIWEI MA, DAYONG JIN, ALDO R. BOCCACCINI, YONG LIU. (2015). *Multifunctional chitosan/polyvinyl pyrrolidone/45S5 Bioglass® scaffolds for MC3T3-E1 cell stimulation and drug release.* Materials Science and Engineering: C, Volume 56, Pages 473-480
- TAKADAMA H., KOKUBO, T. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity.* Biomaterials 27: 2907-2915.
- ZHENG, YANYAN, CHENGDONG XIONG, LIFANG ZHANG. (2014). *Formation of bone-like apatite on plasma-carboxylated poly(etheretherketone) surface.* Materials Letters 126: 147-150

# Electrodeposición de aleación de Wolframio-Cobalto: optimización de dureza a través del diseño experimental

## Tungsten-Cobalt Alloy Electrodeposition: Optimizing Hardness Through Experimental Design

Silvia Clavijo<sup>1</sup>, Gabriela Tudela<sup>1</sup>, Alejandro Cavagnola<sup>1</sup>, María José Santillán<sup>1,2</sup>, Francisco Membrives<sup>1</sup>.

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria-UNCUYO. 2. Facultad de Ingeniería-UNCUYO.  
scclavijo@fcai.uncu.edu.ar

### Resumen

Se realizó la electrodeposición de películas delgadas de aleación de wolframio-cobalto sobre sustratos metálicos planos. El objetivo principal del trabajo es estudiar la posibilidad de sustituir recubrimientos de cromo duro por películas de aleaciones basadas en wolframio como protección contra la corrosión. Se estudiaron las condiciones óptimas de proceso de recubrimiento incluyendo temperatura, densidad de corriente, tiempo de deposición y pH del baño. Se aplicó el método robusto de Taguchi a fin de diseñar la combinación óptima de parámetros que permitan obtener la máxima dureza del material. Las morfologías superficiales de depósitos de aleación de cobalto-tungsteno fueron evaluadas antes y después del tratamiento térmico mediante microscopía óptica. Propiedades de las aleaciones como microdureza y resistencia a la corrosión también se examinaron y compararon con depósitos de cromo duro sobre idéntico sustrato obtenidos por deposición electrolítica. Se ha llegado a la conclusión que los efectos más significativos sobre la dureza de los recubrimientos de wolframio-cobalto están relacionados con la temperatura y la concentración de sales de cobalto.

Palabras clave: Taguchi, deposición electrolítica, aleaciones, wolframio

### Abstract

Electrodeposition of thin films of Co-W alloys was carried out on flat metallic substrates. The aim of this work is to study the possibility of replacing hard chromium coatings with Co-W alloys films as protection against corrosion. The effect of some process parameters on the weight of alloy deposited on mild steel in a typical electroplating process is reported. Taguchi method of robust design is a reliable of determining the optimal manufacturing parameters for the improved hardness of the material. The surface morphologies of Co-W alloy deposits was studied before and after heat treatment by light microscopy. Properties of the alloys such as microhardness and corrosion resistance were also examined and compared with hard chromium deposits on the same substrate obtained by electrodeposition. An evaluation of the material properties shows that the most significant effects on the hardness of Co-W alloys are related to temperature and the concentration of cobalt salts.

Keywords: Taguchi, electrodeposition, alloys, W.

### 1. Introducción

El recubrimiento de objetos ferrosos tales como chapas de acero y tubos utilizados en muchas aplicaciones industriales se realiza comúnmente mediante deposición electrolítica, con el objetivo de formar una película protectora de un determinado material como cobre, níquel o cromo de manera uniforme, firmemente adherida y resistente a la corrosión (Obradovic et al. 2006). El cromado es el recubrimiento de piezas mediante una película de cromo, generalmente de tonalidad azulado. En general se aplica posterior al niquelado y puede servir con fines decorativos o industriales. En el primer caso es necesario que la película lograda sea de aspecto brillante y de reducido espesor (0,00025 – 0,0005 mm), obtenida al aplicar el proceso durante 2 a 5 minutos, el cual se conoce como

cromado decorativo o brillante. Cuando las películas son de mayor espesor, ésta adquiere características mecánicas que permiten a la pieza soportar grandes esfuerzos sin experimentar desgastes apreciables (Tsytysaru et al. 2014).

