

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

Número 8

Enero - diciembre 2013

INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY





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

Equipo editorial

Dirección

Dr. Jorge Silveira, Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

Consejo editorial

Ing. Jorge Castro, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

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

MBA. Ing. Mariela De Giuda, Gerente de Tecnología y Gestión en Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

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

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

Dr. Q.F. Tomás López, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

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

MSc. Ing. Daniel Volpe, Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

Edición

Lic. Marina Barrientos, Edición Revistas INNOTEC. Centro de Información Técnica. Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

Administración de OJS y soporte técnico

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

Diseño

Lic. Claudia de Armas

Acerca de INNOTEC

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

Reúne trabajos originales con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica con el fin de contribuir a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico. La transferencia de conocimiento y el intercambio con la comunidad son objetivos prioritarios de INNOTEC. Nuestra publicación está dirigida a investigadores, académicos, tecnólogos y estudiantes vinculados a los campos temáticos que aborda y que responden a las áreas estratégicas de investigación del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU): Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Google Académico, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.

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

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

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

INNOTEC - NÚMERO 8 - Enero a diciembre 2013

ISSN 1688-3691

Título clave: INNOTEC

Título clave abreviado: Innotec

ISSN electrónico: 1510-6593

Título clave: 1510-6593

Título clave abreviado: Innotec [en línea]

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598)2601 3724 int. 1314 y 1350

ditec@latu.org.uy

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

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

<http://citein.blogspot.com>

SUMARIO

Instrucciones a los autores.....	3
Índice de autores.....	67
Índice temático	68

Política editorial LATU

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

Misión

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

Los objetivos específicos son:

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

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

FORESTALES

- 5 **Contracción, hinchamiento y peso específico aparente de madera de eucalipto colorado (*Eucalyptus tereticornis* Smith)**
Cardoso, Andrea; Cagno, Matías; Cárdenas, Patricia; Gatto, Francisco.

METROLOGÍA

- 13 **Aspectos computacionales en la estimación de incertidumbres de ensayo por el Método de Monte Carlo**
Constantino, Pablo.

AGUAS

- 23 **Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en enriquecimientos bacterianos provenientes de cursos de agua superficial de Uruguay**
Da Cunha, Jonathan; Pinelli, Laura; Bellini, María Inés; Davyt, Danilo; Fernández-Scavino, Ana.

TECNOLOGÍA ALIMENTARIA

- 30 **Estudio comparativo de la estabilidad lipídica de harinas de soja, sorgo, avena, salvado y germen de trigo con y sin extrusión**
Crosa, María José; Curia, Ana; Curutchet, Ana; Cadenazzi, Mónica; Dotta, Gabriela; Ferreyra, Verónica; Maidana, Fabianna; Souto, Laura; Escudero, Jorge.
- 39 **Efecto de la incorporación de transglutaminasa microbiana en las propiedades sensoriales de hamburguesas de desmenuzado de merluza (*Merluccius hubbsi*)**
Panuncio, Alicia; Cardeza, Luciana; Quintero, Mariana; Solé, María Laura; Barrios, Sofía; Gámbaro, Adriana.
- 44 **Determinación de la actividad endo-proteolítica en cebada malteada**
Gómez Guerrero, Blanca; Edney, Michael J.
- 52 **Evaluación de la calidad higiénico sanitaria y de composición de leche de cabra en un rebaño de la raza Saanen**
Grille, Lucía; Carro, Silvana; Escobar, Daniela; Bentancor, Lorena; Borges, Alejandra; Cruz, Daniel; González, Silvana.
- 60 **Efecto de la congelación de leche caprina sobre la estabilidad oxidativa, calidad higiénico sanitaria y de composición en un rebaño de la raza Saanen**
Grille, Lucía; Carro, Silvana; Escobar, Daniela; Fros, Carolina; Cousillas, Georgina; Lazzarini, Florencia; Borges, Alejandra; González, Silvana.

Instrucciones a los autores para publicar en INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en campos temáticos que responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU: Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

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

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

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

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

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

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

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

(e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.

(f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente. Los artículos son publicados en papel y online. La versión digital se distribuye bajo la modalidad de acceso abierto, y los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 3.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

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

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

Proceso de revisión

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

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

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

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

Normas de presentación y envío de los textos

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

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

Nota: El nombre de los autores deberá ser incluido en los metadatos en la forma en la que se solicita a continuación, pero omitido en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

Definiciones

Autor. Persona o colectividad responsable del contenido intelectual o artístico de un documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, en un máximo de dos líneas. Es neutro e informativo.

Resumen. Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

Introducción. Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

Materiales y Métodos. Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

Resultados. Presentación y expresión de los mismos en tablas y figuras.

Discusión (Conclusión). Se sigue el orden de presentación o el orden de importancia de los resultados. Se priorizan aquellos resultados que surgieron del diseño experimental. Se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo.

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

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

Formato de los artículos

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

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

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

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras, gráficos e imágenes).

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

Fórmulas, figuras, tablas e imágenes. Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior a las mismas. Si es necesario incluir fotos o imágenes, éstas se deben designar como figuras. Las fotos deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de impresión). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Se deben numerar según el orden de aparición en el texto, incluyendo un título explicativo en la parte inferior de la tabla. Evitar utilizar líneas verticales y en la medida de lo posible no incluir más de dos tablas por carilla, no dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto.

El texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, éstas deben explicarse en sí mismas. **Además de estar insertadas en el artículo, cada figura y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS,** con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Por favor, evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

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

Denominaciones en latín: Deben ir en cursiva.

Estilo de citas y referencias

Ejemplos usuales de citas

-Registro de citas textuales

(López, 1985, p. 93)

(González y Rubio, 1990, p. 110-111)

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

-Para más de una obra del mismo autor y año

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

(Alonso, 1988b, p. 84)

-Registro de cita ideológica o paráfrasis

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

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

Ejemplos usuales de referencias

Monografías (Libros)

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

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

Revistas como un todo

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

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

Artículos de revistas

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

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

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

Normas

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

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

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

Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

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

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

Patentes

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

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

Contracción, hinchamiento y peso específico aparente de madera de eucalipto colorado (*Eucalyptus tereticornis* Smith)

Shrinkage, swelling and apparent specific gravity of red gum (*Eucalyptus tereticornis* Smith)

Cardoso, Andrea ⁽¹⁾, Cagno, Matías ⁽¹⁾, Cárdenas, Patricia ⁽¹⁾, Gatto, Francisco ⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Proyectos Forestales, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay

Contacto: acardoso@latu.org.uy

Recibido: 12/6/2013 - Aprobado: 30/10/2013

Resumen

Con el objetivo de contribuir al conocimiento del comportamiento de la madera de *Eucalyptus tereticornis* en Uruguay, se estudió la contracción y el hinchamiento lineal y volumétrico para diferentes condiciones de humedad relativa, a una temperatura de 25 °C. Se construyó una isoterma parcial dándole importancia a las condiciones de humedad de equilibrio en las que es posible encontrar productos realizados con esta madera en Uruguay, por ejemplo, pisos interiores o exteriores.

De cinco árboles de una cortina de 50 años ubicada en el departamento de Durazno se seleccionaron discos a dos alturas. A partir de estas se prepararon probetas para las determinaciones de contracción e hinchamiento. Se encontró que el peso específico aparente básico fue de 0,630, al 12% de contenido de humedad fue de 0,859 y al 15 % de 0,872. La contracción radial, tangencial y volumétrica fue de 7,04%, 14,70% y 20,64%, respectivamente, y el hinchamiento radial fue de 7,61%, el tangencial de 17,61% y 26,62% el volumétrico. Sobre la isoterma se observó una diferencia esperable entre la curva de sorción y la de desorción en el rango de humedad relativa estudiado de 53% a 84%.

Palabras clave: Histéresis, humedad de equilibrio, isoterma, densidad.

Abstract

With the aim of contributing to the knowledge of the behavior of *Eucalyptus tereticornis* wood in Uruguay, a study of linear and volumetric shrinkage and swelling at different conditions of relative humidity at a temperature of 25 °C was made. From these data, a partial isotherm was built giving importance to the equilibrium moisture conditions in which it is possible to find products with this wood, e.g. floors and decks.

Five trees from a 50 years old shelter belt located in Durazno were randomly selected. Discs were collected at two heights in each tree from which specimens were prepared for shrinkage and swelling test. It was found that the basic apparent specific gravity was 0,630, 0,859 at 12% and 0,872 at 15% of moisture content. The radial, tangential and volumetric shrinkage was 7,04%, 14,7% and 20,64%, respectively, and the radial, tangential and volumetric swelling was 7,61%, 17,61% and 26,62%. It was observed an expected difference between the curve of sorption and desorption in the studied range of relative humidity from 53% to 84%.

Keywords: Hysteresis, equilibrium moisture, isotherm, density.

Introducción

En Uruguay, aunque actualmente es posible encontrar madera de *Eucalyptus tereticornis* casi únicamente en cortinas de abrigo y sombra (MGAP-DGF, 2012), la madera de esta especie es considerada como apta para la obtención de productos de alto valor agregado, así como para la fabricación de pisos, escalones, marcos de puertas y ventanas, en construcciones pesadas y estructuras como soportes enterrados, paneles para pisos, vigas, entre otros (Bootle, 1983; Boas, 1947; FWPA, 2013).

El análisis del comportamiento de la madera de esta especie, frente a las diferentes condiciones ambientales en las que es posible encontrarla en nuestro país, es una necesidad para mejorar su uso y

evitar que se produzcan deformaciones y grietas en los productos. Este trabajo es de importancia para la caracterización respecto a la estabilidad dimensional de la madera proveniente de árboles añosos, ya que es el material que principalmente se puede encontrar de *E. tereticornis* en las carpinterías y aserraderos nacionales.

En la actualidad, la madera de esta especie se utiliza en Uruguay principalmente en productos de carpintería rural, y al conocer su peso específico, contracción e hinchamiento es posible un incremento en la generación de productos de alto valor agregado.

Este estudio se plantea como objetivo la caracterización de la contracción e hinchamiento radial y tangencial de la madera de *E. tereticornis* y la elaboración de la isoterma higroscópica a 25 °C, enfocándose en las condiciones ambientales más comunes en las que es posible encontrar esta madera en Uruguay. Asimismo, este trabajo

pretende contribuir al conocimiento de la madera de la especie en su aspecto tecnológico para mejorar su uso comercial.

Existen antecedentes de datos generados sobre esta especie en el país y en el resto del mundo, en algunas propiedades físicas como el peso específico, la contracción (Bootle, 1983; Coronel, 1994; Mantero, 1999; FWPA, 2013) y el hinchamiento (Coronel, 1994), así como algunas propiedades mecánicas de la madera (dureza, flexión estática y compresión) y durabilidad natural (Bootle, 1983; Mantero, 1999; FWPA, 2013).

Considerar la estabilidad dimensional de cada madera es fundamental para adecuar los usos de los productos maderables. Autores como Coronel (1994) realizan una clasificación de los usos posibles para las maderas según los coeficientes de contracción-hinchamiento. Etchenique et al. (1975) y Ordóñez et al. (1990) también generaron criterios para clasificar la estabilidad dimensional de la madera. Las categorías de cada una se presentan en la Tabla 1.

Clasificación	Categoría	Coefficiente de anisotropía
Según usos posibles (Coronel, 1994)	Excelente	1,2 - 1,5
	Normales	1,6 - 1,9
	Con dificultades	> 2,0
Según índice de distorsiones y alabeos (Etchenique et al., 1975)	Baja	1,0 - 1,7
	Alta	1,7 - 2,3
	Muy alta	> 2,3
Según la estabilidad dimensional (Ordóñez et al., 1990)	Muy estable	< 1,5
	Estable	1,5 - 2,0
	Moderadamente estable	2,0 - 2,5
	Inestable	2,5 - 3,0
	Muy inestable	> 3,0

Tabla 1. Criterios de clasificación según coeficiente de anisotropía (CT/CR).

Debido a la heterogeneidad que presenta el material es necesario su análisis en el radio, es decir, de médula a corteza, y en altura. Coronel (1994) indica que los valores de contracción e hinchamiento son mayores en la medida que aumenta el peso específico aparente. Calvo (2006) obtiene resultados que conciben con esta tendencia para árboles más jóvenes (17 años) de *Eucalyptus grandis* con un peso específico aparente anhidro de 0,562.

Por otro lado, en un estudio realizado a partir de árboles de *Eucalyptus bosistoana* de 42 años cultivados en Uruguay se observó una tendencia diferente a la indicada por los autores citados, en la cual el peso específico aparente básico crece pero la contracción radial y tangencial disminuyen hacia una posición cercana a la corteza (Cardoso y Castagna, 2012).

Kollmann y Coté (1984), remitiendo a varios autores, relacionan la variación transversal de la contracción de la madera con las alternancias de los incrementos de leño temprano-tardío en los anillos de crecimiento (Mörath, 1931), las características de la estructura de la pared celular como el ángulo de las fibras (Frey y Wyssling, 1940), y las puntuaciones (Cockwell, 1946) y la composición química de la laminilla media (Frey y Wyssling, 1940).

Materiales y Métodos

La madera de *E. tereticornis* se obtuvo de una cortina de 50 años de edad ubicada en San Jorge, departamento de Durazno, perteneciente a un predio del Grupo Forestal San Gregorio. Se seleccionaron cinco árboles al azar, de los que se obtuvo una troza de 3,5 m, de esta se sacaron dos discos de cada extremo, uno en altura 0 y otro a 3,5 m de altura (Figura 1). Los árboles tenían un promedio de diámetro

máximo y mínimo en la altura basal de 542 mm y de 360 mm, respectivamente. En altura los mismos diámetros eran de 440 mm y 319 mm. La preparación de las probetas se realizó en el Departamento de Proyectos Forestales de LATU (DPF-LATU).

Preparación de probetas

Para la preparación, acondicionamiento y obtención de las probetas para el ensayo de contracción e hinchamiento se siguió la norma UNIT 363:2008.

De cada uno de los discos se obtuvieron prismas (o preprobetas) distribuidos en el radio, como se muestra en la Figura 1, desde una posición cercana a la médula hasta una cercana a la corteza.

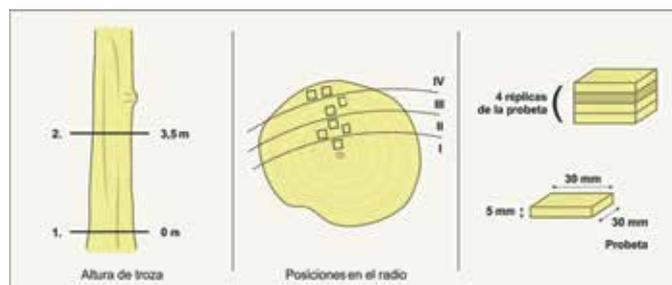


Figura 1. Detalle de la obtención de la troza y preparación de probetas.

Por las características que presentaban los árboles al formar parte de una cortina forestal sin manejo y ser especímenes adultos con madera de tensión y diferentes diámetros de sección, se dificultó la obtención de igual número de prismas en los radios. Los prismas fueron ubicados evitando defectos de la madera, tales como presencia de nudos, desviaciones en la fibra y madera de tensión.

A efectos de simplificar el análisis se dividió el radio en cuatro áreas, se contó el número de prismas incluidos en cada área y se trabajó con un resultado promedio de estos para cada propiedad. En la Tabla 2 se muestra el número de prismas por posición y altura tomadas.

Número de prismas		
ALTURA	POSICIÓN	Nº
1	I	9
	II	12
	III	8
	IV	10
	SUB-TOTAL	39
2	I	3
	II	11
	III	12
	IV	12
	SUB-TOTAL	38
TOTAL		77

Tabla 2. Número de prismas por posición en el radio de médula a corteza (I - IV) y por altura (1 y 2).

Los prismas fueron sumergidos en agua hasta estar saturados completamente. Se sacaron cuatro probetas por prisma; estas réplicas son para evitar perder el dato en caso de que existiera colapso o se presentaran grietas. Las probetas tenían una dimensión de 30 mm de ancho, 30 mm de espesor y 5 mm de altura (Figura 1).

Como se aprecia en la Tabla 2, en la altura 1 se trabajó con un total de 39 prismas, en la altura 2 con 38 prismas, cada uno con 4 réplicas, lo que hace un total de 308 probetas medidas, distribuidas en las 4 posiciones y en las 2 alturas.

Proceso de desorción de la madera

El proceso de desorción de la madera consiste en la pérdida de humedad de la misma, bajo diferentes condiciones de humedad relativa y de temperatura del aire, lo que implica una variación en las dimensiones iniciales. Esta variación en las dimensiones se llama contracción (Kollmann y Coté, 1984).

A una misma temperatura si se baja la humedad relativa se logra ir disminuyendo el contenido de humedad de equilibrio de la madera (Kollmann y Coté, 1984).

Se utilizaron diferentes humedades relativas a una misma temperatura (25 °C), generando diferentes condiciones de humedades de equilibrio en la madera. Las humedades relativas variaron entre 84%, 76%, 63% y 53% como se puede ver en la Tabla 3, teniendo en cuenta los diferentes ambientes en los que puede utilizarse la madera.

Humedad relativa a 25 °C de temperatura	Humedad de equilibrio de la madera	Posibles usos
84%	18%	Pisos, aberturas y muebles en el exterior
76%	15%	
63%	12%	Pisos, aberturas y muebles en el interior
53%	8%	

Tabla 3. Condiciones de humedad relativa, humedad de equilibrio y posibles usos.

Se realizaron mediciones de las dimensiones en sentido radial y tangencial con micrómetro digital Sony DZ-501 y se tomó el peso en balanza analítica de cada una de las probetas en estado verde y en cada uno de los estados de equilibrio a la temperatura de 25 °C.

Para evitar el colapso de las probetas, luego de las mediciones en estado verde éstas se fueron secando gradualmente. Este secado consistió en la disminución de la humedad inicial (verde) de las probetas hasta un contenido de humedad aproximado de 26%, para evitar la pérdida vertiginosa del agua que se ocasionaría si se colocaran directamente a condiciones de 18% de humedad de equilibrio. Esto se realizó en un ambiente cerrado con presencia de bandejas de agua que aseguraban una humedad relativa alta en el ambiente.

Cuando el contenido de humedad aproximado fue de 26%, se colocaron las probetas en la cámara de acondicionamiento Advantec AG-327 en condiciones iniciales de 25 °C de temperatura y 84% de humedad relativa. Para controlar las condiciones de equilibrio se utilizaron probetas testigo que fueron pesadas hasta que llegaron a un peso constante, infiriendo así que todas las probetas alcanzaron el contenido de humedad de equilibrio en las condiciones establecidas.