Aunque las prestaciones y aplicaciones del cromado realizado sobre aceros o chapa de hierro permite obtener productos con características excelentes desde el punto de vista de la dureza alcanzada y la belleza exterior, la manipulación por parte de los trabajadores de los subproductos de cromo generados por los baños electrolíticos durante las etapas de deposición electrolítica y lavado de piezas, ha hecho de la deposición de cromo una tarea altamente peligrosa. No solo para el medio ambiente, sino también y en forma muy especial para el hombre puesto que los cromatos

han sido reconocidos como carcinógenos químicos altamente tóxicos (Obradovic et al. 2006).

Debido a las razones expuestas se ha puesto la atención en los últimos años en desarrollar recubrimientos protectores que posean las mismas propiedades que el cromado pero que no sean nocivos para el ambiente o las personas (Hosseini, 2012).

Una de las aleaciones más prometedoras en cuanto a sus excelentes propiedades mecánicas y tribológicas es la de wolframio-cobalto (Bacal et al. 2015). El wolframio forma aleaciones de elevada dureza con el cobalto que conserva algunas propiedades inusuales tales como atracción magnética, elevada resistencia a la tracción, propiedades electroquímicas y una elevada resistencia a la corrosión (Bacal et al. 2015). Debido al elevado interés en obtener depósitos de wolframio-cobalto se han desarrollado muchos baños electrolíticos con diferentes tipos de condiciones operacionales y con muchos aditivos orgánicos e inorgánicos cuya función es mejorar la composición y propiedades de la aleación (Tsyntsarou et al. 2014).

El propósito del presente trabajo consiste en obtener depósitos de wolframio-cobalto sobre sustratos metálicos planos de acero al carbono, empleando baños electrolíticos con pH cercano a la neutralidad. Los depósitos obtenidos deberán ser uniformes, homogéneos y se espera que posean valores de dureza semejantes a los depósitos de cromo duro. Con este fin se estudiarán en detalle la influencia de los parámetros de operación en la calidad de los recubrimientos obtenidos a la vez que se investiga la resistencia a la corrosión.

A fin de eliminar variaciones durante el diseño experimental se utilizó el método de Taguchi. Este método utiliza un conjunto de matrices ortogonales que estipulan la forma de llevar a cabo un número mínimo de experimentos y que brindan información completa acerca de cómo los parámetros operacionales influyen en las características de los depósitos obtenidos (Song et al., 2016; Balak et al., 2015). Mediante la aplicación del método de Taguchi evaluaremos el efecto de cinco parámetros operacionales (temperatura, pH del baño, densidad de corriente, contenido de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) sobre la dureza de los depósitos obtenidos. Finalmente se concluirá cuáles son las condiciones operativas óptimas para obtener depósitos de calidad similar a los recubrimientos de cromo duro.

## 2. Metodología Empleada

Un proceso electrolítico se basa en los cambios químicos producidos por el paso de la corriente eléctrica a través de un baño contenido en una celda electrolítica, lo cual implica: una fuente generadora de corriente continua, una cuba o reactor electrolítico, el electrolito, un ánodo y el cátodo que es el objeto a recubrir. Los pasos necesarios para realizar el recubrimiento del sustrato metálico son los siguientes:

1) Preparación de la superficie: consiste en la limpieza adecuada del objeto con acetona y posterior decapado electrolítico mediante el empleo de un electrolito ácido que contiene  $\text{H}_2\text{SO}_4$  principalmente (Mantell, 1963). La temperatura de operación empleada es de  $40^\circ\text{C}$ . Los objetos son extraídos del baño y lavados con agua destilada.

2) Una vez que la superficie se encuentra en condiciones óptimas para el recubrimiento, se coloca el objeto como cátodo en el interior de una cuba electrolítica que contiene el baño electroquímico a emplear. En nuestro caso empleamos un ánodo (constituido por acero inoxidable) y un cátodo (pieza a recubrir) de acero de bajo contenido de carbono ( $\text{C} < 0,3\%$ ) de dureza 26 HRB de dimensiones  $20\text{ mm} \times 30\text{ mm}$  separados por una distancia de 15 mm. Ambos electrodos se conectaron a una fuente de corriente continua PASCO SE-9721A (PASCO Instrument, Roseville, USA).

3) Al concluir el proceso de electrodeposición, se extrajo el sustrato metálico del baño y se introdujo en un desecador. Posteriormente se realizó la medición de dureza de los depósitos obtenidos mediante durómetro Petri F26. Las características microestructurales de las películas obtenidas fueron analizadas mediante microscopio metalográfico.

## 3. Diseño Experimental

En el presente trabajo, se estudió el efecto de los parámetros de proceso sobre la dureza de los depósitos de W-Co obtenidos por electrodeposición utilizando el diseño de experimentos según el enfoque de Taguchi (Balak, 2015). En los diseños experimentales la etapa más importante es la selección de los factores de control, por lo que la matriz ortogonal de Taguchi se eligió de acuerdo a cinco factores de control (temperatura, pH del baño empleado, densidad de corriente, concentración de  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y concentración de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) que podrían influir en la dureza de las películas delgadas obtenidas por electrodeposición. El método utiliza un índice, denominado relación señal ruido (S/N) que mide la calidad de un

producto o proceso de fabricación (Zhang et al., 2015). El diseño de parámetros busca maximizar la relación S/N optimizando los niveles de los

parámetros de control asociados con el diseño del producto.

La Tabla 1 muestra los parámetros y niveles usados en este estudio.

**Tabla 1. Factores de control y niveles de variables usados en este estudio: matriz de base ortogonal Taguchi L16.**

Número de Experiencia	Densidad de Corriente (mA/cm <sup>2</sup> )	Concentración de CoSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O (mol/L)	Concentración Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (mol/L)	pH del electrolito	Temperatura (°C)
1	1	0,05	0,05	3	20
2	1	0,10	0,10	5	40
3	1	0,15	0,15	7	70
4	1	0,20	0,20	9	100
5	3	0,05	0,10	7	100
6	3	0,10	0,05	9	70
7	3	0,15	0,20	3	40
8	3	0,20	0,15	5	20
9	4	0,05	0,15	9	40
10	4	0,10	0,20	7	20
11	4	0,15	0,05	5	100
12	4	0,20	0,10	3	70
13	5	0,05	0,20	5	70
14	5	0,10	0,15	3	100
15	5	0,15	0,10	9	20
16	5	0,20	0,05	7	40

#### 4. Resultados y Discusión

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso del software estadístico MINITAB 17. Los resultados de los experimentos para optimizar la dureza de los recubrimientos de W-Co bajo diversas condiciones, junto con la desviación

estándar se presentan en la Tabla 2. La relación señal-ruido (S/N) se ha reportado teniendo en cuenta que es deseable obtener valores altos de dureza con una baja desviación estándar. El espesor promedio de los recubrimientos es de  $10 \pm 0,05 \mu\text{m}$ .

**Tabla 2. Valores experimentales de dureza y desviación estándar de recubrimientos de W-Co y relación S/N (Taguchi L16 matriz ortogonal).**

Exp. N°	Densidad de Corriente (mA/cm <sup>2</sup> )	CoSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O (mol/L)	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (mol/L)	pH	Temp. (°C)	Dureza (HRb)		Desviación estándar	
						Valor HRb	Relación S/N (dB)	±HRb	Relación S/N (dB)
1	1	0,05	0,05	3	20	34,00	30,58	2,83	-30,64
2	1	0,10	0,10	5	40	37,50	31,29	6,36	-31,54
3	1	0,15	0,15	7	70	84,50	38,54	0,71	-38,54
4	1	0,20	0,20	9	100	61,50	35,76	3,54	-35,78
5	3	0,05	0,10	7	100	79,40	38,00	0,85	-38,00
6	3	0,10	0,05	9	70	71,50	37,07	3,54	-37,09
7	3	0,15	0,20	3	40	42,00	32,35	5,66	-32,50
8	3	0,20	0,15	5	20	36,50	31,18	3,54	-31,27
9	4	0,05	0,15	9	40	47,50	33,52	2,12	-33,54
10	4	0,10	0,20	7	20	29,00	29,19	2,83	-29,27

11	4	0,15	0,05	5	100	46,00	33,23	2,83	-33,26
12	4	0,20	0,10	3	70	62,00	35,84	1,41	-35,85
13	5	0,05	0,20	5	70	73,00	37,26	1,41	-37,27
14	5	0,10	0,15	3	100	50,50	34,00	4,95	-34,09
15	5	0,15	0,10	9	20	35,25	30,89	3,18	-30,96
16	5	0,20	0,05	7	40	51,50	34,23	0,71	-34,24