Proceso de sorción de la madera

El proceso de sorción consiste en la absorción de humedad por la madera hasta un estado de equilibrio con las condiciones de temperatura y humedad relativa del aire, lo que implica un cambio en las dimensiones de las probetas que se denomina hinchamiento (Kollmann y Coté, 1984).

Una vez terminado el proceso de desorción se comenzó el proceso

de aumento de la humedad relativa ambiente en la misma cámara. Se tomaron registros de las dimensiones y el peso de las probetas en las condiciones de equilibrio 63%, 76% y 84% de humedad relativa a la misma temperatura de 25 °C. Las determinaciones se realizaron de la misma forma que en el proceso de desorción.

La Tabla 4 presenta los tiempos que demoraron las probetas en alcanzar las condiciones de equilibrio determinadas para ambos procesos.

	Humedad relativa a 25 °C de temperatura	Tiempo (días) en alcanzar la condición de equilibrio
Proceso de desorción	84%	7
	76%	28
	63%	40
	53%	62
Proceso de sorción	63%	11
	76%	26
	84%	24

Tabla 4. Condiciones de humedad relativa, temperatura y tiempos de duración para los procesos de sorción y desorción.

Peso específico aparente (PEA) y contenido de humedad

El peso específico aparente básico se determina como la relación entre el peso anhidro de cada probeta y su volumen en estado verde según la norma ASTM D2395, Método B. Se calculó también el peso específico aparente en las condiciones de 15% y 12% de humedad de equilibrio según la norma ASTM D2395, Método A.

El contenido de humedad se determinó para cada una de las probetas en cada uno de los estados de equilibrio según ASTM D4442, Método B.

Contracción e hinchamiento lineal y volumétrico

La contracción lineal se define como el cociente entre la diferencia de dimensiones lineales de un estado a otro de menor humedad y la dimensión en estado saturado. El hinchamiento lineal relaciona la diferencia de dimensiones lineales de un estado a otro de mayor humedad con la misma dimensión en estado anhidro (Coronel, 1994).

Para la determinación de los valores de contracción e hinchamiento de la madera se utilizan las dimensiones en sentido radial y tangencial de las probetas. Se calculan valores para cada uno de los estados de equilibrio en los procesos de desorción y sorción.

Para los cálculos de la contracción (C) y el hinchamiento (H) volumétrico se utiliza la fórmula citada en Coronel (1994) y Kollmann y Coté (1984):

$$C = 1 - (1 - Ct) * (1 - Cr) * (1 - Cl)$$

Donde Ct, Cr y Cl son contracción tangencial, radial y longitudinal, respectivamente.

$$H = (1 + Ht) * (1 + Hr) * (1 + Hl) - 1$$

Donde Ht, Hr y Hl son hinchamiento tangencial, radial y longitudinal, respectivamente.

La variación dimensional en el sentido longitudinal para la contracción y el hinchamiento se considera despreciable (Kollmann y Coté, 1984; Coronel, 1994).

Isoterma higroscópica a 25 °C

Para construir la isoterma higroscópica se fueron variando las condiciones de humedad relativa del aire manteniendo constante la temperatura a 25 °C.

Análisis de datos

Para el análisis de los resultados se trabajó con las observaciones que se encontraron dentro de tres desvíos respecto a la media (ISO 7870-1:1993). Los datos que quedaron fuera de los límites coincidieron con probetas que presentaron colapso.

La estadística descriptiva de los datos para caracterizar la madera fue realizada en planilla de cálculo Excel. Para el análisis en el radio y en altura se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey, con un nivel de significación al 5% utilizando el programa estadístico InfoStat 2011.

Se determinó el PEA básico al 12% y al 15%, de manera de caracterizar la madera en estudio y comparar los resultados obtenidos con otros trabajos. Se analizó el PEA básico entre las dos alturas, y en el radio para las dos alturas.

Se determinó la contracción e hinchamiento máximo radial y tangencial de la madera en la altura y en el radio. Además, para las diferentes humedades de equilibrio obtenidas se determinó la contracción y el hinchamiento radial y tangencial.

Se correlacionó gráficamente el contenido de humedad de equilibrio y la humedad relativa del ambiente presentando parte de la isoterma higroscópica a 25 °C.

Por último se calcularon los coeficientes de anisotropía para la contracción y el hinchamiento, así como el coeficiente de histéresis de la madera para compararla con otras.

Resultados y Discusión

Peso específico aparente

La madera presentó un peso específico aparente básico promedio de 0,630 con un desvío estándar de 0,07. Si se compara con resultados publicados en Australia por Kingston y Risdon (1961) y por Bootle (1983), quienes establecieron valores de 0,780 y 0,900, respectivamente, los obtenidos en el trabajo son menores. El resultado es similar al obtenido por Mantero (1999) de 0,680 con un desvío estándar de 0,07.

Se obtuvieron los resultados del peso específico para valores de contenido de humedad de 12% y 15% de 0,859 y 0,872. Si se los compara con valores presentados por Boas (1947) al 12% (0,977) y por el Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Brasil (1956) al 15% (0,950) estos son menores. Si se compara con datos publicados en Uruguay por Tuset y García Taibo (1987) al 12% (0,820) y por Mantero (1999), de 0,830, los resultados obtenidos en este trabajo fueron mayores.

Se analizó el PEA básico para las dos alturas y no se encontraron diferencias significativas al 5%.

En el análisis del PEA en el radio a las dos alturas se observó diferencias significativas entre las posiciones, como se muestra en los Gráficos 1 y 2. Para la altura basal (1) la posición mas cercana a la médula fue la única que presentó diferencia con respecto a las demás posiciones (II, III y IV). Para la altura 2 se observó que entre la posición I y II no hubo diferencias significativas, pero si existió diferencia entre la posición I en comparación con las III y IV.

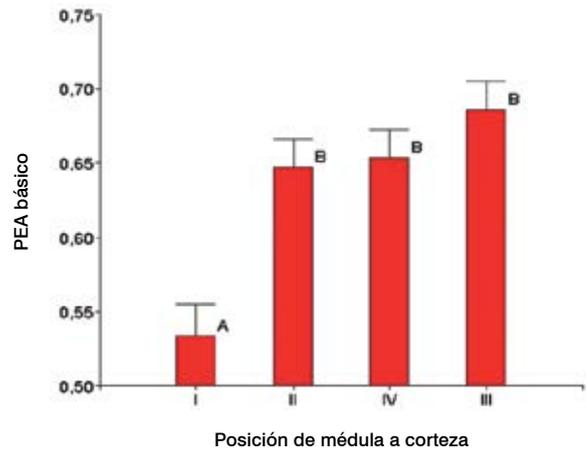


Gráfico 1. Comparación de las medias del peso específico aparente básico en las cuatro posiciones en el radio para la altura 1.

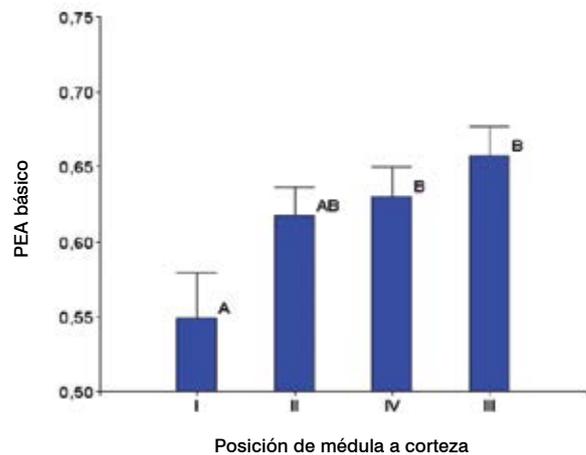


Gráfico 2. Comparación de las medias del peso específico aparente básico en las cuatro posiciones en el radio para la altura 2.

En las dos alturas, el peso específico de la madera es mayor en la posición cercana a la corteza.

Contenido de humedad de equilibrio (CHE)

Con respecto a las condiciones de contenido de humedad de equilibrio alcanzadas en las diferentes humedades relativas (HR), estos resultados se presentan en la Tabla 5.

	Proceso de desorción				Proceso de sorción		
HR a 25°C	84%	76%	63%	53%	63%	76%	84%
	CHE (%)						
Máximo	26,6	21,6	16,5	14,3	15,4	17,7	19,8
Mínimo	21,5	17,9	13,9	12,1	13,1	15,1	16,9
Promedio	23,6	19,8	15,1	13,0	14,1	16,4	18,3
Desvío estándar	1,14	0,69	0,49	0,48	0,47	0,50	0,53
Coef. de variación (%)	4,83	3,50	3,26	3,66	3,36	3,03	2,90

Tabla 5. Contenido de humedad de equilibrio (%) para las diferentes condiciones de humedad relativa (%) en ambos procesos.

Contracción e hinchamiento para *E. tereticornis*

Se analizó la contracción y el hinchamiento máximo para la madera y los resultados se expresan en la Tabla 6.

	Contracción máxima (%)			Hinchamiento máximo (%)		
	Radial	Tangencial	Volumétrica	Radial	Tangencial	Volumétrica
Máximo	10,68	28,22	33,12	11,95	39,31	49,52
Mínimo	4,03	5,06	12,24	4,20	5,32	13,95
Promedio	7,04	14,70	20,64	7,61	17,61	26,62
Desvío estándar	1,60	4,72	5,44	1,86	6,80	9,04
Coef. de variación (%)	22,69	32,08	26,36	24,39	38,60	33,94

Tabla 6. Resumen de contracción e hinchamiento máximo, lineal y volumétrico.

Se comparan estos resultados con los presentados por Coronel (1994) para la misma especie. Los valores que obtiene este último son 7,77% y 10,53% para contracción radial y tangencial, respectivamente, con coeficientes de variación similares respecto a los resultados obtenidos. Los valores para el hinchamiento radial y tangencial según Coronel (1994) son 6,74% y 11,88%, respectivamente. Tanto para la contracción como el hinchamiento los resultados obtenidos por Coronel (1994) para madera argentina son menores. Se compararon los resultados de la Tabla 6 con los obtenidos por Mantero (1999), quien obtuvo valores para madera nacional de 7,77% para contracción radial y 13,62% para contracción tangencial, presentando valores de desvíos similares.

La variación en altura de la contracción e hinchamiento lineal solo mostró diferencias significativas en el sentido radial. La altura 1 (basal) presentó una menor contracción e hinchamiento radial que la altura 2. Este comportamiento difiere de lo indicado por Coronel (1994) y de los resultados que presentó Calvo (2006) para *E. grandis* de 17 años, en donde la tendencia del hinchamiento tanto radial como tangencial es de disminuir con la altura.

Se analizó la contracción y el hinchamiento en el sentido radial y tangencial desde una posición cercana a la médula hasta una cercana a la corteza, para las dos alturas. Los resultados se incluyen en la Tabla 7.

Para ambas alturas, la contracción y el hinchamiento lineal disminuyen hacia la posición mas cercana a la corteza. Esto difiere de lo indicado por Coronel (1994) pero es similar al comportamiento que presentaron los árboles de 42 años de *E. bosistoana* según Cardoso y Castagna (2012).

Se analizaron los valores de contracción e hinchamiento lineal para cada uno de los contenidos de humedad de equilibrio alcanzados. Los resultados se presentan en las Tablas 8 y 9.

Se calcularon los coeficientes de anisotropía como la relación entre la variación tangencial y la radial máxima tanto para la contracción, que fue 2,1, como para el hinchamiento, que fue 2,3. Se calculó el coeficiente de anisotropía para las diferentes humedades de equilibrio alcanzadas. Los resultados se encuentran en la Tabla 10. El coeficiente de anisotropía mide la variación dimensional tangencial respecto a la radial siendo uno el valor ideal.

ALTURA 1	HT	CT	HR	CR
I	29,89 a	22,77 a	8,97 a	8,22 a
II	19,75 b	16,34 b	7,50 ab	6,97 ab
III	15,17 bc	13,15 bc	6,29 bc	5,91 bc
IV	11,48 c	10,27 c	5,19 c	4,93 c
ALTURA 2	HT	CT	HR	CR
I	26,25 a	20,78 a	9,98 a	9,07 a
II	21,35 a	17,47 a	9,63 ab	8,77 ab
III	15,21 b	13,14 b	8,09 bc	7,43 bc
IV	11,66 b	10,39 b	6,64 c	6,22 c

Tabla 7. Contracción e hinchamiento lineal promedio (%) por posición en el radio para las dos alturas. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

CONTRACCIÓN	CHE 13%		CHE 15%		CHE 20%		CHE 24%	
	Rad	Tg	Rad	Tg	Rad	Tg	Rad	Tg
Promedio	4,53	11,30	4,07	10,59	3,41	9,50	2,79	8,58
Desvío estándar	1,50	4,86	1,51	4,92	1,59	5,31	1,49	5,19

Tabla 8. Valores promedio de contracción radial y tangencial (%) para los diferentes contenidos de humedad de equilibrio.

HINCHAMIENTO	CHE 13%		CHE 14%		CHE 16%		CHE 18%	
	Rad	Tg	Rad	Tg	Rad	Tg	Rad	Tg
Promedio	2,70	3,99	2,97	4,39	3,54	5,46	4,03	6,48
Desvío estándar	0,38	0,40	0,41	0,39	0,48	0,46	0,55	0,62

Tabla 9. Valores promedio de hinchamiento radial y tangencial (%) para los diferentes contenidos de humedad de equilibrio.

CHE (%)	Coef. anisotropía para la contracción	CHE (%)	Coef. anisotropía para el hinchamiento
24	3,06	18	1,60
20	2,77	16	1,54
15	2,60	14	1,48
13	2,50	13	1,47

Tabla 10. Coeficiente de anisotropía para la contracción y el hinchamiento para cada contenido de humedad de equilibrio alcanzado.

Isoterma higroscópica para *E. tereticornis*

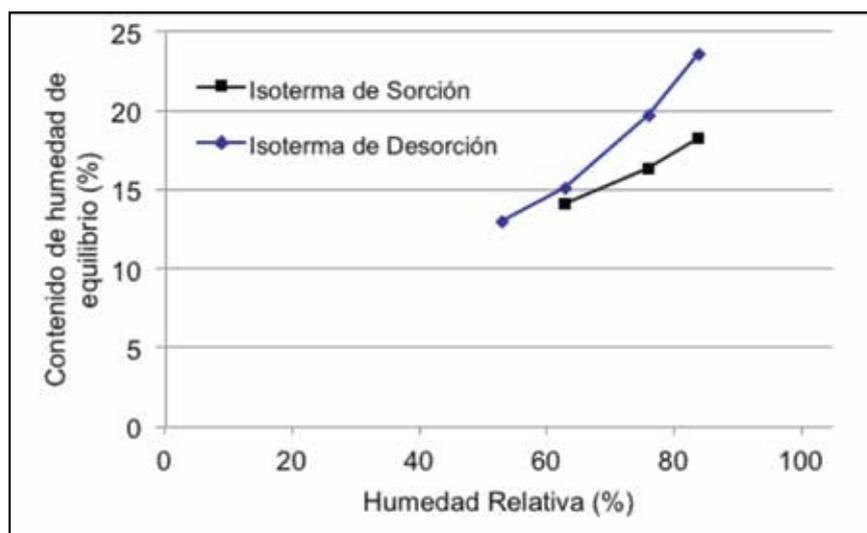


Gráfico 3. Isoterma higroscópica parcial en 25 °C para la madera de *E. tereticornis*.

Se observó una diferencia entre la curva de sorción y la de desorción para la misma temperatura. La histéresis de la madera se considera como la diferencia en contenido de humedad entre la isoterma de desorción y sorción (Kollmann y Coté, 1984). La histéresis es constante a una humedad relativa dada (García, 1990). Coronel (1994) define el coeficiente de histéresis como la relación entre el contenido de humedad de equilibrio de sorción y desorción a una humedad relativa de 85%. Se observó un coeficiente de histéresis de 0,8 para la madera en estudio. Se encontraron valores de referencia de este coeficiente para otras maderas duras en un trabajo realizado por Frank et al. (2002) donde menciona para *Prosopis alba* (Algarrobo blanco) y *Aspidosperma quebracho-blanco* (Quebracho blanco) coeficientes de 0,41 y 0,91, respectivamente. García et al (2004) encontraron un coeficiente de 0,87 para el *Pinus sylvestris L.*

En el proceso de pérdida y ganancia de humedad en la madera se observó una diferencia de las humedades de equilibrio que se hace mayor en la medida que aumenta la humedad relativa. Para una humedad relativa de 63%, la madera presentó una diferencia en el contenido de humedad de equilibrio de 1% entre ambos procesos. La diferencia fue de 3,4% y 5,3% para 76% y 84% de humedad relativa.

Conclusiones

La variación de la contracción y el hinchamiento lineal en el sentido radial del árbol disminuye en la madera más cercana a la corteza, que es la que presentó mayor peso específico aparente. En el análisis en altura no presentaron diferencias significativas las propiedades de contracción e hinchamiento tangencial y peso específico aparente básico, aunque sí la contracción e hinchamiento en sentido radial. Se podría esperar que este comportamiento se explicara por las características anatómicas que podría presentar la madera de árboles de más de 50 años de *E. tereticornis*, como el ángulo de la fibrilla u otras características de la pared secundaria. Esto se debería de corroborar con otros estudios para esta especie.

Según la clasificación realizada por Coronel (1994) para maderas argentinas, la madera estudiada se clasifica como “no apta para varios usos”, dado que presenta un coeficiente de anisotropía de 2,1. Según Etchenique et al. (1975), esta madera está incluida en la categoría de alto índice para distorsiones y alabeos. Ordóñez et al. (1990) clasifican

a la madera como moderadamente estable dimensionalmente.

A pesar de tener 2,1 de coeficiente anisotrópico para la contracción y 2,3 para el hinchamiento, la clasificación no especifica los usos a los cuales hace mención. Es posible utilizar esta madera para algunos productos como pisos de alto tránsito, mobiliario de exterior y cubiertas, productos en los cuales esta anisotropía puede ser tratada por diseño.

Como era esperable, la madera de *E. tereticornis* presenta porcentajes de contracción e hinchamiento comparables con las maderas “nerviosas” o de grandes movimientos. Esto motiva a continuar con los estudios a contenidos de humedad relativa más bajos, completando la isoterma de 25 °C y generando la información necesaria para el conocimiento de esta madera, mejorando sus usos, por ejemplo, en muebles y aberturas.

Este estudio se enfocó en el análisis de un ciclo en el que la madera cedió agua al medio ambiente, contrayéndose, y luego absorbió agua, hinchándose. Es de interés en un próximo estudio continuar con los ciclos de fatiga de la madera, analizando su respuesta.

Reconocimientos

Al Ing. Agr. Alfredo Clement (Grupo Forestal San Gregorio) por proveernos la madera para este estudio.