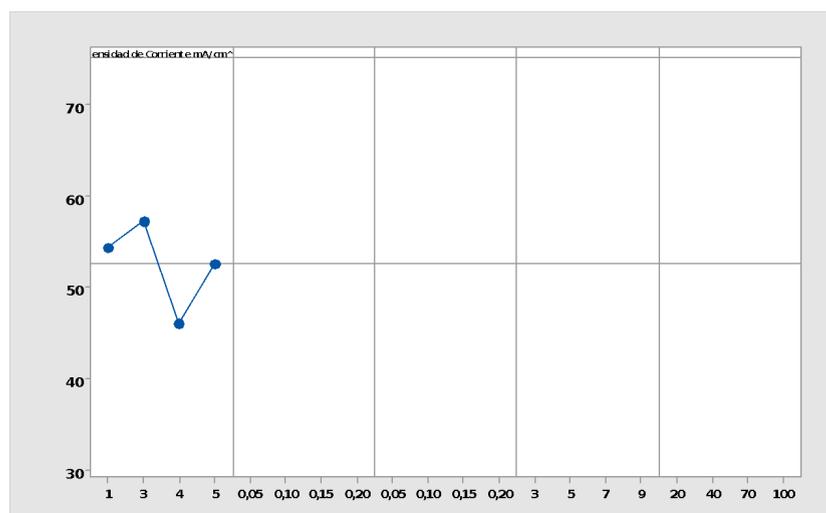
Los resultados para la variable respuesta (dureza) y la desviación estándar se resumen en la Tabla 4.

Podemos ver que el máximo valor corresponde a la variable A, la temperatura, de esta forma comprobamos estadísticamente que éste es el parámetro más importante que influye sobre la obtención de depósitos de W-Co de elevada dureza, mientras que el parámetro E (contenido de sales de wolframio) es el menos influyente. El efecto de los factores de control sobre la dureza de los

recubrimientos obtenidos se muestra en la Figura 1. La figura indica que la mayor dureza de la película se producirá cuando se utilice una densidad de corriente de 3 mA/cm<sup>2</sup>, un contenido de sales de cobalto de 0,05 mol/L, un contenido de sales de wolframio de 0,15 mol/L, un pH cercano a 7 y una temperatura de 70°C, lo cual es coincidente con otras investigaciones (Obradovic, 2006; Iwasaki, 2004).

**Tabla 4. Respuesta S/N (dB) para la variable respuesta (dureza) y desviación estándar.**

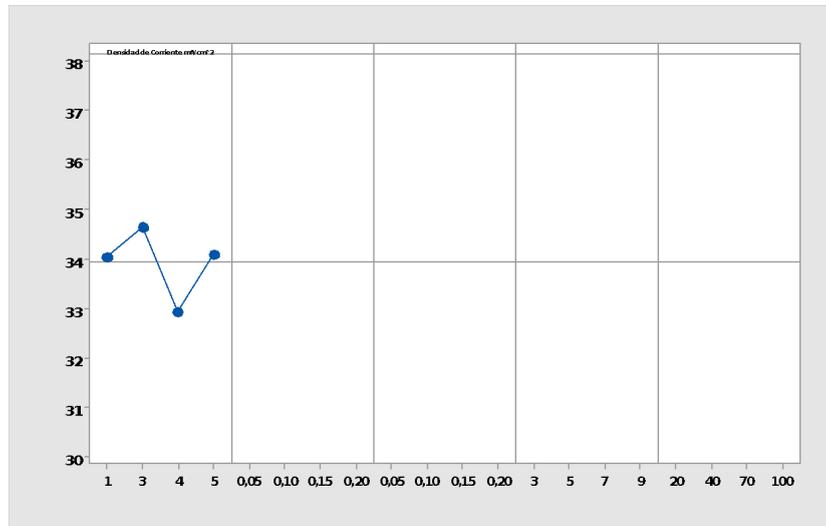
Parámetro	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Máximo-Mínimo	
Temperatura °C (A)	30,46	32,85	37,18	35,25	6,72	
CoSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O (mol/L) (B)	34,84	32,89	33,75	34,26	1,95	
pH del electrolito	33,19	33,24	34,99	34,31	1,79	
Densidad de Corriente (mA/cm <sup>2</sup> ) (D)	34,04	34,65	32,95	34,10	1,70	
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (mol/L) (C)	33,78	34,01	34,31	33,64	0,67	
Desviación estándar	A	-30,54	-32,96	-37,19	-35,28	6,65
	B	-34,86	-33,00	-33,82	-34,28	1,86
	C	-33,27	-33,33	-35,01	-34,34	1,74
	D	-34,13	-34,71	-32,98	-34,14	1,73
	E	-33,81	-34,09	-34,36	-33,71	0,65



**Figura 1. Efecto de los factores de control sobre la dureza de depósitos de W-Co: gráfico de medias.**

El análisis de los resultados sobre la base de la desviación estándar (Tabla 4) revela que la

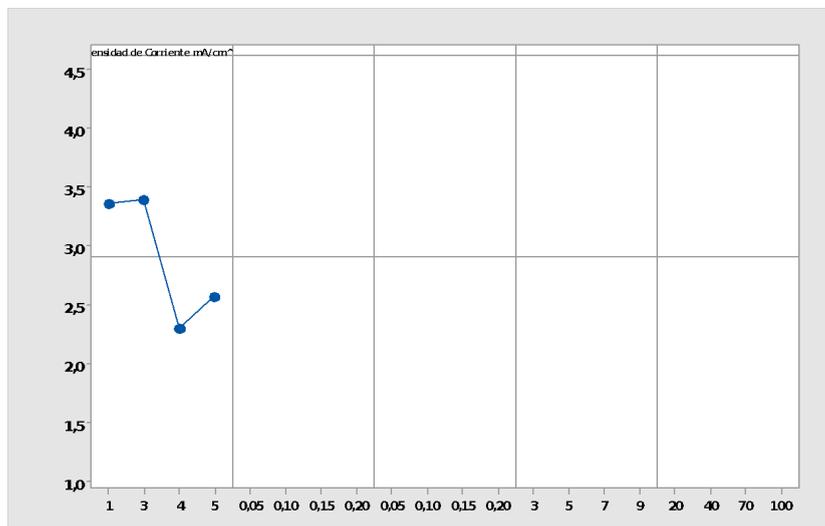
variación de los datos es muy sensible a la variación de la temperatura.



**Figura 2. Efecto de los factores de control sobre la dureza de depósitos de W-Co obtenidos por electrodeposición: gráfico de las relaciones señal a ruido.**

En las figuras 1 y 2 se puede notar que la influencia de la temperatura y el contenido de las sales de cobalto en el electrolito son muy significativos, mientras que la concentración de las sales de

wolframio es el factor que menos influye en el proceso dentro de los niveles en que se ha utilizado en los experimentos.

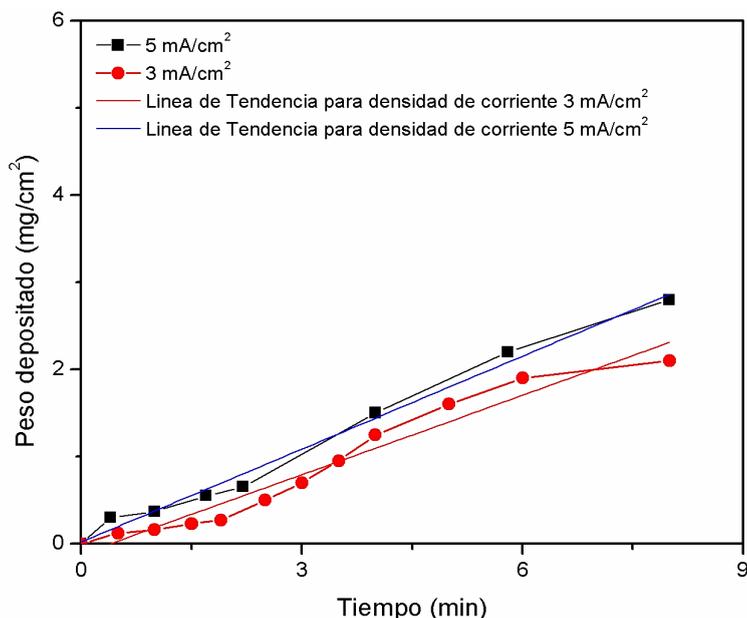


**Figura 3. Gráfica de medias para desviación estándar.**

La gráfica de medias de la desviación estándar comparada con las gráficas de relaciones S/N y media de medias permite seleccionar la combinación de niveles de parámetros que optimizan la dureza de los recubrimientos con la menor variación. Esto ocurre cuando se obtiene la

siguiente combinación de parámetros: concentración de sales de cobalto de 0,05 mol/L, densidad de corriente 5 mA/cm<sup>2</sup>, concentración de sales de wolframio 0,15 a 0,20 mol/L, pH neutro y T en 70°C. Los resultados experimentales de los depósitos obtenidos al combinar las condiciones

establecidas en el diseño de parámetros de Taguchi se muestran en la figura 4.