A los compañeros del Departamento de Proyectos Forestales de LATU.

Referencias

- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (Estados Unidos). ASTM D4442: *Test methods for direct moisture content measurement of wood and wood-base materials*. Baltimore: ASTM, 2002
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (Estados Unidos). ASTM D2395: *Test methods for specific gravity of wood and wood-base materials*. Baltimore: ASTM, 2002
- BOAS, I.R. *The commercial timbers of Australia; their properties and uses*. Melbourne: CSIRO, 1947.
- BOOTLE, K. R. *Wood in Australia; types, properties and uses*. Sydney: McGraw-Hill, 1983. ISBN 0074510479.
- CALVO, A.F.; CORTINA, A.D.; CUFFRÉ, A.G.; PITER, J.C.; STEFANI, P.M.; TORRÁN, E.A. Variación radial y axial del

- hinchamiento, del factor anisotrópico y de la densidad, en el *Eucalyptus grandis* de Argentina. En: *Maderas. Ciencia y Tecnología*. 2006, 8(3):159-168.
- CARDOSO, A.; CASTAGNA, A. *Caracterización de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de una población de Eucalyptus bosistoana cultivado en Uruguay*. Montevideo: Facultad de Agronomía, 2012.
 - COCWELL, A. Influence of fibril angle on longitudinal shrinkage of ponderosa pine wood. En: *J. Forestry*. 1946, 44:876-878. Citado en: KOLLMANN, F.; COTÉ, W. *Principles of wood science and technology*. V. 1. 2da ed. Berlin: Springer Verlag, 1984. 592 p. ISBN: 0-387-04297-0
 - CORONEL, E. *Fundamentos de las propiedades físicas y mecánicas de las maderas; aspectos teóricos y prácticos para la determinación de las propiedades y sus aplicaciones*. Santiago del Estero: El Liberal, 1994. ISBN: 950-43- 6061-0
 - ETCHENIQUE-MANRIQUE, R. [et al.] Caracterización tecnológica de diez especies. Estudio botánico y ecológico de la región de Uxanapa México: INIREB-P.N.I.E.T. ; CONACYT, 1975. pp.61-65. Citado en: FUENTES-TALAVERA, F. J.; SILVIA-GUZMÁN, J. A.; LOMELÍ-RAMÍREZ, M.G.; RICHTER, H.G.; SANJUÁN-DUEÑAS, R. Comportamiento higroscópico de la madera de *Persea americana* var. *guatemalensis* Mill (Hass). En: *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2002, 8(1):49-56.
 - FRANK, W.; SANABRIA, E.O.; PAZ, J. M. El polietilenglicol y las variaciones en las propiedades mecánicas de *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht [En línea]. Corrientes: Facultad de Agroindustrias-UNNE, 2002. [Consulta: 4 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/07-Tecnologicas/T-044.pdf>
 - FREY-WYSSLING, A. Die Anisotropie des Schwindmabes auf dem Holzquerschnitt. En: *Holz als Roh- und Werkstoff*. 1940, 3:43-45. Citado en: KOLLMANN, F.; COTÉ, W. *Principles of wood science and technology*. V. 1. 2da ed. Berlin: Springer Verlag, 1984. 592 p. ISBN: 0-387-04297-0
 - FUENTES-TALAVERA, F. J.; SILVIA-GUZMÁN, J. A.; LOMELÍ-RAMÍREZ, M.G.; RICHTER, H.G.; SANJUÁN-DUEÑAS, R. Comportamiento higroscópico de la madera de *Persea americana* var. *guatemalensis* Mill (Hass). En: *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2002, 8(1):49-56.
 - FWPA, WOOD SOLUTIONS. *Forest-red-gum/Eucalyptus tereticornis*. [En línea]. Melbourne: FWPA, 2013. [Consulta: 8 marzo 2013]. Disponible en: <http://www.woodsolutions.com.au/Wood-Species/forest-red-gum>.
 - GARCÍA, ESTEBAN L. *Fatiga higroscópica y dimensional de la madera*. Madrid: Departamento de Ingeniería Forestal de la Escuela Técnica superior de Ingeniería de Montes. Universidad Politécnica de Madrid, 1990. (Tesis de Doctorado)
 - GARCÍA, ESTEBAN L.; GUINDEO CASASÚS, A.; DE PALACIOS, P.; GARCÍA FERNÁNDEZ, F. Histéresis de la madera de *Pinus sylvestris* L. para isoterma de 35°C mediante el método de sales saturadas. En: *Revista Materiales de Construcción*. 2004, 54(276):51-64
 - INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS. Tabelas de resultados obtidos para madeiras nacionais. En: *Boletim Técnico*. 1956, (31):62
 - INSTITUTO URUGUAYO DE NORMAS TÉCNICAS (Uruguay). UNIT 363: *Maderas; determinación de la contracción*. Montevideo: UNIT, 2008.
 - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Suecia). ISO 7870-1: *Control charts – General guide and introduction*. Suecia: ISO, 1993.
 - KINGSTON, R.; RISDON, J. *Shrinkage and density of australian and other South-West Pacific woods*. Clayton South: CSIRO. Forest Products Division, 1961. (Technical Paper; 13)
 - KOLLMANN, F.; COTÉ, W. *Principles of wood science and technology*. V. 1. 2da ed. Berlin: Springer Verlag, 1984. 592 p. ISBN: 0-387-04297-0
 - MANTERO, Carlos. Propiedades físicas y mecánicas de los eucaliptos: *E. grandis*; *E. globulus*; *E. tereticornis*. En: *Uruguay Forestal*. 1999, 21(9):13-16.
 - MGAP-DGF. *Actualización de la cartografía forestal del Uruguay* [En línea]. Montevideo: DGF, 2012. [Consulta: 8 de marzo de 2013]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,20,441,0,S,0,MNU;E;134;2;MNU>
 - MÖRATH, E. *Kolloidchem*. En: Beihefte. 1931, 33:131. Citado en: KOLLMANN, F.; COTÉ, W. *Principles of wood science and technology*. V. 1. 2da ed. Berlin: Springer Verlag, 1984. 592 p. ISBN: 0-387-04297-0
 - ORDÓÑEZ, C.V. R.; BÁCENAS, P., G. M.; QUIRÓZ, A. Características físico-mecánicas de la madera de diez especies de San Pablo Macuiltianguis, Oax. La madera y su Uso. San Pablo: Instituto de Ecología, 1990. Citado en: FUENTES-TALAVERA, F. J.; SILVIA-GUZMÁN, J. A.; LOMELÍ-RAMÍREZ, M.G.; RICHTER, H.G.; SANJUÁN-DUEÑAS, R. Comportamiento higroscópico de la madera de *Persea americana* var. *guatemalensis* Mill (Hass). En: *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 2002, 8(1):49-56.
 - TUSET, R.; GARCIA TAIBO, R. *Producción de durmientes de eucalipto*. Montevideo: Facultad de Agronomía, UdelaR, 1987. (Boletín de Investigación; 4)
 - UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA. *Infostat*. Versión 2011. Córdoba: UNC, 2011.

Aspectos computacionales en la estimación de incertidumbres de ensayo por el Método de Monte Carlo

Computational aspects in uncertainty estimation by Monte Carlo Method

Constantino, Pablo ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Metrología Física, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: pconstan@latu.org.uy

Recibido: 18/4/2013 - Aprobado: 5/12/2013

Resumen

El propósito de este trabajo es analizar los distintos aspectos relacionados al desarrollo de una aplicación informática para la estimación de incertidumbres de ensayo por el método de Monte Carlo, independiente de plataformas de cálculo como MS Excel, MathLab o R. Se analizan las dificultades y posibles soluciones en cada una de las etapas necesarias para alcanzar este objetivo, el algoritmo para la creación de un intérprete de ecuaciones, la generación de números pseudo-aleatorios con las distribuciones de probabilidad más frecuentes y el tratamiento de incertidumbres Tipo A por este método.

Finalmente se hace un estudio comparativo de los resultados obtenidos con la aplicación generada, el método clásico (GUM) y la misma simulación realizada con el Software R. Este estudio se realiza sobre el cálculo de la densidad del aire según ecuación CIPM, la presión generada por una balanza de presión y la estandarización de una solución de hidróxido de sodio de acuerdo al ejemplo A2 de la guía EURACHEM / CITEC CG 4.

Palabras clave: Metrología, incertidumbre, Monte Carlo, GUM, software, código fuente, Delphi.

Abstract

The purpose of this paper is to analyze the various aspects related to the development of a software application aimed to uncertainty estimation by Monte Carlo Method, independent from worksheet or third party applications, such as MS Excel, MathLab or R. Difficulties and their available solutions around the needed stages to achieve this goal are discussed, as well as the algorithms needed for creating a math equations parser, the pseudo-random numbers generators with main probability distributions found in uncertainty calculations, and the management of Type A uncertainties.

The application developed is tested on three samples: Air density determination according to CIPM equation, the pressure generated by a Pressure Balance and the standardizing of a solution of sodium hydroxide as in example A2 of EURACHEM/CITEC CG 4 guide. Finally, these results are compared with the results obtained applying the classical method (GUM) and those obtained using R software.

Keywords: Metrology, Uncertainty, Monte Carlo, Software, GUM, source code, Delphi.

Introducción

Si bien existen desde hace varios años numerosas aplicaciones informáticas para la realización de simulaciones de Monte Carlo en la resolución de diferentes problemas físicos, matemáticos o de negocios, es a partir de la aprobación del Suplemento 1 a la Guía de la Expresión de la Incertidumbre de Medida (JCGM 101, 2008) cuando comienza a popularizarse este método como una alternativa al sistema clásico (GUM) de estimación de incertidumbres de ensayo o para la validación de los resultados obtenidos por este método.

Tecnología

La tecnología más popular en las aplicaciones de software disponible para la realización de simulaciones de Monte Carlo

en modelos matemáticos está sustentada en el motor de cálculo de MS Excel, distribuyéndose como complemento de este paquete de software. Este enfoque particular de las aplicaciones implica la adaptación de los modelos matemáticos de los ensayos al formato de la hoja de cálculo, lo que impide el tratamiento de una o más ecuaciones independientes, en la forma que trabajan otras aplicaciones informáticas reconocidas para el cálculo de incertidumbres según la perspectiva GUM, por ejemplo, GUM Workbench®.

Por otra parte, este formato requiere la realización de operaciones previas a la simulación, como el cálculo del desvío estándar para contribuyentes de incertidumbre tipo A a partir de un número determinado de datos experimentales, debido a que en general no es posible el tratamiento de datos experimentales en forma independiente sino a partir de distribuciones de probabilidad específicas.

En este trabajo se analizan los aspectos requeridos para desarrollar una aplicación independiente de plataformas externas de cálculo utilizando un lenguaje de programación de propósito general, que permita realizar simulaciones de Monte Carlo sobre modelos matemáticos de ensayos. Por otra parte se diseñan funciones que

permiten el manejo de contribuyentes de incertidumbre tipo A y tipo B de la misma forma que se trabaja habitualmente en el método GUM (JCGM 100, 2008).

basado en el MMC, para cuantificar el impacto de la incertidumbre de cada contribuyente en la incertidumbre final de la magnitud de salida.

MMC vs GUM

Existen impedimentos y dificultades conocidas en el tratamiento de incertidumbres en modelos matemáticos complejos según la plataforma GUM. Entre los impedimentos se encuentra, por ejemplo, el caso en que las funciones de probabilidad (FDP) de las magnitudes de entrada sean asimétricas. Pero también se hace inconveniente el enfoque GUM cuando existe dificultad en la obtención de derivadas parciales para el cálculo de coeficientes de sensibilidad para los diferentes contribuyentes, o el cálculo del número efectivo de grados de libertad a partir de la ecuación de Welch y Satterthwaite cuando algunas variables del modelo tienen grados de libertad de valor finito.

A pesar de esto, el método GUM permite obtener información valiosa para el mejoramiento de la performance de los ensayos y que en muchos casos no puede ser obtenida en forma directa por medio del método de Monte Carlo.

Un ejemplo es la evaluación de incertidumbres estándar de las magnitudes de entrada, que da la posibilidad al analista de enfocar la mejora de los procesos en variables que impacten significativamente en la incertidumbre total del mesurando. En el Método de Monte Carlo (MMC) se obtiene como datos de salida una colección de resultados cuya distribución es una representación de la FDP del mesurando, quedando los aportes de incertidumbre de cada magnitud del modelo dentro de una “caja negra” de datos de entrada.

Se estudia también en este trabajo un procedimiento adicional

Funciones de cálculo

Dentro de los diferentes aspectos que deben considerarse, no solamente se encuentran los de tipo estadístico y/o metrológico como los mencionados, sino también un gran número de tareas de tipo general, como la realización de un intérprete de ecuaciones, la obtención de un intervalo de confianza para el mesurando o la necesaria optimización del tiempo de ordenamiento de resultados de la simulación, ya que el tiempo implicado en este proceso, realizado sobre cientos de miles de resultados posibles del mesurando, podría insumir inconvenientemente varios minutos de proceso en el computador si se utilizan linealmente los algoritmos básicos de ordenamiento de datos.

Finalmente, en el desarrollo de la aplicación también se abordan tareas referidas específicamente al método de simulaciones, por ejemplo la selección de algoritmos adecuados en la generación de números pseudo-aleatorios.

Para los fragmentos de código incluidos en este trabajo se utiliza el Lenguaje Object Pascal. Las pruebas de simulación y aplicaciones resultantes se diseñan en plataforma de Delphi 7.

Materiales y Métodos

Se toma como esquema básico de la aplicación el diagrama de la Figura 1 y se analizan las diferentes metodologías y algoritmos que pueden utilizarse en cada etapa del proceso.

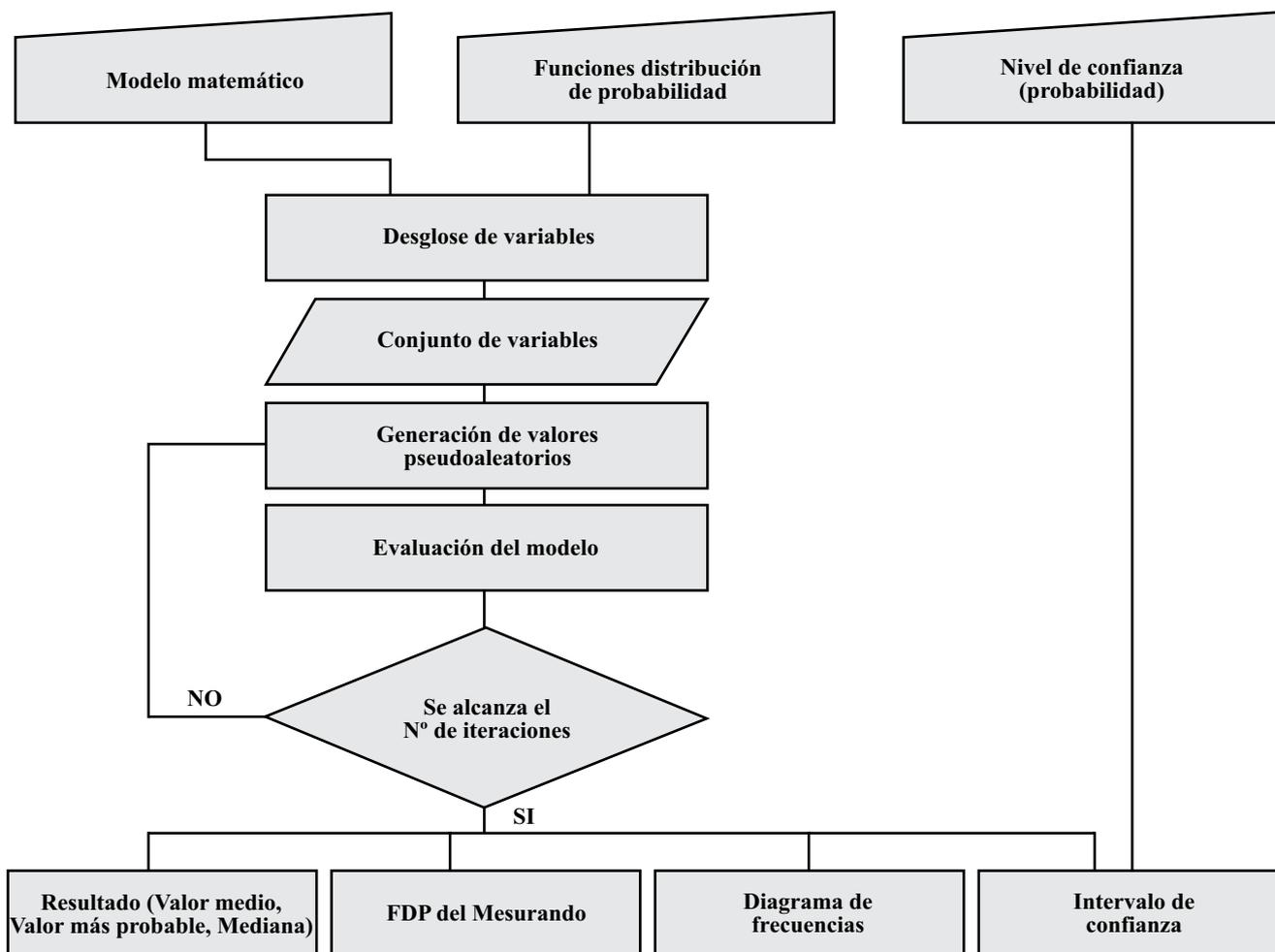


Figura 1. Representación básica del flujo de la aplicación.

Algoritmos de tipo general

Intérprete de ecuaciones. Para la realización de esta tarea se convierte previamente la notación común del modelo en notación postfija, llamada también polaca inversa o RPN (Burks et al., 1954) diseñada específicamente para la optimización de recursos informáticos en la evaluación de expresiones.

Este esquema de notación algebraica permite que los cálculos del modelo se realicen en forma secuencial y sin reglas de preferencia para los operadores, mediante la utilización de una estructura informática de pila (Stack), esto es, una lista de datos cuyo acceso implica que los últimos ítems en entrar a la pila serán los primeros en salir. La notación corriente para expresar ecuaciones (llamada infija) es entonces convertida previamente a postfija o RPN para su tratamiento.

Traductor de notación infija a RPN o postfija. Partiendo, entonces, del modelo matemático presentado como una sucesión de ítems (variables, constantes, operadores y paréntesis), las etapas para traducir entre notaciones infija y postfija están detalladas en el algoritmo Shunting Yard esquematizado en la Figura 2.

centrada. La mayoría de los lenguajes de programación actuales poseen funciones prediseñadas para obtener números pseudoaleatorios que se ajusten a estas distribuciones, o al menos para distribuciones normales y uniformes. Sin embargo, aun para estos casos, se proponen regularmente diferentes enfoques al problema de la generación de aleatorios y nuevos algoritmos que permiten mejorar la calidad de la secuencia de los números obtenidos.