**Figura 4.** Peso depositado en función del tiempo en la obtención de recubrimientos de W-Co por electrodeposición cuando se ha empleado una temperatura de 70 °C; pH 7,6. La composición del baño empleado se muestra en la tabla 5.

Con el fin de conocer la significación estadística de diferentes factores en la dureza, se realizó un análisis multivariado de varianza (MANOVA), que es un procedimiento para probar la igualdad de los vectores de medios de múltiples respuestas. La Tabla 6 muestra los resultados de MANOVA. Los valores de P reportados en la última columna de la tabla corroboran que la temperatura es altamente

significativa ( $P < 0,1$ ), al igual que el pH del electrolito. La figura 5 muestra los gráficos de interacción para los factores de control. Los resultados determinan que la interacción entre la temperatura empleada en el proceso y la concentración de sales de cobalto es altamente significativa.

**Tabla 5:** Composición de baño electrolítico empleado en la electrodeposición de recubrimientos de W-Co correspondientes a figura 4

Sulfato de cobalto (CoSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O)	0,05 mol/l
Ácido Cítrico (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2 H <sub>2</sub> O)	0,50 mol/l
Tungstato de Sodio (Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O)	0,15 mol/l
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	0,60 mol/l
Bromuro de sodio (NaBr)	0,15 mol/l
Sacarina	0,60 g/l
Dodecibenceno sulfonato de sodio (C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NaO <sub>3</sub> S)	0,60 g/l
pH	7,6

**Tabla 6.** Análisis MANOVA

Fuente	GLa	SC Secc	Sc. Ajustc	Mc Ajustd	Fe	Pf
Temperatura °C (A)	3	17742	17771	5923	6,93	0,022
CoSO <sub>4</sub> .7.H <sub>2</sub> O (mol/L) (B)	3	2422	2228	5923	0,87	0,5
pH del electrolito	3	3996	3383	1127	3,70	0,081
Densidad de Corriente (mA/cm <sup>2</sup> ) (D)	3	21358	15365	5122	0,86	0,495
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (mol/L) (C)	3	797	797	266	0,03	0,992

Error Residual	6	5130	5130	855		
Total	21	25375				

a GL: Grado de libertad.

b Sc SEC: Sumas secuenciales de los cuadrados (mide la reducción de las sumas de cuadrados residuales proporcionados por cada factor de control adicional en el modelo).

c Sc Ajust: Sumas de cuadrados ajustadas (mide la reducción de las sumas de cuadrados residuales proporcionados por cada factor de control en relación con un modelo que contiene todos los otros factores de control).

d Mc Ajust: Media ajustada

e F: Prueba estadística F

f P: Valor probable

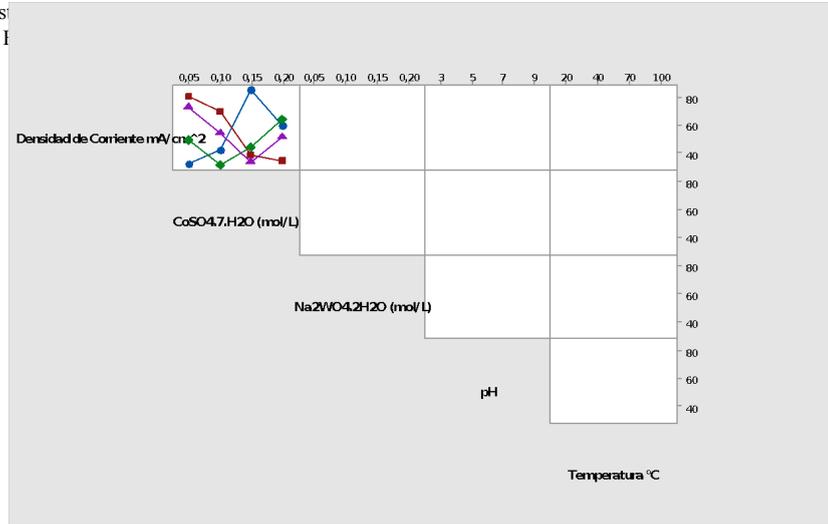
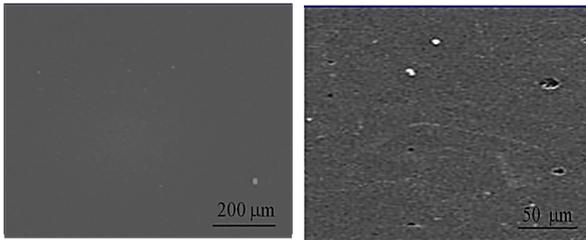


Figura 5. Gráfica de interacción entre factores de control para la electrodeposición de recubrimientos de W-Co cuando la variable respuesta es la dureza.

El aspecto de las películas de W-Co obtenidas sobre acero observadas en microscopio metalográfico



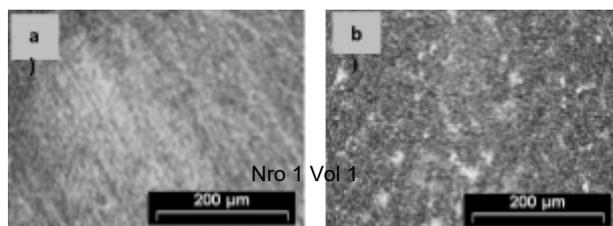
A fin de poder realizar una comparación entre los valores de dureza y la resistencia a la corrosión de recubrimientos de W-Co y recubrimientos de cromo

puede observarse en la figura 6.

duro, se obtuvieron películas de 10 µm de espesor de cromo sobre sustratos planos de acero de bajo contenido de carbono. Se realizó la medición de dureza de dichos recubrimientos de los cuales se registró un valor promedio de 80 HRb, valor similar al obtenido en recubrimientos de W-Co. La composición del electrolito empleado en la obtención de depósitos de cromo duro sobre acero de bajo contenido de carbono se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de trabajo y composición de baño electrolítico empleado en la deposición de recubrimientos de Cromo duro

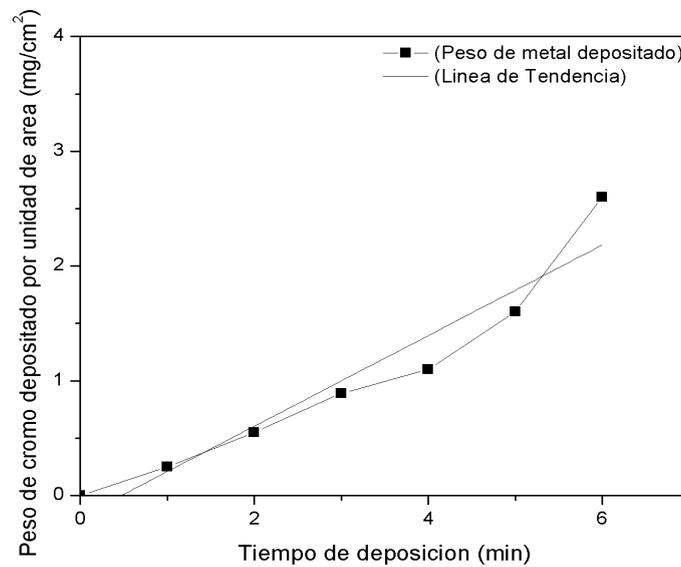
Trióxido de Cromo (CrO3)	250 g/l
Ácido Sulfúrico (H2SO4)	2 g/l
Temperatura	50 °C
Densidad de Corriente (A/dm2)	40
Sacarina	0,60 g/l
Dodecibenceno sulfonato de sodio (C18H29NaO3S)	0,60 g/l
pH	3



**Figura 7. a) Vista superficial del sustrato metálico empleado en este trabajo obtenida por medio de microscopio metalográfico. b) Vista superficial del sustrato recubierto con una capa de cromo duro de acuerdo a las condiciones de trabajo establecidas por la tabla 7. Los resultados experimentales obtenidos al emplear las condiciones establecidas en la Tabla 7 para obtener depósitos de cromo duro (Fig. 7 b)**

La figura 7 muestra micrografías obtenidas mediante microscopía metalográfica de la vista superficial del sustrato metálico empleado (Figura 7 a) y el mismo luego de haber sido recubierto con

una capa de cromo duro obtenida por electrodeposición.



**Figura 8. Peso depositado en función del tiempo en el proceso de cromado bajo condiciones expresadas en la Tabla 7.**

### 5. Descripción del Proceso Innovador

El proceso innovador consiste en el desarrollo de un tipo de recubrimiento similar al cromo duro que sea factible de utilizar en piezas industriales y tuberías como protector frente a la corrosión. A tal fin se ha realizado la electrodeposición de aleación de W-Co desde electrolitos con pH cercano a la neutralidad (pH = 7,6) y libre de cromatos. Se ha

utilizado el diseño experimental de Taguchi a fin de determinar la condición óptima para obtener recubrimientos de aleación de Wolframio-Cobalto desde baños electroquímicos amigables con el medioambiente a los que se ha agregado como agente tensioactivo dodecibenceno sulfonato de sodio.