Para evaluar el impacto del algoritmo utilizado en la generación de números para la simulación en los resultados de incertidumbre, se realiza un análisis comparativo realizando 50 simulaciones con diferentes algoritmos y se evalúan las diferencias de media e intervalo de confianza para 95% de probabilidad en 200 mil repeticiones.

El caso de la distribución uniforme se da cuando de la magnitud X se conocen solamente un límite inferior (a) y uno superior (b). Esto es, por ejemplo, el caso de la indicación de un equipo digital, donde la resolución del equipo determina el intervalo de valores entre los cuales se encuentra la magnitud (con igual probabilidad) en el dominio de los reales. Para distribución uniforme se utiliza la función disponible en Delphi 7, y el algoritmo Mersene Twister (Matsumoto y Nishimura, 1998) en versión Object Pascal (Krejci, 1999).

Se van tomando secuencialmente los ítems de la expresión infija	
ÍTEM	ACCIÓN
"("	Se agrega a la Pila
")"	Se extrae secuencialmente ítems de la pila y agregarlos a ecuación postfija, hasta encontrar "(" que se deja en la pila
Operador	Si la pila está vacía se agrega a la Pila Si la jerarquía del ítem es mayor que la del tope de la pila, se agrega a la Pila De lo contrario, se extrae el ítem al tope de la pila y se agrega a la ecuación postfija repitiendo la comparación con el nuevo tope
Operando	Se agrega a ecuación postfija
Al final de la expresión extraer y desplegar los elementos de la pila en la ecuación postfija hasta que se vacíe.	

Figura 2. Algoritmo Shunting Yard.

Para la evaluación de la ecuación resultante en notación RPN se utiliza el algoritmo ilustrado en la Figura 3.

ÍTEM	ACCIÓN
Operando	Se agrega a la Pila
Operador	Tomar los últimos dos valores de la pila y aplicarles el operador. El resultado de la operación se sustituye por éstos en la pila

Figura 3. Representación del flujo de cálculo de ecuaciones en notación RPN.

FDP y algoritmos para generación de números pseudoaleatorios. Según las características del mesurando, pueden existir en el modelo de entrada magnitudes con diversas distribuciones de probabilidad. En este trabajo se estudian algoritmos para las distribuciones de probabilidad más comunes en los trabajos de ensayo y calibración: normal (gaussiana), rectangular (uniforme) y triangular

Cuando la información disponible sobre una magnitud X es su mejor estimación y su incertidumbre típica asociada $u(x)$, puede asumirse que X posee una distribución de probabilidad gaussiana o normal. Esta distribución puede utilizarse cuando los datos provienen de un certificado de calibración con factor de cobertura $k=2$. Si bien la guía JCGM 101:2008 sugiere para estos casos la distribución t , para grados de libertad $GL \geq 30$ (caso en que $k=2$), la distribución t puede aproximarse a una distribución gaussiana. En distribución normal se comparan resultados obtenidos con el algoritmo de Marsaglia y Bray (1964), y el algoritmo básico de Box y Müller (1958) (Thomas et al., 2007).

Cuando una magnitud X está definida como la suma de dos magnitudes independientes con distribución de probabilidad uniforme, con el mismo intervalo de amplitud, se obtiene una distribución triangular centrada. En algunos casos, esta distribución puede asignarse convenientemente a lecturas obtenidas en un instrumento analógico, donde la semiamplitud de la distribución triangular será igual a la estimación visual dentro de la división del instrumento. Para distribuciones triangulares se comparan resultados por el método de Transformación Inversa y el de convolución (Saucier, 2000).

```

Function Rand_TriangularTInv(min,max,mode: Extended):
Double;
var
  u, r: Double;
begin
  u := Random;
  if u <= (mode-min)/(max-min) then r := min+sqrt(u*(max-
min)*(mode-min))
  else r := max-sqrt((1-u)*(max-min)*(max-mode));
  Result := r;
end;

Function Rand_TriangularConv(min,max: Extended): Double;
var
  u, p, r: Double;
begin
  u := Random*(max-min)/2;
  p := Random*(max-min)/2;
  r := u+p+min;
  Result := r;
end;
    
```

Figura 4. Ejemplo de funciones generadoras de variables aleatorias con distribución triangular por transformada inversa y convolución.

Intervalo de confianza. Con el fin de obtener el intervalo de confianza en el cálculo de incertidumbre, es necesario ordenar los datos de forma tal que sea posible determinar los valores que acotan un porcentaje de los resultados obtenidos, de valor igual a la probabilidad de cobertura.

Lo que se busca en este caso es únicamente obtener las cotas del intervalo de confianza, por tanto se minimiza el tiempo de proceso, ordenando solamente los datos correspondientes a las probabilidades de rechazo.

Como ejemplo, en el caso de un 95% de probabilidad, el intervalo de confianza queda determinado por el último valor del 2,5% menor de la población de resultados, y el primer valor del 2,5% mayor. Por esto, solo es necesario ordenar una fracción mínima de los resultados obtenidos en la simulación. Este método permite reducir sensiblemente el tiempo de procesamiento, por lo que pueden utilizarse algoritmos de sustitución simple u otro algoritmo básico sin afectar en forma significativa el rendimiento de la simulación.

Incertidumbres tipo A. La mayoría de las aplicaciones para Monte Carlo disponen un número determinado de distribuciones de probabilidad que pueden ser asignadas a los diferentes contribuyentes del modelo. En el caso de contribuciones de tipo estadístico esta forma de trabajo deja al analista un necesario tratamiento previo de los datos.

Para esta aplicación se diseña una interfase con el usuario que permita la entrada de datos experimentales de forma manual y luego los convierte en forma autónoma a valores de distribución normal u otra deseada, mediante el cálculo de sus parámetros estadísticos (media y varianza).

Cuando los grados de libertad del contribuyente de incertidumbre tipo A son $GL \geq 30$, puede atribuirse una distribución normal. A partir de estos valores calculados es obtenida la media y el desvío estándar, atribuyéndose finalmente al contribuyente una distribución normal con los parámetros calculados, en el supuesto de que los grados de libertad tiendan a valores infinitos.

La Guía JCGM 100:2008 indica que la FDP asociada a una serie de indicaciones (contribuyente tipo A) es la distribución t de Student. Por lo que en caso que $GL = n^\circ$ de valores - $1 < 30$, la simulación más adecuada se realiza según esta distribución. Para este caso, se utiliza el algoritmo basado en el método de Kinderman y Monahan propuesto en lenguaje Fortran por John Dagpunar (Dagpunar, 1988). La Figura 5 es una traducción a lenguaje Object Pascal del algoritmo mencionado.

```

function Rand_t (const GL: Integer; sesgo: Double): Extended;
{ La variable sesgo permite que la simulación no esté centrada en
el valor cero }
var
  s, c, a, f, g: Extended;
  r, x, v: Extended;
  Done: Boolean;
begin
  { Debe controlarse previamente que GL no sea < 1 }
  s := GL;
  c := -0.25 * (s + 1.0);
  a := 4.0 / Power (1.0 + 1.0 / s, c);
  f := 16.0 / a;
  if (GL > 1) then begin
    g := s - 1.0;
    g := Power ((s + 1.0) / g, c) * Sqrt ((s + s) / g);
  end else g := 1.0;
  Done := False;
  x := 0;
  repeat
    r := Random;
    if (r <= 0.0) then Continue;
    v := Random;
    x := (2.0 * v - 1.0) * g / r;
    v := Sqr (x);
    if (v > 5.0 - a * r) then begin
      if (GL >= 1) and (r * (v + 3.0) > f) then Continue;
      if r > Power (1.0 + v / s, c) then Continue;
    end;
    Done := True;
  until Done;
  Result := sesgo + x;
end;
    
```

Figura 5. Código para generación de números aleatorios con distribución t de Student.

Incertidumbres estándar. Como se aludió anteriormente, el cálculo de incertidumbres estándar de cada contribuyente es un dato de salida inherente al método GUM, que no está disponible si la estimación se realiza por medio del método de Monte Carlo.

Sin embargo, el valor de incertidumbre estándar permite al analista conocer las magnitudes controlantes de su proceso de ensayo y por tanto enfocar en éstas las mejoras de la calidad del mismo, por lo que es una especificación valiosa para cualquier aplicación que permita el cálculo de incertidumbres.

En el caso del Monte Carlo, una medida del impacto que tiene la incertidumbre de estos contribuyentes sobre la incertidumbre total del modelo puede estimarse a través de una secuencia de simulaciones sobre cada una de las variables manteniendo, en cada caso, el resto de las componentes del modelo como constantes, de valor igual a su esperanza matemática. Para obtener estos valores con una precisión razonable, se realizan un mínimo de 1000 iteraciones sobre cada magnitud de entrada.

Resultados y Discusión

Para la evaluación y comparación de los distintos aspectos analizados en el presente documento, se utiliza el concepto de tolerancia asociada a un valor numérico, δ , según recomienda la Guía JCGM 101:2008. Para la obtención de este parámetro, se parte del valor numérico z , del que se quiere conocer su tolerancia asociada. Se expresa z en forma: $c \times 10^l$, donde c es un número entero con un número determinado de cifras significativas (n) y l un número entero.

Por ejemplo: un valor de 0,00072 se expresa como 72×10^{-5} , donde n será 2 (ambas son cifras significativas) y l será -5. La tolerancia numérica se obtiene entonces a partir de la ecuación:

$$\delta = \frac{1}{2} 10^l$$

En el caso particular de la expresión de incertidumbres, la tolerancia numérica más exigente, esto es, el caso más desfavorable, se dará para valores de 99×10^l , la que será de $0,5 \times 10^l$. De este modo, un valor m tal que:

$$m \leq \frac{0,5 u(y)}{100}$$

se considera dentro de la tolerancia numérica para cualquier valor de incertidumbre.

Para las comparaciones siguientes, se obtienen valores porcentuales de impacto frente a valores de incertidumbre, tomando como límite de aceptación 0,5%, según ecuación anterior.

Número de iteraciones. Para estimar el impacto del número de iteraciones en el cálculo de incertidumbre por simulación se realizan 100 simulaciones en 20000, 100000, 200000 y 1 millón de repeticiones, para una variable aleatoria con distribución uniforme de valor medio=1 y semiintervalo=1.

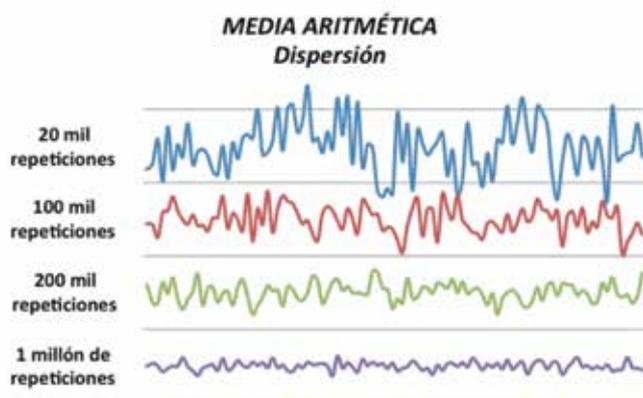


Gráfico 1. Dispersión comparativa de la media aritmética obtenida en 100 simulaciones para 20 mil, 100 mil, 200 mil y 1 millón de repeticiones.

El impacto de esta dispersión de medias e incertidumbres para una probabilidad de cobertura de 95%, relativas al valor de incertidumbre informado, se muestra en el Gráfico 2. Los valores porcentuales del gráfico corresponden al semiintervalo de amplitud de esta dispersión, relativas a la incertidumbre estimada para un 95% de probabilidad.

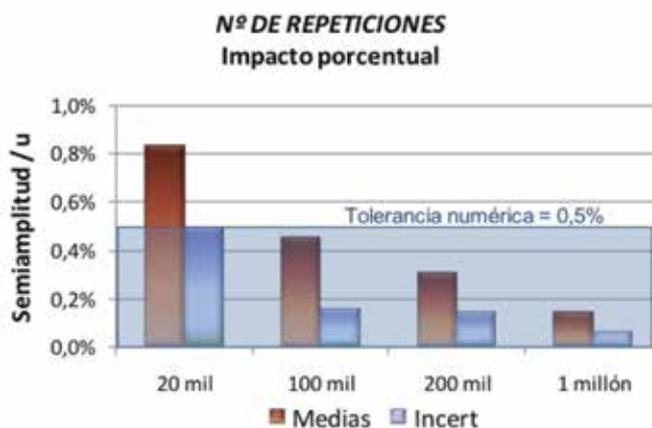


Gráfico 2. Dispersión porcentual de las medias encontradas y los semiintervalos de confianza, calculadas como $((\text{máx}-\text{mín})/2)/u(y)$ para 95% de probabilidad de cobertura.

El gráfico muestra que para 20 mil iteraciones, la dispersión obtenida en las medias aritméticas obtenidas puede ser sensiblemente mayor que la tolerancia numérica de algunos valores de incertidumbre. A partir de 100 000 esta dispersión no es significativa, ya que presenta valores menores a la tolerancia numérica de cualquier valor de incertidumbre.

Comparación de algoritmos generadores de números aleatorios. Se realizan 50 simulaciones según diferentes algoritmos para 200 000 iteraciones, comparando los valores de media e incertidumbre encontrados para un 95% de confianza. Los gráficos siguientes muestran el impacto porcentual de estas diferencias, calculados como $(\text{algoritmo}_A - \text{Algoritmo}_B)/u(y)$ para 95% de probabilidad de cobertura.

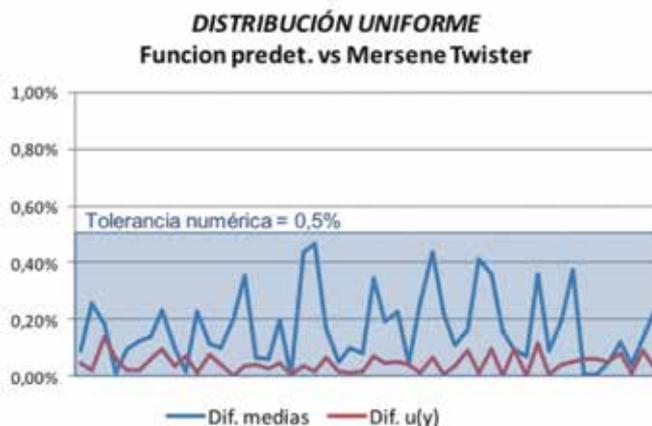


Gráfico 3. Impacto porcentual en el uso de diferentes algoritmos generadores de aleatorios uniformes.

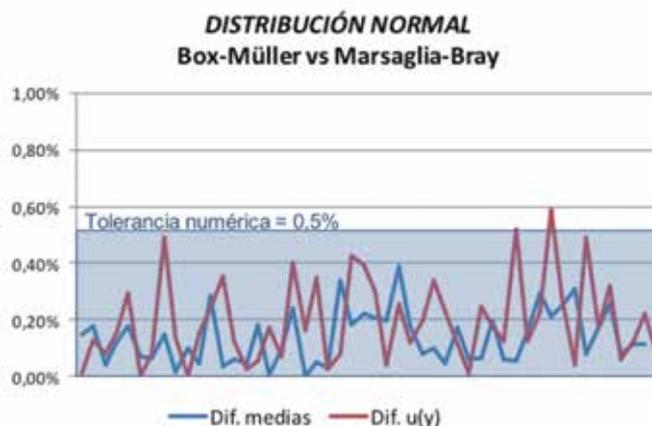


Gráfico 4. Impacto porcentual en el uso de diferentes algoritmos generadores de aleatorios con FDP Normal.

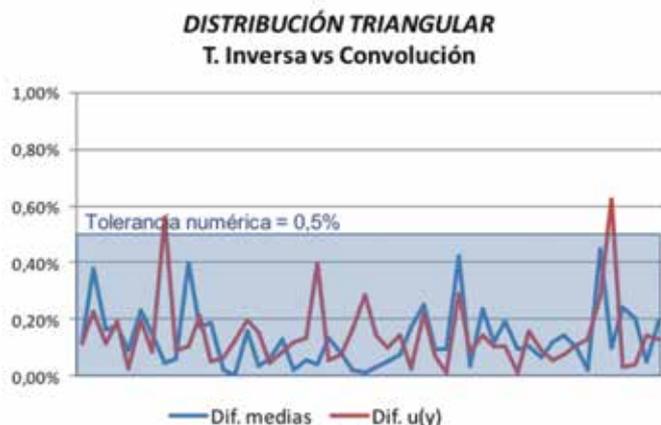


Gráfico 5. Impacto porcentual en el uso de diferentes algoritmos generadores de aleatorios con FDP Triangular.

En los Gráficos 3, 4 y 5 puede verse que no existen diferencias significativas en los resultados debidas al uso de diferentes algoritmos para la generación de variables aleatorias con distribución uniforme, normal o triangular, en simulaciones aplicadas a la estimación de incertidumbres. Puede notarse sin embargo, que existe una probabilidad no nula de que la diferencia entre medias o incertidumbres para ambos algoritmos estudiados en algunas distribuciones tome un valor similar o incluso mayor que la tolerancia numérica mínima. No obstante, aun en las máximas diferencias encontradas, la interpretación de estos valores es que arrojarían resultados incompatibles solamente en los casos más desfavorables y nunca mayor que una unidad en la segunda cifra significativa de la incertidumbre.

Por tanto, esta razonable homogeneidad en los resultados para el caso de la estimación de incertidumbres por el método de Monte Carlo permite inferir que la búsqueda de mejores algoritmos no aportará mejoras significativas al método, por lo que el uso de algoritmos predeterminados es recomendado.

Cálculos con la aplicación generada. Se comparan los resultados obtenidos con la aplicación generada y el Método GUM.

Con:

t : temperatura ambiente

h : humedad relativa

α : 1,0062

β : $3,14 \times 10^{-8} \text{ Pa}^{-1}$

γ : $5,6 \times 10^{-7} \text{ k}^{-2}$

A : $1,2378847 \times 10^{-5} \text{ k}^{-2}$

B : $-1,9121316 \times 10^{-2} \text{ k}^{-1}$

C : 33,93711047

D : $-6,3431645 \times 10^{-3} \text{ K}$

Ejemplo 1.

Densidad del aire según CIPM-2007

Se realiza el cálculo de densidad del aire según la fórmula propuesta en CIPM-2007. La ecuación para el cálculo de densidad del aire viene dada por la ec:

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

Con:

ρ : densidad del aire en kg/m³

p : presión atmosférica en Pa

M_a : masa molar de aire seco = $28,96546 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}$

Z : factor de compresibilidad adimensional

R : constante molar de los gases.

T : temperatura en K.

x_v : fracción molar de vapor de agua adimensional

M_v = masa molar de vapor de agua $0,01801528 \text{ kg/Mol}$.

El valor de x_v se determina a partir de:

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

Mientras que Z está determinada por la fórmula:

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

$a_0 = 1,58123 \times 10^{-6} \text{ KPa}^{-1}$

$a_1 = -2,9331 \times 10^{-8} \text{ Pa}^{-1}$

$a_2 = 1,1043 \times 10^{-10} \text{ K}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$

$b_0 = 5,707 \times 10^{-6} \text{ KPa}^{-1}$

$b_1 = -2,051 \times 10^{-8} \text{ Pa}^{-1}$

$c_0 = 1,9898 \times 10^{-4} \text{ KPa}^{-1}$

$c_1 = -2,376 \times 10^{-6}$

$d = 1,83 \times 10^{-11} \text{ k}^2 \text{ Pa}^{-2}$

$e = -0,765 \times 10^{-8} \text{ K}^2 \text{ Pa}^{-2}$

La representación en cadena de texto para utilizar en la aplicación generada en este trabajo puede escribirse según el siguiente grupo de ecuaciones:

```

Rho_a=((P*Ma)/(Z*R*(273.15+Temp))*(1-xv*(1-(Mv/Ma)))
xv=H*0.01*f*Psv/P
Psv=EXP(A*(273.15+Temp)^2+B*(273.15+Temp)+C+D/(273.15+Temp))
f=alfa+beta*P+gama*Temp^2
Z=1-(P/(273.15+Temp))*(a_0+a_1*Temp+a_2*Temp^2+(b_0+b_1*Temp)*xv+
(c_0+c_1*Temp)*xv^2)+(P^2/(273.15+Temp)^2)*(d+e*xv^2)
Temp=Temp_cal+Temp_div
P=P_cal+P_div
H=H_cal+H_div
    
```

En estas ecuaciones las magnitudes de temperatura, humedad y presión aportan la incertidumbre debida a su calibración ($_cal$) e incertidumbres por resolución de los instrumentos de medida ($_div$). Estos parámetros toman valor = 0, ya que es utilizada únicamente con fines de estimación de incertidumbre.

Datos de entrada:

Magnitud	Valor	Distrib	Param.
Ma	0.028965460	Uniforme	Semi intervalo = 1×10^{-9}
R	8.3144720	Uniforme	Semi intervalo = 1×10^{-7}
Mv	0.018015280	Uniforme	Semi intervalo = $1 \times 10E^{-9}$
$Temp_cal$	21.2	Normal	Desvío standar = 0,065
$Temp_div$	0	Uniforme	Semi intervalo = 0,05
P_cal	101325.0164	Normal	Desvío standar = 149,5
P_div	0	Uniforme	Semi intervalo = 5
H_cal	50	Normal	Desvío standar = 1,7
H_div	0	Uniforme	Semi intervalo = 0,05

Los demás parámetros de la ecuación son constantes, con el valor mencionado.

Resultados según método GUM: $\rho = 1,1940 \pm 0,0036$ kg/m³

Resultado según MMC obtenido con la aplicación generada a partir de este trabajo:

Mediana: 1,19401 kg/m³; valor más probable: 1,1943 kg/m³; intervalo de confianza para 95,45% de probabilidad = [1,19045 ; 1,19758]

Según estos resultados: $U_{MMC}(\rho) = (1,19758 - 1,19045)/2 = 0,003565$

Por lo que tomando como resultado para el MMC la mediana del conjunto de resultados se obtienen resultados idénticos para ambos métodos, observando una diferencia numérica para la incertidumbre de $0,0036 - 0,003565 = 3,5 \times 10^{-5}$.

La tolerancia numérica para el valor de incertidumbre según GUM (=0,0036) está dada por:

$$\delta = \frac{1}{2} 10^{-4} = 0,5 \times 10^{-4}$$

Por tanto, $3,5 \times 10^{-5} < 0,5 \times 10^{-4}$ y los resultados por ambos métodos pueden considerarse compatibles, es decir, se obtiene un resultado idéntico según ambos enfoques, GUM y MMC.

Ejemplo 2.

Presión generada por una balanza de presión

Para este ejemplo se utiliza una balanza de presión de plataforma neumática, perteneciente al laboratorio de presión del LATU marca DHI, Modelo PG7102. El cálculo de incertidumbre se hará sobre la presión generada por un ensamble pistón-cilindro Marca DHI modelo PC-7100/7600-200 de constante nominal = 200 kPa/kg, para una presión nominal de 34,47 bar.

La presión generada en una balanza neumática es obtenida a partir del siguiente modelo:

$$P = \frac{M \cdot g_l \cdot \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_m}\right) + \sigma \cdot C}{A_0 \cdot (1 + \lambda P) \cdot [1 + \alpha \cdot (t - t_r)]} + (\rho_f - \rho_a) \cdot g_l \cdot \Delta h$$

Donde:

M : masa total (nominal: 17,231 kg)

g_l : gravedad local (en el laboratorio de presión del LATU $g_l = 9,79732 \pm 1E-5$ m/s²)

ρ_a : densidad del aire (se calculó a partir de la fórmula CIPM 2007 ($\rho_a = 1,20048 \pm 0,0035$ kg/m³))

ρ_m : densidad de las masas (según certificado)

C : circunferencia nominal del pistón

σ : coeficiente de tensión superficial del ensamble pistón cilindro ($\sigma = \sigma_{pistón} + \sigma_{cilindro}$)

A_0 : área efectiva a presión nula y temp. de referencia

λ : coeficiente de deformación del ensamble pistón-cilindro con la presión.

α : coeficiente de deformación con la temperatura [el ensamble pistón/cilindro es de carburo de Tungsteno ($\alpha = 4,5 \times 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$)].

El set de ecuaciones correspondiente a este modelo utilizado para el MMC es:

$$P_{ref} = \frac{((mp * (1 - \rho_a / \rho_p) + (mas * (1 - \rho_a / \rho_{as})) + SUM_M * (1 - \rho_a / \rho_m)) * g + \sigma * C) / (A_o * (1 + (\alpha_c + \alpha_p) * (t - 20)) * (1 + \lambda * P))}{100000 - ((\rho_f - \rho_a) * g * Ah) / 100000}$$

$$SUM_M = G1 + G2 + G3 + D + B1 + M1 + N + P1 + Q + R$$

Donde P_{ref} es la Presión generada por la balanza en bar.

Como puede verse, en el modelo para MMC se agregaron como datos de entrada independientes la masa del pistón (mp) y su densidad (ρ_p), así como los valores de masa y densidad para el asiento de masas (variables mas y ρ_{as} , respectivamente), dado que el certificado de las mismas indica masa real y densidad. El set de masas está calibrado en Masa convencional por lo que SUM_M (en la segunda ecuación) es la suma de masas y la densidad (ρ_m) será 8000 kg/m^3 con incertidumbre = 0, por la propia definición de masa convencional.

En este modelo, las distribuciones de probabilidad para los valores de las masas, densidades, área específica (A_o) y coeficiente de deformación (λ) se tomaron como gaussianas con un valor medio igual al resultado indicado en el certificado y $\sigma = u/k$, debido a que según el certificado de calibración $k=2$ en todos los casos.

Resultados según método GUM: $P = 34,4334 \pm 0,0011 \text{ bar}$

Resultado según MMC obtenido con la aplicación generada a partir de este trabajo:

Mediana: 34,43342 bar; valor más probable: 34,4335 bar; intervalo de confianza para 95,45% de probabilidad = [34,43235; 34,43449]

Según estos resultados: $U_{MMC}(P) = (34,43449 - 34,43235)/2 = 0,00107$

Por lo que tomando como resultado para el MMC la mediana del conjunto de resultados, se obtienen resultados idénticos para ambos métodos, observando una diferencia numérica para la incertidumbre de $0,0011 - 0,00107 = 3 \times 10^{-5}$.

La tolerancia numérica para el valor de incertidumbre según GUM ($=0,0011$) está dada por:

$$\delta = \frac{1}{2} 10^{-4} = 0,5 \times 10^{-4}$$

Por tanto, $3 \times 10^{-5} < 0,5 \times 10^{-4}$ y los resultados por ambos métodos pueden considerarse compatibles.

Ejemplo 3.

Estandarización de una solución de Hidróxido de sodio (Ejemplo A2 de EURACHEM / CITAC Guide CG 4)

En este ejemplo se comparan los cálculos detallados en la guía citada con los obtenidos por medio de la aplicación generada en este trabajo por el método de Monte Carlo.

En este caso se estudia la determinación de la concentración de una solución de NaOH por medio de una titulación con biftalato de potasio (KHP). La ec. general del proceso es:

$$C_{NaOH} = \frac{1000 * m_{KHP} * P_{KHP}}{M_{KHP} * V_T}$$

Donde:

C_{NaOH} : concentración de la solución de NaOH [mol/l].

m_{KHP} : masa del KHP (como se pesa por diferencia, la incertidumbre de la pesada se toma por duplicado).

P_{KHP} : pureza del KHP dada como porcentaje en masa.

M_{KHP} : masa molar del KHP [g/mol].

V_T : volumen dispensado en la titulación.

Aquí, según el punto A2.4 step 3 de la guía, la magnitud consta de cuatro componentes: por repetibilidad (considerada en repetibilidad general), de calibración, debida al control de temperatura, y debida al sesgo en la detección del punto final, considerada despreciable en este caso.

Replanteando entonces la ecuación tenemos que:

$$m_{KHP} = 8 * C + 5 * H + 4 * O + K$$

Siendo C, H, O y K el peso atómico de los elementos correspondientes del KHP ($C_8H_5O_4K$).

Por otra parte, como se indica arriba:

$$V_T = \cancel{V_{rep}} + V_{Cal} + V_{Tem} + \cancel{V_{Sesg}}$$

El set de ecuaciones correspondiente a este modelo utilizado en la aplicación es:

$$C_{NaOH} = 1000 * (m_{KHP_g} - m_{KHP_t}) * P_{KHP} / (M_{KHP} * V_T)$$

$$V_T = V_{Cal} + V_{Tem}$$

$$M_{KHP} = 8 * C + 5 * H + 4 * O + K$$

Datos de entrada:

Magnitud	Valor	Distrib	Param.
Rep	1	Normal	Desvío standar = 0,0005
m_KHP_g	60,5450	Uniforme	Semi intervalo = 1,5E-4
m_KHP_t	60,1562	Uniforme	Semi intervalo = 1,5E-4
P_KHP	1,0000	Uniforme	Semi intervalo = 0,0005
V_cal	18,64	Normal	Desvío standar = 0,012
V_Tem	0	Normal	Desvío standar = 0,006
C	12,0107	Uniforme	Semi intervalo = 0,0008
H	1,00794	Uniforme	Semi intervalo = 0,00007
O	15,9994	Uniforme	Semi intervalo = 0,0003
K	39,0983	Uniforme	Semi intervalo = 0,0001

Resultados según método GUM, indicado en EURACHEM CG 4 A2.6 Step 5:

$$C_{\text{NaOH}} = 0,1021 \pm 0,0002 \text{ mol.l}^{-1}$$

Recalculando y expresando con las cifras significativas correctas según GUM (JCGM 100), quedaría en: $C_{\text{NaOH}} = 0,10214 \pm 0,00020 \text{ mol.l}^{-1}$

Resultado según MMC obtenido con la aplicación generada a partir de este trabajo:

Mediana: $0,10214 \text{ mol.l}^{-1}$; valor más probable: $0,10214 \text{ mol.l}^{-1}$; intervalo de confianza para 95,45% de probabilidad = $[0,10194; 0,10233]$.

Según estos resultados: $U_{\text{MMC}}(C_{\text{NaOH}}) = (0,10233 - 0,10194)/2 = 0,000195 \text{ mol.l}^{-1}$

La tolerancia numérica para el valor de incertidumbre según GUM ($=0,00020$) está dada por:

$$\delta = \frac{1}{2} 10^{-5} = 0,5 \times 10^{-5}$$

Por lo que el apartamiento obtenido entre las incertidumbres según ambos métodos es menor que la tolerancia numérica, mientras que los resultados obtenidos son idénticos, por lo que ambos métodos pueden considerarse compatibles.

Validación de resultados

Se evalúa la validez de los resultados obtenidos para el MMC con la aplicación generada, realizando la simulación en lenguaje R (versión 2) con las mismas magnitudes de entrada.

El Gráfico 6 muestra en forma gráfica las diferencias entre los resultados de Mediana y U, obtenidos de simulaciones realizadas con ambas aplicaciones. Se observa que el apartamiento entre los valores de mediana e incertidumbre es menor que la tolerancia numérica de la incertidumbre para todos los casos, por lo que los resultados de ambas aplicaciones se consideran compatibles.

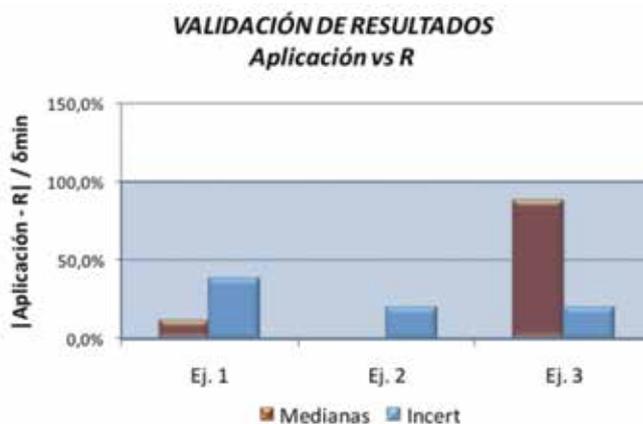


Gráfico 6. Impacto porcentual de la diferencia entre los resultados obtenidos con la aplicación y el software R.

	Ejemplo 1		Ejemplo 2		Ejemplo 3	
	Densidad del aire		Presión generada		Estandarización de NaOH	
Parámetro	Aplicación	Lenguaje R	Aplicación	Lenguaje R	Aplicación	Lenguaje R
Mediana	1,19401	1,194004	34,43342	34,43342	0,10214	0,1021356
Mín (P= 95%)	1,19045	1,190448	34,43235	34,43234	0,10194	0,1019396
Máx (P= 95%)	1,19758	1,197540	34,43449	34,43450	0,10233	0,1023320
U=(Máx – Mín)/2	$3,565 \times 10^{-3}$	$3,546 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,08 \times 10^{-3}$	$1,95 \times 10^{-4}$	$1,96 \times 10^{-4}$
δ (Tol. num.)	$0,5 \times 10^{-4}$		$0,5 \times 10^{-4}$		$0,5 \times 10^{-5}$	

Conclusiones

Se indican a continuación las conclusiones inferidas para los distintos aspectos estudiados en la aplicación.

Nº de repeticiones. Los resultados permiten concluir que para la aplicación del MMC se requiere realizar un mínimo de 100 mil repeticiones. Por debajo de este valor pueden encontrarse diferencias sensibles en los resultados para las mismas magnitudes de entrada, lo que convierten el método en poco reproducible. Por encima de 100 mil repeticiones tanto los resultados obtenidos para el modelo como sus incertidumbres asociadas serán idénticas, independientemente del número de repeticiones.

Algoritmos de generación de aleatorios. Existe homogeneidad razonable en los resultados obtenidos utilizando diferentes algoritmos, por lo que la sustitución de los algoritmos predeterminados por otros de mejor desarrollo no aporta mejoras significativas al método cuando es aplicado a la estimación de incertidumbres.

Interpretación de resultados. Como valor del mesurando, en las pruebas se tomó la mediana de la población de resultados, para poder expresar la incertidumbre de la misma forma que se hace según el método GUM. Se observa que la mediana y el valor más probable no coinciden en todos los casos, aunque son similares. En los modelos que la FDP resultante sea menos asimétrica, el promedio, la mediana y el valor más probable estarán más alejados; en estos casos es recomendable estudiar la forma de expresar la incertidumbre y el parámetro estadístico a utilizar como resultado.

Por otra parte, en los tres casos estudiados se obtienen resultados compatibles sin apartamientos significativos entre ambos métodos, por lo que tanto el valor de la magnitud de salida, como su incertidumbre pueden considerarse válidos. En caso de que existieran apartamientos mayores que la tolerancia numérica de la incertidumbre, los valores obtenidos según GUM deberían ser corregidos según el método de Monte Carlo, como se recomienda en JCGM 101:2008.

Validación de la aplicación generada. Finalmente, las pruebas comparativas realizadas sobre un software de estadística reconocido (Lenguaje R) permiten concluir que los resultados obtenidos en este trabajo son compatibles con el valor obtenido en plataforma R para los tres ejemplos. Esto representa una forma de validación de la aplicación generada, en el entendido de que deben realizarse pruebas más exhaustivas para considerarla correctamente validada.

Extensión del trabajo. A la aplicación generada a partir de este trabajo se le dio el nombre de MCM Alchimia y se encuentra disponible para descarga gratuita en el sitio www.mcmalchimia.com. Se alienta a realizar nuevas pruebas y validaciones con modelos de ensayo más exigentes, y se propone adicionalmente dar disponibilidad a la aplicación para el estudio de modelos de regresión.

Reconocimientos

Se agradece al Ing. Luis Mussio, primer piloto de pruebas de la aplicación, cuyas acertadas respuestas y cuestionamientos en la etapa de desarrollo permitieron optimizar y dar mayor utilidad a la misma desde sus versiones iniciales.

Referencias

- BOX, G. E. P.; MULLER, M. E. A note on the generation of random normal deviates. En: *The Annals of Mathematical Statistics*. 1958, 29(2)610:611.