**Tabla 8. Comparación de procesos con el proceso electroquímico desarrollado**

Variables operativas	Proceso electroquímico de Cromado	Proceso electroquímico innovador de obtención de películas delgadas de W-Co
Temperatura	50 °C	70 °C
Tiempo	20 min (*)	8 minutos

Reactivos químicos	Ácido crómico Ácido Sulfúrico Sulfato de Cobre Sulfato de Níquel	Sulfato de Cobalto Ácido Cítrico Tungstato de Sodio Cloruro de Amonio Bromuro de Sodio Sacarina Dodecibenceno sulfonato de sodio
Dureza HRb para películas de 10 µm de espesor	80	78
Densidad de Corriente empleada (mA/cm <sup>2</sup> )	15 a 50 A/dm <sup>2</sup>	5

(\*) A diferencia de los recubrimientos de W-Co que pueden ser obtenidos en un solo paso, los depósitos de cromo requieren según el sustrato una electrodeposición inicial de cobre, seguida de la electrodeposición de una capa de níquel para finalmente proceder a la deposición de cromo.

## 6. Conclusiones

Para obtener depósitos resistentes a la corrosión, el recubrimiento clásico es el de cromo. Los recubrimientos de cromo duro se consiguen al recubrir la chapa de acero primeramente con cobre, luego con níquel y finalmente con cromo empleando como electrolito baños con presencia de cromo hexavalente. Los depósitos así obtenidos son altamente resistentes a la corrosión. No obstante los baños empleados para conseguir estos depósitos contienen cromatos, altamente perjudiciales para la salud de quienes operan con este tipo de electrolitos. Como alternativa se propone realizar el recubrimiento de objetos ferrosos con capas de aleación de Wolframio-Cobalto. Este tipo de aleación produce resultados similares a los obtenidos con cromo. El diseño experimental de Taguchi puede ser aplicado para optimizar la dureza de las películas de W-Co obtenidas por electrodeposición. Se ha determinado experimentalmente y estadísticamente que la combinación de parámetros óptimos para alcanzar películas de W-Co de alta dureza implica el empleo de temperaturas cercanas a 70°C, una concentración de 0,05 mol/L de sulfato de cobalto en el electrolito, valores de pH cercanos a la neutralidad y la presencia de agentes tensioactivos en el baño electroquímico.

## 7. Referencias

BACAL, P., INDYKA P., STOJEK Z., DONTEN M. Unusual example of induced codeposition of tungsten. Galvanic formation of Cu–W alloy. *Electrochemistry Communications* 54 (2015) 28–31.

BALAK Z. ZAKERI, M. RAHIMPOUR, M. SALAHI, E. Taguchi design and hardness

optimization of ZrB<sub>2</sub>-based composites reinforced with chopped carbon fiber and different additives and prepared by SPS. *Journal of Alloys and Compounds* 639 (2015) 617–625

HOSSEINI, J., BODAGHI A. Corrosion Behavior of Electrodeposited Cobalt-Tungsten Alloy Coatings in NaCl Aqueous Solution. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 7 (2012) 2584 – 2595

IWASAKI H., HIGASHI K., NIEH T. Tensile deformation and microstructure of a nanocrystalline Ni–W alloy produced by electrodeposition. *Scripta Materialia* 50 (2004) 395–399

MANTELL, E. *Electroquímica* 1963; 46:73-84.

OBRADOVIC, M, BONSNJAVOK, G., STEVANOVIC R., MAKSIMOVIC, M. Pulse and direct current plating of Ni–W alloys from ammonia–citrate electrolyte. *Surface & Coatings Technology* 200 (2006) 4201– 4207.

SONG, G., XU G., QUAN Y., YUAN Q., DAVIES, P. Uniform design for the optimization of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanofilms produced by electrophoretic deposition.

TSYNTSARU, N., CESILIUS H., PELLICER E., CELIS J., SORT J. Structural, magnetic, and mechanical properties of electrodeposited cobalt–tungsten alloys: Intrinsic and extrinsic interdependencies. *Electrochimica Acta* 104 (2014) 94– 103.

ZHANG, F. WANG, Z. YANG M. Assessing the applicability of the Taguchi design method to an interrill erosion study. *Journal of Hydrology* 521 (2015) 65–73