- BURKS, A. W.; WARREN, D. W.; WRIGHT, J. B. An analysis of a logical machine using parenthesis-free notation. En: *Mathematical Tables and Other Aids to Computation*. 1954, 46(8):53-57.
- DAGPUNAR, J. *Principles of random variate generation*. Oxford: Clarendon Press, 1988
- EURACHEM; CITAC. *EURACHEM / CITAC Guide CG 4: quantifying uncertainty in analytical measurement*. 3rd ed. London: EURACHEM, [s.d.].
- JCGM 100. *Evaluation of measurement data: guide to the expression of uncertainty in measurement* [En línea]. [s.l.]: JCGM, 2008. [Consulta 2 de mayo de 2013]. Disponible en: http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf
- JCGM 101. *Evaluation of measurement data. Supplement 1 to the "guide to the expression of uncertainty in measurement". Propagation of distributions using a Monte Carlo method* [En línea]. [s.l.]: JCGM, 2008. [Consulta 2 de mayo de 2013]. Disponible en: http://www.bipm.org/utls/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf
- KREJCI, Roman. *Another random numbers generator (32-bit)* [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 1999. [Consulta 2 de mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.rksolution.cz/delphi/tips.htm>
- MARSAGLIA, G.; BRAY, T. A convenient method for generating normal variables. En: *SIAM Rev.* 1964, 6(3):260-264.
- MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, T. Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudorandom number generator. En: *ACM Trans. on Modeling and Computer Simulation*. 1998, 8(1):3-30.
- PICARD, A.; DAVIS, R. S.; GLÄSER, M.; FUJII, K. Revised formula for the density of moist air. En: *Metrologia*, 2008, 45(2):149-155.
- SAUCIER, R. *Computer generation of statistical distributions* [En línea]. [s.l.]: Army Research Laboratory, 2000. [Consulta 2 de mayo de 2013]. Disponible en: <http://ftp.arl.mil/random/random.pdf>
- THOMAS, D.B.; LUK, W.; LEONG, P.H. Gaussian random number generators. En: *ACM Comput. Surv.* 2007, 39(4):Article 11.



Determinación de atrazina e intermediarios de biodegradación en enriquecimientos bacterianos provenientes de cursos de agua superficial de Uruguay

Determination of atrazine and its biodegradation intermediates in bacterial enrichments obtained from Uruguayan water courses

Da Cunha, Jonathan ⁽¹⁾, Pinelli, Laura ⁽¹⁾, Bellini, María Inés ⁽¹⁾, Davyt, Danilo ⁽²⁾, Fernández-Scavino, Ana ⁽¹⁾

⁽¹⁾Laboratorio Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental, Departamento de Biociencias - ⁽²⁾Laboratorio de Química Farmacéutica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Contacto: afernand@fq.edu.uy

Recibido: 17/5/2013 - Aprobado: 23/11/2013

Resumen

La atrazina es un herbicida que se utiliza para el control de malezas anuales y gramíneas perennes. Aunque se encuentra prohibido en la Unión Europea por su toxicidad y la de sus metabolitos, en Uruguay ocupa el segundo lugar de importancia en volúmenes de importación. La presencia de atrazina ha sido especialmente relevante en algunos cursos de agua que surten a las plantas potabilizadoras nacionales. El principal mecanismo de eliminación de la atrazina en ambientes con pH neutro es la degradación bacteriana. Los microorganismos pueden degradar atrazina produciendo intermediarios de variada persistencia y toxicidad, o mineralizarla dando amonio y anhídrido carbónico. La separación y detección de estos intermediarios es importante para seleccionar consorcios bacterianos apropiados para aplicar en un proceso de biorremediación. En este trabajo se desarrolló un método isocrático de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) usando un agente de par iónico y fase reversa para separar atrazina de algunos de sus metabolitos en un medio de cultivo sintético. Este método resultó adecuado para detectar los intermediarios de la degradación producidos por consorcios bacterianos autóctonos seleccionados. También se utilizó para determinar si un consorcio bacteriano activo podía degradar la atrazina adsorbida sobre carbón activado.

Palabras clave: Atrazina, metabolitos, HPLC, biodegradación, aguas superficiales.

Abstract

Atrazine is an herbicide used to control annual weeds and perennial grasses. Due to the toxicity of atrazine and its metabolites, this herbicide is banned in the European Union. In Uruguay atrazine is the second most frequently imported herbicide. It has been detected in surface water courses, particularly those that provide water for potabilization plants. The main mechanism for atrazine removal in neutral pH environments is the bacterial degradation. The microorganisms can degrade atrazine giving intermediates that vary in persistence and toxicity, or mineralize it giving ammonia and carbon dioxide. The separation and detection of atrazine intermediates of biological degradation is important to know the potential of bacterial consortia to be applied in bioremediation processes. In this paper we developed an isocratic method of high performance liquid chromatography (HPLC) by ion-pair reversed phase to separate atrazine and metabolites in a synthetic culture medium. This method was useful to detect intermediates of atrazine degradation produced by selected native bacterial consortia. In addition, the method was employed to assess if atrazine adsorbed on activated carbon could be degraded by an active degrading consortium.

Keywords: Atrazine, metabolites, HPLC, biodegradation, surface water.

Introducción

La atrazina, 1-cloro-3-etilamino-5-isopropilamino-2,4,6-triazina, se utiliza para el control de malezas anuales y gramíneas perennes. Es un herbicida que ha sido prohibido en la Unión Europea desde 2006, pero en Uruguay es el segundo en importancia con una tendencia al incremento de las importaciones en los últimos años (MGAP, 2011). Se utiliza especialmente en cultivos de soja, mezclado con glifosato,

para controlar el trébol blanco y otras malezas que han desarrollado resistencia al glifosato.

La atrazina ocasiona trastornos del sistema endócrino (Salaberria et al., 2009) y puede afectar los sistemas nervioso (Rodríguez et al., 2005) y reproductor (Cooper et al., 2000).

Recientemente ha causado alarma pública en Uruguay la presencia de atrazina en cursos de agua superficiales, especialmente en algunos que se usan como fuente de agua para las plantas potabilizadoras (El

Pais Digital, 2010). El incremento del uso de agroquímicos y de la superficie cultivable ha desencadenado este problema ambiental que en las plantas potabilizadoras se resuelve adsorbiendo la atrazina, y los otros potenciales contaminantes, con carbón activado.

El principal mecanismo de eliminación de la atrazina de ambientes con pH neutro es la degradación bacteriana. Hasta hace 30 años se había observado que la atrazina era degradada lentamente por monooxigenasas inespecíficas que no sostenían el crecimiento microbiano y daban lugar a un variado espectro de intermediarios metabólicos. Entre estos productos se observaron los intermediarios desalquilados de la hidroxiatrazina, la desetilhidroxiatrazina y la desisopropilhidroxiatrazina (Erickson y Lee, 1989). Posteriormente se han encontrado bacterias, solas o en consorcios, capaces de degradar completamente la atrazina por una vía hidrolítica que comienza con la declorinación y producción de hidroxiatrazina (reacción que también puede ser abiótica); esta vía también tiene como intermediario importante al ácido cianúrico (Udiković-Kolić et al., 2012). Esta evolución de la capacidad metabólica bacteriana es prometedora para aplicar en procesos de biorremediación de atrazina, ya que transcurre rápidamente y mineraliza completamente el herbicida. Para explorar esta capacidad metabólica en microorganismos autóctonos es necesario contar con métodos analíticos apropiados para caracterizar el proceso y los intermediarios de degradación en condiciones de laboratorio, en las cuales las concentraciones utilizadas son muy superiores a las permitidas por las autoridades sanitarias.

El HPLC ha sido la metodología más utilizada para la determinación de atrazina y sus metabolitos de degradación microbiana en medios de cultivo relativamente sencillos (Mandelbaum et al., 1993; Radosevich et al., 1995; Lin et al., 2008) y en muestras ambientales que representan matrices más complejas como aguas superficiales y suelo (Vermulen et al., 1982; Karlaganis et al., 1991; Steinheimer, 1993). La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), más sensible para la determinación de atrazina y sus metabolitos (Patnaik, 1997), tiene la desventaja de que requiere derivatizar los compuestos para el análisis. En la metodología de HPLC se han estudiado diferentes condiciones de trabajo, tales como cromatografía en fase ligada con columnas amino (Dufek et al., 1980) o ciano (Smolkova y Pacakova, 1978), así como también en fase reversa con columna C8 (Vermulen et al., 1982; Mandelbaum et al., 1993) o C18, esta última la más utilizada. La mayoría de estas variantes se aplicó para la determinación de atrazina, pero no para sus metabolitos.

Beilstein et al. (1981) han estudiado por HPLC en fase reversa con columna C18 la separación de 17 triazinas, entre ellas la atrazina y los metabolitos, incluyendo al ácido cianúrico. Si bien estos autores pudieron determinar la totalidad de los compuestos, la separación no fue buena. Desde entonces no se han reportado otros estudios

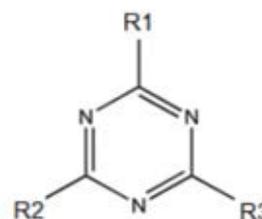
de separación de todos los metabolitos junto a la atrazina. El ácido cianúrico es un compuesto hidrofílico muy polar que eluye en el frente de corrida en los sistemas adecuados para separar los demás metabolitos en fase reversa. Otros estudios han hecho énfasis en la determinación del ácido cianúrico en aguas de piscina (Downes et al., 1982; Hou y Ding, 2011) o en leche en polvo (Hou y Ding, 2011) por HPLC en fase reversa con columna C18 o en medio de cultivo utilizando HPLC en columna de intercambio iónico de fase ligada con aminas (Jesee et al., 1981). Según este autor, a pH próximo a la neutralidad el ácido cianúrico se encuentra en su forma enol, por lo que en solución con un compuesto iónico de carga positiva se podría formar un par iónico entre ambos compuestos. Debido a esto, Hou y Ding (2011) plantearon la determinación del ácido cianúrico mediante una cromatografía de par iónico con el agregado de bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) a la fase móvil, utilizando condiciones de fase reversa con una columna C18. Los autores lograron así la determinación del ácido cianúrico con un límite de detección de 0,3 ppm y una buena separación del frente de la corrida.

El objetivo de este trabajo es optimizar un método isocrático de HPLC que permita la determinación de atrazina, hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina, desisopropilhidroxiatrazina y ácido cianúrico en las concentraciones utilizadas en enriquecimientos bacterianos obtenidos en diferentes condiciones de cultivo.

Materiales y Métodos

Optimización de la determinación de atrazina y metabolitos por HPLC

Los estándares de atrazina, hidroxiatrazina, desetilhidroxiatrazina, desisopropilhidroxiatrazina y ácido cianúrico (Tabla 1) calidad ppa (puro para análisis) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Se prepararon soluciones patrón de 100 mg/l en medio acuoso para ácido cianúrico, en metanol para atrazina y en acetonitrilo para los demás compuestos. Se utilizaron solventes calidad HPLC y agua calidad milli-Q. El hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) fue utilizado como reactivo de par iónico (12,5% en metanol, Sigma Aldrich).



Compuesto	Abreviatura	R1	R2	R3
Atrazina	AT	cloro	etilamino	isopropilamino
Hidroxiatrazina	HA	hidroxilo	etilamino	isopropilamino
Desetilhidroxiatrazina	DEHA	hidroxilo	amino	isopropilamino
Desisopropilhidroxiatrazina	DIHA	hidroxilo	etilamino	amino
Ácido Cianúrico	AC	hidroxilo	hidroxilo	hidroxilo

Tabla 1. Nombres, abreviaturas y estructuras de los metabolitos analizados.

En la optimización del método analítico se utilizaron estándares de atrazina (11 mg/l) y de sus metabolitos (2 mg/l de cada uno) en fase acuosa y en medio de cultivo MDA previamente esterilizado.

La determinación de atrazina y sus metabolitos se realizó con un HPLC marca Shimadzu, con bomba LC-10AD operada en modo isocrático, volumen de inyección de 20 μ l y un detector espectrofotométrico (modelo UV SPD-10, Shimadzu) con lámpara de deuterio a la longitud de onda de 220 nm. Las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron: una columna C8 Lichrospher select B marca Lichrocart de 250x4,0 mm, tamaño de poro de 60 Å y tamaño de partícula de 5 μ m, fase móvil de acetonitrilo/TBAOH 3 mM en buffer fosfato 0,01 M, pH 7 y con el gradiente de flujo (F) programado que sigue: de 0 a 8 min, F = 0,5 ml/min; de 8 a 10 min aumento progresivo hasta F = 1,5 ml/min; de 10 a 18 min se mantuvo este flujo; de 18 a 20 min aumento progresivo hasta F = 2,0 ml/min; de 20 a 40 min se mantuvo este flujo. El límite de detección para la atrazina y para sus metabolitos fue de 0,5 mg/l.

Medio de cultivo MDA

El pH de este medio de cultivo se ajusta a 7,2 y su composición es: K_2HPO_4 18 mM, KH_2PO_4 6 mM, trazas de minerales 5 ml/l (Touzel y Albagnac, 1983) y atrazina comercial (90% pureza, Novazina 90GD) 25 mg/l. Después de esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min, se agregaron los siguientes componentes esterilizados por filtración: solución de vitaminas (Touzel y Albagnac, 1983) 0,9 ml/l, $CaCl_2$ 0,5 mM y $MgSO_4$ 1 mM. La mezcla de fuentes de carbono y energía también se esterilizó por filtración y se agregó al medio base autoclavado: acetato de sodio 0,7 mM, ácido succínico 0,7 mM y citrato de sodio 0,7 mM. En este medio de cultivo la única fuente de nitrógeno es atrazina a una concentración cercana a su máxima solubilidad en agua. En los enriquecimientos suplementados con una fuente de nitrógeno adicional se agregó KNO_3 (22 mg/l de nitrato).

Determinación de atrazina y metabolitos en enriquecimientos bacterianos en medio acuoso

Se estudió la presencia de intermediarios de la degradación microbiana de atrazina en medio MDA en enriquecimientos incubados en condiciones similares a las de los sistemas ambientales donde estos consorcios podrían ser aplicados. Sólo algunas bacterias son capaces de degradar atrazina en presencia de fuentes alternativas de nitrógeno como nitrato, frecuentemente encontrado en aguas superficiales y subterráneas. Por otra parte, las temperaturas próximas a 20 °C son las más cercanas a las ambientales de una planta de potabilización.

Se prepararon enriquecimientos inoculados con aguas de ríos de la cuenca lechera de Uruguay. En la primavera de 2011 se tomaron muestras de las aguas que ingresaban a las plantas potabilizadoras de Aguas Corrientes (río Santa Lucía en Canelones) y Dolores (río San Salvador en Soriano). Se incubó el agua extraída suplementada con 25 mg/l de atrazina comercial en viales aerobios en dos temperaturas (20 y 30 °C), en ausencia y en presencia de nitrato. Después de observar turbidez debida al crecimiento se subcultivó en medio MDA con atrazina y se incubó en las mismas condiciones. Se seleccionaron los enriquecimientos que degradaban atrazina (Pinelli et al., 2012). Se analizó el sobrenadante obtenido después de centrifugar 10.000 g con la metodología optimizada en este trabajo para determinar si se acumulaban intermediarios de la degradación.

Biodegradación de atrazina adsorbida sobre carbón activado

El ensayo se realizó en viales color ámbar de 300 ml con 60 ml de medio MDA. Se preparó el medio MDA sin atrazina y con carbón

activado (Alpha W610) en polvo 1200 mg/l. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min, luego se agregó atrazina comercial a partir de una solución metanol-agua concentrada, previamente autoclavada, para dar una concentración final de 30 mg/l y una relación carbón activado:atrazina de 40:1.

El inóculo que se empleó consistió en el consorcio bacteriano degradador de atrazina ACLD 25.2, obtenido previamente en el laboratorio, el cual puede degradar 25 mg/l del herbicida en 24 horas. Brevemente, este consorcio se obtuvo a partir de lodo de la pileta de decantación de la planta potabilizadora de Aguas Corrientes, OSE, luego de 15 subcultivos en medio MDA (Pinelli et al., 2012). Antes de inocular se confirmó que el inóculo degradara el 100% de la atrazina soluble en medio MDA en un período de 24 hs.

Para extraer la atrazina adsorbida se filtró el volumen total (60 ml) de cada vial por un filtro de papel Whatman. Se conservó el sobrenadante acuoso a -20 °C hasta su análisis. La extracción de atrazina adsorbida en el carbón se realizó tratando el carbón y el filtro de papel en un matraz de 250 ml con 100 ml de metanol a 20 °C con agitación orbital durante 48 hs. Se recuperó el sobrenadante alcohólico por filtración en filtro de poliamida y se congeló a -20 °C hasta su análisis. Se cuantificó por HPLC la cantidad de atrazina en el sobrenadante en metanol (adsorbida) y en el sobrenadante acuoso (no adsorbida).

El ensayo se realizó en 20 viales que se procesaron a diferentes tiempos para determinar la cantidad de atrazina y metabolitos, tanto los adsorbidos al carbón activado como los que quedaron en el sobrenadante acuoso del medio de cultivo. Los viales con medio MDA, carbón activado y atrazina se pre-incubaron en oscuridad durante 4 días a 30 °C, con agitación, para asegurarse la adsorción de la atrazina sobre el carbón activado. Luego se inocularon 12 viales con 5% de inóculo fresco del consorcio ACLD 25.2 que se mantuvieron incubándose en las mismas condiciones. Adicionalmente, se incubaron 4 viales sin inocular (controles abióticos). Los restantes 4 viales fueron procesados para cuantificar la atrazina del sobrenadante acuoso y la adsorbida al momento de la inoculación (tiempo 0). Los viales inoculados se procesaron después de 4, 11 y 17 días de inoculados y los controles abióticos se analizaron a los 17 días de incubados.

Resultados y Discusión

Optimización de la determinación de atrazina y metabolitos en matrices acuosas

En este trabajo se logró poner a punto un método isocrático para separar algunos metabolitos de atrazina que, si bien demanda mayores tiempos de corrida para la separación, permite la utilización de un equipo más sencillo (con una sola bomba). Además, posibilita el reciclado de la fase móvil que disminuye la contaminación y el costo del análisis. El trabajo cubre un rango de metabolitos de biodegradación posibles más acotado que el reportado en la literatura (Udiković-Kolić et al., 2012). Sin embargo, estos metabolitos han sido encontrados como intermediarios de la degradación en varios microorganismos y no es posible conocer a priori cuál vía utilizará un consorcio degradador determinado. Asimismo, otros metabolitos reportados no difieren sustancialmente en su estructura química de los ensayados, por lo cual sería posible integrar nuevos metabolitos a la metodología desarrollada.

El grado de similitud en las estructuras de los dos intermediarios desalquilados, que solo difieren en un grupo metilo, fue el primer problema en abordar dado que la separación cromatográfica en fase reversa se basa en las diferencias de hidrofobicidad que presentan los compuestos a separar. Se ensayaron variantes en la fase móvil con dos solventes orgánicos y diferentes concentraciones. Se trabajó con metanol y acetonitrilo (en adelante ACN) en dos concentraciones para cada fase orgánica: 40% y 60% para metanol, 17% y 20% para

ACN. Aunque las separaciones con todas las condiciones fueron buenas, se seleccionó la concentración de 17% de ACN porque separó mejor los compuestos desalquilados. Se ensayaron dos flujos, 1 ml/min y 0,5 ml/min, y se encontró que este último mejoraba mucho la separación de estos dos compuestos tan similares. Los tiempos de retención, expresados en minutos, fueron: 3,8 (AC), 6,0 (DIHA), 6,2 (DEHA), 16,8 (HA) y 70 para AT. La disminución de la concentración de ACN mejoraría la separación de los compuestos desalquilados pero aumentaría aún más el tiempo de retención de la AT, debido a la falta de fuerza del solvente para hacerla eluir de la columna. Con estas condiciones se obtuvieron similares tiempos de retención entre AT y HA que los obtenidos por Vermulen et al. (1982) en condiciones cromatográficas diferentes.

Para disminuir el tiempo de análisis y mantener la separación de los metabolitos más similares se trabajó con el gradiente de flujo que se describe en la sección Materiales y Métodos. En la Figura 1a se muestra el cromatograma obtenido en estas condiciones que permitieron reducir el tiempo de elución de atrazina de 70 min a 37,6 min.

Para evitar la elución del AC con el frente de la corrida se ensayó una cromatografía de par iónico modificada de Hou y Ding (2011). Se utilizó hidróxido de tetrabutilamonio (TBAOH) como reactivo de par iónico en concentración de 3 mM en la fase móvil ACN/buffer fosfato 0,01 M pH 7,00 (17:83). En la Figura 1b se muestra el cromatograma obtenido del análisis de la solución acuosa de los estándares con estas condiciones; se pudo observar que el AC tiene un tiempo de retención de 4,8 min, mientras que sin el TBAOH eluye a los 4,0 min. En la Figura 1b también se puede ver que el TBAOH no tuvo efecto apreciable sobre la elución del resto de los compuestos. Con estas condiciones se obtuvieron tiempos de retención similares para el AC que los obtenidos por Hou y Ding (2011).

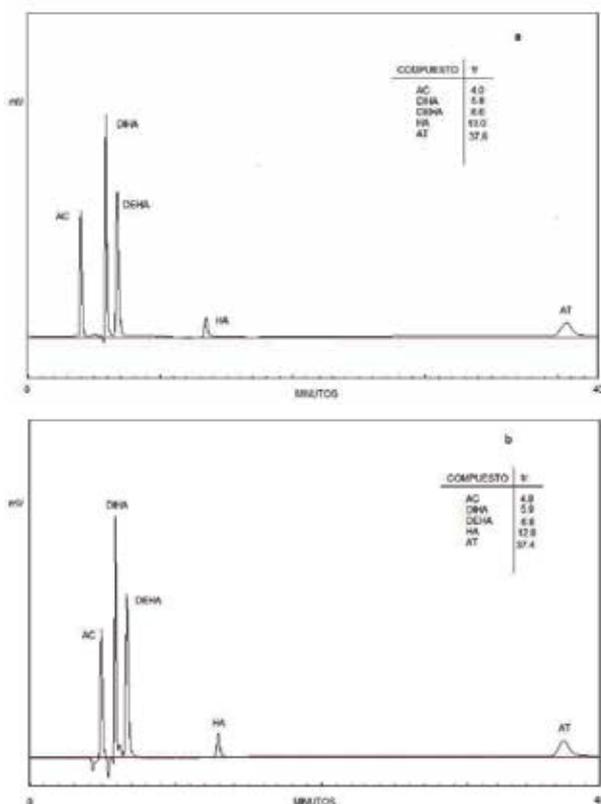


Figura 1. Cromatograma de separación por HPLC con gradiente de flujo de una mezcla de 2 mg/l en solución acuosa de: AC (ácido cianúrico), DIHA (desisopropilhidroxiatrazina), DEHA (desetilhidroxiatrazina), HA (hidroxiatrazina) y AT (atrazina), utilizando como fase móvil: (a) ACN/buffer fosfato 0.01 M pH 7 (17:83); (b) ACN/buffer fosfato 0.01 M pH 7 (17:83), TBAOH 3 mM.

En la Figura 2 se observa el efecto de la matriz sobre la determinación de AC. El medio MDA contiene ácidos que pueden formar par iónico con el TBAOH y que podrían interferir con la determinación de AC. En esta figura se puede apreciar que el pico del AC en MDA presenta un ensanchamiento en la base, que se podría deber a la interferencia de alguno de los ácidos presentes en el MDA. El aumento relativo del área de AC en MDA respecto a la fase acuosa fue del orden del 10%.

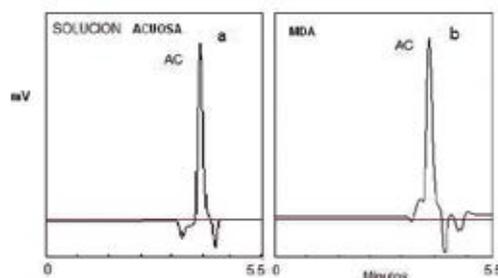


Figura 2. Efecto de la matriz en la elución del AC con fase móvil ACN/buffer fosfato 0,01 M pH 7 (17:83), TBAOH 3 mM: (a) fase acuosa; (b) medio MDA.

Aplicación del método para la caracterización de enriquecimientos degradadores de atrazina en medio acuoso

Se realizó una caracterización metabólica de enriquecimientos degradadores de AT en MDA. En la Figura 3 se muestran los análisis de los metabolitos acumulados luego de la incubación de cuatro enriquecimientos diferentes. Las diferencias fueron el origen del inóculo (Aguas Corrientes o Dolores), las condiciones de incubación (temperatura y presencia o ausencia de nitrato) y el número de subcultivos sucesivos. En la Figura 3a se observa que en el enriquecimiento con inóculo de Aguas Corrientes, incubado a 30 °C con nitrato, se acumula AC en el medio y se degrada la AT completamente. Los restantes análisis corresponden a enriquecimientos realizados a partir de aguas de Dolores. En las Figuras 3b y 3c se muestran los metabolitos acumulados de dos subcultivos sucesivos, incubados a 30 °C y con nitrato. Se puede observar que en el enriquecimiento 9.2 (Figura 3c) posterior al enriquecimiento 9 (Figura 3b) la degradación de AT es menor y la acumulación de HA mayor. Esta información permite conocer cuáles son los pasos de la vía de degradación que son más vulnerables en este enriquecimiento. Dado que se trata de un conjunto de bacterias con diferentes capacidades metabólicas que actúan concertadamente, es necesario conocer cuáles son los microorganismos o actividades más lábiles en el consorcio y que por tanto deben reforzarse para mantener la capacidad mineralizadora de estas asociaciones de bacterias. En la Figura 3d se muestra que en el enriquecimiento del mismo origen que los dos anteriores (Dolores) pero incubado a 20 °C sin nitrato, la AT se degrada completamente y se acumula AC. Este perfil es similar al de la Figura 3a, de origen y condiciones de incubación diferentes, lo que indica que estos factores pueden ser útiles para seleccionar consorcios degradadores con diferentes perfiles de intermediarios. Estos resultados señalan que el método optimizado en este trabajo permite distinguir el perfil metabólico de los consorcios bacterianos degradadores de atrazina en enriquecimientos obtenidos en diferentes condiciones.

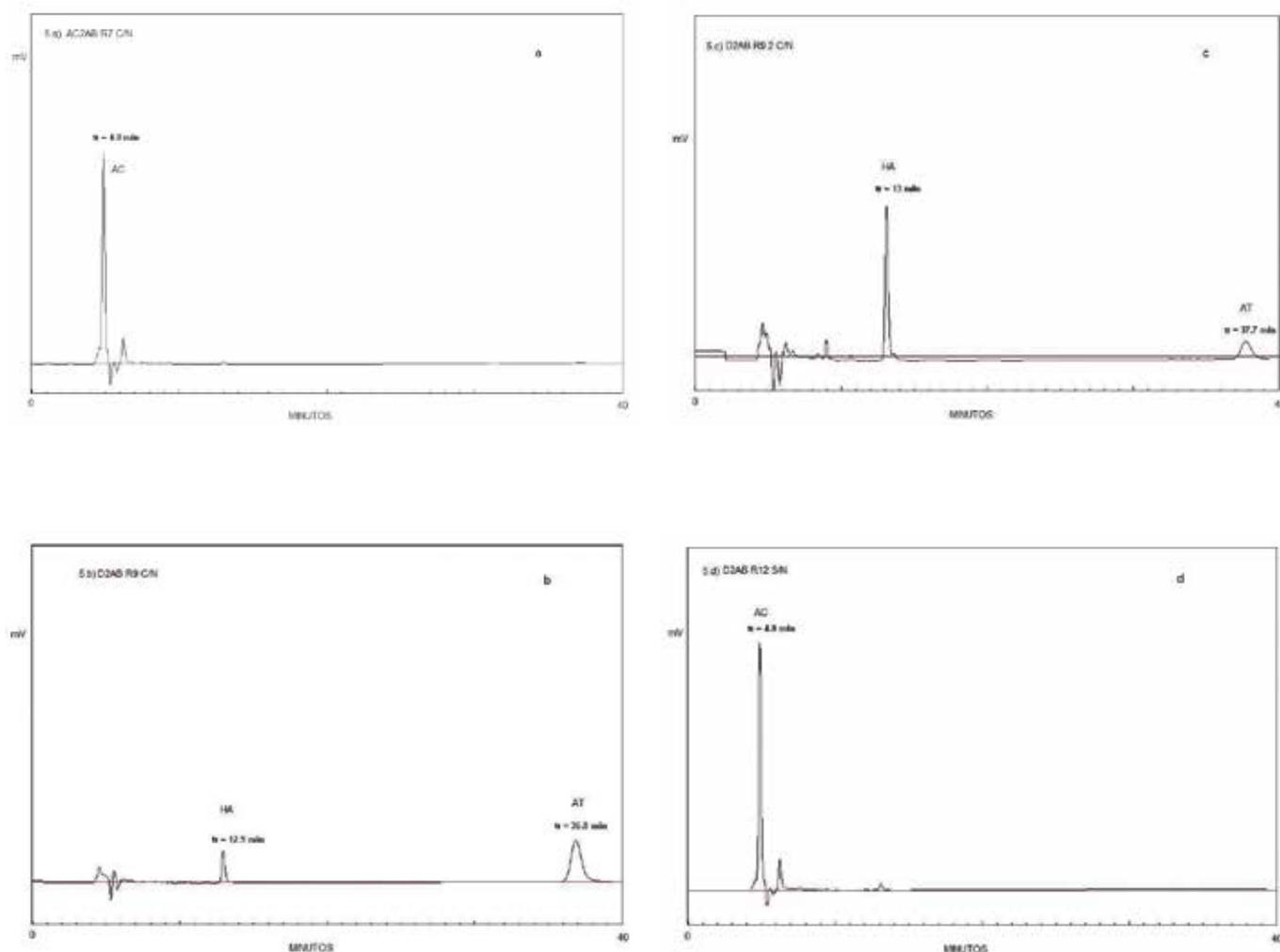


Figura 3. Perfil de atrazina y metabolitos acumulados por diferentes enriquecimientos bacterianos analizados por HPLC: a) enriquecimiento (subcultivo 7) proveniente de Aguas Corrientes incubado con nitrato a 30 °C; b) enriquecimiento (subcultivo 9) proveniente de Dolores incubado con nitrato a 30 °C; c) ídem a b) (subcultivo 9.2); d) enriquecimiento (subcultivo 12) proveniente de Dolores incubado sin nitrato a 20 °C.

Aplicación del método para determinar la biodegradación de atrazina adsorbida sobre carbón activado

La relación 40:1 de C activado a atrazina permitió que el herbicida se adsorbiera completamente. Durante la incubación no se observó atrazina en el sobrenadante acuoso de ningún vial, por lo que el herbicida permaneció adsorbido al carbón en todos los tratamientos y condiciones. Sin embargo, esta relación C:atrazina no permitió una buena recuperación de la atrazina adsorbida mediante su extracción con metanol. En los controles abióticos a tiempo 0 y después de 18 días de incubación se recuperó 30 y 32% de atrazina, respectivamente (Tabla 2). A pesar de que la extracción con metanol ha sido ampliamente recomendada en la bibliografía (Ghosh y Philip, 2005; Aktas y Cecen, 2007), probablemente la alta relación C:atrazina disminuyó los rendimientos. En un análisis previo en nuestro laboratorio en el que la relación C:atrazina fue de 2:1, se recuperó el 100% de atrazina con el mismo procedimiento de extracción. Se eligió la relación 40:1 porque es la que emplea OSE para adsorber atrazina y otros compuestos que se encuentran en el agua bruta a la entrada de las plantas de potabilización.

En la Tabla 2 se observa que en los viales inoculados con los consorcios activos se recuperó la misma cantidad de atrazina que en los controles abióticos. Aun después de 17 días de incubación, la atrazina adsorbida no fue degradada por el consorcio bacteriano. Esto

	Tiempo de incubación (días)			
	0	4	11	17
Control abiótico	30 ± 4	nd	nd	32 ± 1
Ensayo inoculado	nd	38 ± 3	32 ± 1	30 ± 3

Tabla 2. Porcentaje de recuperación de atrazina adsorbida sobre carbón activado durante la incubación en medio MDA inoculado con el consorcio bacteriano ACLD25 y no inoculado (Control abiótico). Desviación estándar de 4 replicados. En todos los casos la concentración de atrazina en el sobrenadante fue menor que el límite de detección (0.5 mg/l). nd: no determinado.

podría explicarse porque el C activado en polvo se aglomera después de la inoculación y disminuye el área de contacto entre las bacterias y los poros. Por otra parte, debido a que el tamaño de poro es del orden de los nm, el acceso de las bacterias a esos poros es difícil y solo si hay una desorción paulatina y reversible los microorganismos tendrían acceso a la atrazina. Se verificó que los consorcios inoculados permanecían viables y activos a los 15 y 21 días, ya que crecieron en placas de TSA y degradaron el 100% de atrazina disuelta en medio MDA sin C activado.

Se han utilizado filtros de C activado inoculados con bacterias para la remoción de atrazina de aguas superficiales (Jones et al., 1998; Zanini, 2010). Por otra parte, también se han utilizado microorganismos

para regenerar el Carbón activado empleado como adsorbente. La bioregeneración de carbón activado es un proceso biológico económico y potencialmente eficiente para recuperar la capacidad adsorbente del carbono. Es un proceso amigable con el medio ambiente que utiliza los microorganismos para degradar los compuestos adsorbidos. La eficiencia de la bioregeneración depende de parámetros fisicoquímicos que faciliten la desorción y de la capacidad degradadora de los microorganismos (Nath et al., 2011). El proceso es factible si hay un gradiente de concentración del compuesto adsorbido entre el carbón y el sobrenadante o si los microorganismos degradadores producen exoenzimas capaces de alcanzar el compuesto en los diminutos poros del adsorbente (Aktas y Cecen, 2007). Por ello, esta biotecnología merece ser estudiada en mayor profundidad en condiciones similares a las ambientales y manejando parámetros fisicoquímicos que exploten la actividad metabólica de los microorganismos autóctonos.

Conclusiones

La modificación de la composición de la fase móvil, con el agregado de un agente de par iónico, y el gradiente de flujo permitieron optimizar un método isocrático para separar atrazina de algunos de sus productos de degradación microbiana en solución acuosa y en medio de cultivo.

Además, se pudo comprobar que el método resulta adecuado para distinguir diferentes capacidades metabólicas en enriquecimientos microbianos de bacterias autóctonas de distinto origen e incubados en diferentes condiciones.

La fuerte adsorción de atrazina al carbón activado no permitió determinar si un consorcio bacteriano eficiente en la degradación de atrazina soluble puede actuar sobre la atrazina adsorbida.

Reconocimientos

Financiación: Comisión Sectorial de Investigación Científica, UdelAR (Proyecto CSIC -SP 603). Agencia Nacional de Innovación e Investigación, Uruguay (Proyecto de Iniciación a la Investigación de JDC).

Colaboración en la coordinación y el muestreo en las plantas de potabilización, Laboratorio Central de OSE. Agradecemos especialmente a la Ing. Quim. Gianella Bonari.

Agradecimiento al Prof. Javier Menes, quien proporcionó la columna de HPLC para los análisis.

Referencias

- AKTAS, O.; CECEN, F. Bioregeneration of activated carbon: a review. En: *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2007, 59:257-272.
- BEILSTEIN, P.; COOK, A. M.; HUTTER, R. Determination of seventeen s-triazine herbicides and derivatives by high-pressure liquid chromatography. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1981, 29:1132-1135.
- COOPER, R. L.; STOCKER, T. E.; TYREY, L.; GOLDMAN, J. M.; MCELROY, W. K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. En: *Toxicological Sciences*. 2000, 53:297-307.
- DOWNES, C. J.; MITCHELL, J. W.; VIOTTO, E. S.; EGGERS, N. J. Determination of cyanuric acid levels in swimming pool waters by UV absorbance HPLC and melamine cyanurate precipitation. En: *Water Research*. 1982, 18:277-280.
- DUFEK, P.; PACÁKOVÁ, V.; TESAROVÁ, E. Separation and behavior of s-triazine derivatives on a NH₂-chemically bonded stationary phase by high performance liquid chromatography. En: *Journal of Chromatography*. 1980, 191:115-120.
- EL PAÍS DIGITAL. *Crece el nivel de herbicida en cuenca de Santa Lucía* [En línea]. Montevideo: El País Digital, 2010. [Consulta: 19 de noviembre de 2013]. Disponible en: <http://www.elpais.com.uy/100209/pciuda-470256/ciudades/crece-el-nivel-deherbicida>.
- ERICKSON, L. E.; LEE, K. H. Degradation of atrazine and related s-triazines. Critical reviews En: *Environmental Control*. 1989, 19:1-14.
- GHOSH, P. K.; PHILIP, L. Performance evaluation of waste activated carbon on atrazine removal from contaminated water. En: *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 2005, 40:425-441.
- HOU, S.; DING, M. Determination of cyanuric acid in milk powder & swimming pool water by ion pair reversed phase liquid chromatography. En: *Chinese Journal of Chemistry*. 2011, 29:783-786.
- JESSE, J. A.; VALERIA, C.; BENOIT, R. E.; HENDRICKS, A. C.; MCNAIR, H. M. Determination of cyanuric acid by high-performance liquid chromatography. En: *Journal of Chromatography*. 1981, 207:454-456.
- JONES, L. R.; OWEN, S. A.; HORRELL, P.; BURNS, R.G. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. En: *Water Research*. 1998, 32:2542-2549.
- KARLAGANIS, G.; VON ARX, R.; AMMON, H. U.; CAMENZIND, R. High-performance liquid chromatographic determination of atrazine, deisopropylatrazine and deethylatrazine in soils from corn fields. En: *Journal of Chromatography*. 1991, 549: 229-236.
- LIN, T.; WEN, Y.; JIANG, L.; LI, J.; YANG, S.; ZHOU, Q. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. En: *Chemosphere*. 2008, 72:122-128.
- MANDELBAUM, R. T.; WACKETT, L. P.; ALLAN, D. L. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, 59:1695-1701.
- MGAP. *Importación de productos fitosanitarios* [En línea]. Montevideo: Uruguay, 2011. [Consulta: mayo de 2013]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/dgssaa/DivAnalisisDiagnostico/DAYD_PROFIT_ESTADISTICA.htm
- NATH, K.; BHAKHAR, M. S.; PANCHANI, S. Bioregeneration of spent activated carbon: effect of physico-chemical parameters. En: *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2011, 70:487-492.
- PATNAIK, P. *Handbook of environmental analysis*. Florida: CRC Press, 1997
- PINELLI, L.; DA CUNHA, J.; BELLINI, M. I.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Selección y caracterización de consorcios de bacterias como herramientas de biorremediación de la contaminación por atrazina en plantas potabilizadoras de agua [En línea]. En: UNIVERSIDAD DE LA PLATA. *Actas del 7º Congreso de Medio Ambiente AUGM, 2012*. La Plata: Universidad Nacional de la Plata. [Consulta: mayo de 2013]. Disponible en: <http://congresos.unlp.edu.ar/index.php/CCMA/7CCMA/paper/viewFile/978/247>
- RADOSEVICH, M.; TRAINA, S. J.; HAO, Y.; TOUVINEN, O. H. Degradation and mineralization of atrazine by soil bacterial isolate. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61:297-302.

- RODRÍGUEZ, M. V.; THIRUCHELAVAM, M.; CORY-SLETTCHA, D. A. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. En: *Environmental Health Perspectives*. 2005, 113:708-715.
- SALABERRIA, I.; HANSENC, B. H.; ASENSIOA, V.; OLSVIKD, P. A.; ANADERSENB, R. A.; JENSSEN, B. M. Effects of atrazine on hepatic metabolism and endocrine homeostasis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). En: *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 234:98-106.
- SMOLKOVA, E.; PACAKOVA, V. Liquid chromatographic separation and behaviour of some substituted s-triazines on a CN-bonded stationary phase. En: *Chromatographia*. 1978, 12:698-702.
- STEINHEIMER, T. R. HPLC determination of atrazine and principal degradates in agricultural soils and associated surface and ground water. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993, 41:588-595.
- TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC3. En: *FEMS Microbiology Letters*. 1983, 16:241-245.
- UDIKOVIC-KOLIC, N.; SCOTT, C.; MARTIN-LAURENT, M. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. En: *Applied Microbiol Biotechnology*. 2012, 96:1175-1189.
- VERMULEN, N. M. J.; APOSTOLIDES, Z.; POTGIETER D. J. J.; NEL, P. C.; SMIT, N. S. H. Separation of atrazine and some of its degradation products by high performance liquid chromatography. En: *Journal of Chromatography*. 1982, 240:247-253.
- ZANINI, J. *Estudo da remoção do herbicida atrazina por biofiltração em filtros lentos de areia e carvão ativado associada à ação microbiana* [En línea]. Sao Paulo: Faculdade de Engenharia, UNESP, 2010. [Consulta: mayo de 2013]. Disponible en: <http://www.acervodigital.unesp.br/handle/123456789/61402>

Estudio comparativo de la estabilidad lipídica de harinas de soja, sorgo, avena, salvado y germen de trigo con y sin extrusión

Comparative study of lipidic stability of soybean, sorghum, oat, bran and wheat germ flours with and without extrusion

Crosa, María José ⁽¹⁾, Curia, Ana ⁽²⁾, Curutchet, Ana ⁽³⁾, Cadenazzi, Mónica ⁽⁴⁾, Dotta, Gabriela ⁽⁵⁾, Ferreyra, Verónica ⁽²⁾, Maidana, Fabianna ⁽⁵⁾, Souto, Laura ⁽¹⁾, Escudero, Jorge ⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Gerencia de I+D+I, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - ⁽²⁾ Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnologías para la Industrialización de Cereales y Oleaginosas del Instituto de Tecnología Industrial, INTI, Buenos Aires, Argentina - ⁽³⁾ Departamento de Análisis de Productos Agropecuarios, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - ⁽⁴⁾ Consultor estadístico - ⁽⁵⁾ Departamento de Cereales, Oleaginosos y Productos Derivados, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - ⁽⁶⁾ Cooperativa Agraria Nacional, Copagran.

Contacto: mcrosa@latu.org.uy

Recibido: 3/6/2013 - Aprobado: 1/11/2013

Resumen

El consumo de harinas de grano entero está condicionado por la pérdida de calidad nutricional, funcional y sensorial durante su almacenamiento. En este estudio se evaluó el efecto del proceso de extrusión en la degradación lipídica de harina de varios tipos de granos y derivados (soja, sorgo, avena, salvado y germen de trigo). Se realizó seguimiento de ácidos grasos libres, humedad, actividad de agua y del desarrollo del descriptor “rancio-oxidado” por olfatación directa, en muestras de harina con y sin extrusión almacenadas durante 60 días en bolsa de polietileno de 30 micrones a 30-35 °C. También se estudió la aceptabilidad de pan elaborado con 36% de incorporación de una combinación de harinas. Se realizaron medidas de color, materia grasa y actividad ureásica al inicio, medio y final del almacenamiento. Se ajustaron funciones de regresión de la diferencia “sin extrusión” y “con extrusión”, para las medidas AGL, Aw, %H. Los resultados obtenidos indicaron que la extrusión disminuye significativamente la degradación lipídica de las harinas de sorgo, salvado, soja, avena; sin embargo, la harina de germen extrudida tuvo un aumento de rancidez por oxidación. La incorporación de las harinas no extrudidas en la masa de pan disminuyó significativamente la aceptabilidad y afectó la textura y volumen del pan.

Palabras clave: Harinas compuestas, degradación, rancidez, hidrólisis, oxidación.

Abstract

Consumption of whole grain flour is determined by the loss of nutritional, functional and sensory quality during storage. This study evaluates the effect of the extrusion process in the lipid degradation of flour of various types of cereal (soybean, sorghum, oat bran and wheat germ). Free fatty acids, moisture, activity and the development of the “rancid-oxidized” descriptor were followed up by direct olfaction in flour samples with and without extrusion stored for 60 days in a polyethylene bag of 30 micron to (30-35) °C. The acceptability of bread made with 36% incorporation of a combination of flours was also studied. Measurements of color, fat and urease activity at the beginning, middle and end of storage were conducted. Regression functions were fitted to the difference “without extrusion” and “extrusion” for measures of AGL, Aw, % H. The results showed that extrusion significantly decreased lipid degradation of sorghum flour, bran, soybean, oat, however, the extruded germ meal had an increased oxidative rancidity. Incorporating flours without extruded bread dough decreased significantly the acceptability and affect the bread texture and volume.

Keywords: Multigrain flour, degradation, rancidity, hydrolysis, oxidation.

Introducción

Las harinas de grano entero se caracterizan por su aporte de fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes y otros nutrientes que las diferencian de las harinas refinadas. La Organización Mundial de la Salud (Asamblea Mundial de la Salud, 2002) recomienda el aumento del consumo de fibra mediante la ingesta de “grano entero” para la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles. El consumo de harinas de grano entero se ha relacionado con la reducción del riesgo

de enfermedades cardíacas y diabetes e incluso puede ayudar al manejo del peso corporal y al retardo del proceso de envejecimiento (U.S. Department Of Agriculture y U.S. Department of Health and Human Services, 2010). La Asociación de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (U.S Food and Drug Administration, 2003) afirma: “Dietas ricas en alimentos de grano entero y otros alimentos de origen vegetal, y que son bajas en grasa total, en grasa saturada y colesterol, pueden reducir los riesgos de enfermedades cardíacas y ciertos tipos de cáncer”. El servicio del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (U.S. Department of Agriculture) en 2010 recomendaba que al

menos el 50% del consumo de grano debe ser grano entero; a partir de julio de 2014 la recomendación aumentará al 100%.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) inició el “Programa de Harinas Compuestas” con el objeto de buscar nuevas posibilidades para la utilización de materias primas distintas y complementarias al trigo en la producción de pan, galletas, pastas y otros alimentos derivados de cereales. El término “harinas compuestas” se usa para indicar la mezcla de harinas de cereales y leguminosas, con aporte nutricional complementario. Estas harinas compuestas se están utilizando en diversas partes del mundo con el objeto de remediar, en parte, las deficiencias de proteínas, vitaminas y minerales de la dieta.

Su desarrollo comercial ha sido acotado por la vida útil más corta comparada con las harinas refinadas. El grano entero posee su contenido natural de grasas, aceites y de enzimas lipolíticas que dificultan su incorporación en los alimentos. Tait et al. (1988) estudiaron la disminución de la calidad del pan debido al enranciamiento de las harinas, resultados verificados por otros autores (Hansen y Rose, 1996; Pomeranz et al., 1992).

La degradación lipídica es la principal causa de reducción de la funcionalidad, palatabilidad y propiedades nutricionales. Las estrategias para estabilizar la harina de grano entero deberían estar focalizadas en el control de la actividad de las enzimas lipolíticas (Doblado et al., 2012). Vetriniani et al. (1990) sometieron el salvado a 175 °C durante 40 minutos, logrando un aumento de la vida útil de 20 a 90 días. Rose et al. (2008) estudiaron la efectividad del tratamiento de calor, vapor y microondas en la disminución de la actividad de la lipasa, sin aumento de la oxidación.

La extrusión fue clasificada como una tecnología de cocción HTST (alta temperatura, corto tiempo), que provoca cambios químicos y físicos deseables en el alimento. La extrusión minimiza la degradación de los nutrientes por calor, mejora la digestibilidad por gelatinización del almidón y desnaturalización de la proteína, comparada con los procesos térmicos tradicionales. Es un proceso de alta productividad con una significativa retención de nutrientes. La extrusión destruye o inactiva los componentes antinutricionales o tóxicos (inhibidores de tripsina, hemaglutininas, etcétera), enzimas indeseables como la lipoxigenasa, peroxidasa y microorganismos y preserva las propiedades nutricionales (Sosa Moguel et al., 2009; Athar et al., 2006; Brennan et al., 2011; Killeit, 1994; Turgeon et al., 2011). El deterioro de las harinas no solo afecta su aporte nutricional, sino también la aceptabilidad sensorial del pan (Tait et al., 1988).

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del proceso de extrusión en la degradación lipídica de harina de varios de tipos de granos y derivados (soja, sorgo, avena, salvado y germen de trigo).

Materiales y Métodos

Análisis fisicoquímicos de las harinas

Granulometría, tamizado en equipo Retsch, con Tamices ASTM #18, #60 y base, en amplitud 60 durante 10 minutos. Medida por triplicado.

Proteínas, expresada en gramos de proteína en 100 g de harina según AACC 46-30, método de combustión en equipo Leco FP-528

Fibra total e insoluble, expresada en gramos de fibra en 100 g de harina determinada por método gravimétrico enzimático según: Official Methods of Analysis of AOAC International método 985.29.

Cenizas, según ISO 2171.

Aw, medida en AQUALAB SERIES 3TE.

Humedad expresada en gramos de agua en 100 g de harina. En la harina de soja se siguió el protocolo de análisis basado en AOCs Bc

2-49. En el resto de las harinas, la determinación de humedad fue en base a la técnica AACC 44-40.

Materia grasa (% MG), expresada en gramos de materia grasa en 100 g de materia seca de la harina. En equipo Soxtec de Tecator, solvente éter de petróleo ppa., se expresa en g/100 g de muestra de harina, luego de determinar el tiempo óptimo de extracción de materia grasa para cada harina. En soja basado en AOCs Bc 3-49.

Ácidos grasos libres (% AGL), expresados en gramos de oleico en 100 g de materia grasa. Se determina por valoración de los ácidos grasos libres con solución de NaOH.

Color, fue determinado en colorímetro HUNTERLAB PLUS XE. Las medidas de color fueron expresadas por los valores especiales obtenidos por el sistema CIE- $L^* a^* b^*$; el parámetro L^* describe la luminosidad en una escala de 0 (negro) a 100 (blanco puro), el parámetro a^* es matiz del color (+ rojo – verde), y el parámetro b^* es matiz del color (+ amarillo – azul). Se determinó el índice de blancura (WI), acorde a Hsu et al. (2003).

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

Actividad ureásica en soja, según AOCs Bc 9-58

Evaluación sensorial del descriptor “rancio-oxidado”

Un panel conformado por seis evaluadores seleccionados según la Norma IRAM 20005-1 evaluó las muestras por discusión y consenso en mesa redonda bajo la metodología de Análisis Descriptivo Cuantitativo (QDA). Los evaluadores fueron entrenados según las normativas: AOCs. 1989 y FIL-IDF 99C. 1997

Las unidades experimentales se evaluaron por olfatación directa. Las muestras se presentaron en vasos descartables de poliestireno con tapa codificadas con números de tres dígitos al azar. El descriptor evaluado fue rancio-oxidado. Aproximadamente 30 g de cada harina fueron servidos para cada evaluador. Se agitó el vaso previo a destaparlo y se realizaron aspiraciones cortas y profundas. Se evaluó en una escala lineal de 10 cm anclada en los extremos (0= nada de intensidad de aroma rancio, 10= mucha intensidad de aroma rancio).

Para el entrenamiento en el descriptor crítico rancio-oxidado se empleó una muestra de aceite enranciado según la norma AOCs (1989), que estuvo disponible en las cuatro sesiones de evaluación. Se consensuó como valor de referencia de entrenamiento por aroma la muestra enranciada a 60 °C/14 días como valor 6 en la escala sensorial de 0 a 10.

Proceso de elaboración de las harinas

Las harinas fueron elaboradas en la planta semi-industrial del Centro Cereales y Oleaginosas del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (9 de Julio, Buenos Aires, Argentina). Las condiciones óptimas de procesamiento de cada tipo de harina se determinaron antes de este ensayo.

Para las harinas no extrudidas se procedió a la clasificación y limpieza de los granos usando una zaranda de “clasificación por tamaño”, y luego se llevó a cabo la molienda de los mismos en un molino de martillo. Allí se usaron mallas de diferente luz para la obtención de la granulometría de las distintas harinas (soja, avena o sorgo). En el caso del salvado y germen de trigo se utilizaron tal como estaban.

En el caso de las harinas extrudidas, los granos clasificados y limpios fueron llevados hasta el tamaño de partícula inferior a 4 mm en un molino de martillo. Los granos molidos de avena, sorgo y soja, el germen y el salvado sin moler fueron procesados en una extrusora

de tornillo simple de tres secciones con las siguientes especificaciones: longitud del barril, 200 mm; diámetro del barril, 105 mm; velocidad de tornillo de 60 rpm. La velocidad de alimentación de la extrusora fue en promedio 550 kg/h y el tiempo de residencia del producto fue de tres segundos. La temperatura de extrusión fue puesta a punto para cada tipo de grano en ensayos previos.

En el procesamiento de la soja y el germen la torta obtenida luego de la extrusión se desgrasó parcialmente mediante prensa-tornillo. En la siguiente etapa se procedió al enfriado del producto mediante una corriente de aire que es forzada a pasar a través de la columna de secado. Este flujo de aire intercambia calor con el material molido, logrando de esta manera el enfriamiento y secado de las harinas. Finalmente se llevó a cabo la molienda final en molino de martillo hasta la granulometría deseada para cada harina. Todos los productos finales fueron envasados en bolsas de papel Kraft (doble lámina) con lámina interna de polietileno.

Ensayos de almacenamiento de las harinas

Seguimiento de degradación lipídica por hidrólisis. Se prepararon 10 muestras de 50 g en bolsas de polietileno de 30 micrones de cada tipo de harina. Se almacenaron en cámara acondicionada a 35 °C, 65% HR, cada 10 días se tomaron muestras y se congelaron a -18 °C en envases con barrera de oxígeno y agua por un período no mayor a 10 días previo al análisis. Se analizaron: ácidos grasos libres, actividad de agua y humedad. En los días 0, 30 y 60 se realizaron duplicados de los muestreos, en los demás días el muestreo fue simple.

Se realizaron medidas de color y materia grasa. En la soja también se midió actividad ureásica. Los análisis se realizaron en los días cero (D0), treinta (D30) y sesenta (D60).

Seguimiento sensorial de degradación lipídica por oxidación. Una vez elaboradas todas las muestras fueron almacenadas en condición de freezer a -18 °C. Las unidades experimentales fueron ingresando de forma escalonada en la condición de estudio, de 30±2 °C, de modo que coincidieran en una misma sesión de evaluación. La muestra "0" siempre fue mantenida en freezer. Los tiempos de almacenamiento fueron 20, 40 y 60 días. Cada unidad experimental consistió en muestras de 200 g en bolsas de polietileno de 30 micrones, para cada tipo de harina. Se almacenaron en cámaras acondicionadas a 30±2 °C.

Ensayo de panificación

Pretratamiento de harinas compuestas. Se tamizan las harinas de salvado, soja, avena, y sorgo sin extrusión, de manera de componer la misma granulometría que la harina extrudida y posteriormente se mezclan en diferentes proporciones logrando la siguiente composición centesimal: cenizas (4,4%), humedad (9,0%), fibra soluble (1,1%), fibra insoluble (29,5%), materia grasa (5%), proteína (24,5%). Previo a la elaboración del pan, la harina compuesta se pre-hidrató. Las harinas extrudidas se pre-hidrataron en relación 1:1 (harina: agua) en peso y las harinas no extrudidas se pre-hidrataron en relación 1:0,6 (harina: agua) en peso.

Proceso de elaboración de pan de molde. Se elaboró pan con harinas conservadas a temperatura de refrigeración de 5 °C, durante 12 meses. Previo a la elaboración del pan se realizaron medidas de ácidos grasos, humedad y acidez de las harinas. La formulación del pan fue la siguiente: harina refinada (960 g), harina compuesta (540 g), agua de la prehidratación de la harina compuesta, agua (576 g), sal (22,5 g), aceite refinado de girasol con un 84,5% de ácido oleico (45 g), levadura deshidratada (21 g), aditivo mejorador de pan compuesto por esteaeril lactilato de sodio, ácido ascórbico, azodicarbonamida, alfa amilasa fungal, pentosanas (12 g) y gluten vital (60 g). La harina compuesta se pre-hidrató antes de mezclar con los ingredientes sólidos en la amasadora. La harina compuesta extrudida se prehidrató con 540 g

de agua. La harina compuesta no extrudida se prehidrató con 324 g de agua.

Se elaboró pan de molde según el siguiente procedimiento: se mezclaron los ingredientes secos menos la levadura en amasadora HS-30, se agregaron el agua y el aceite, se amasó a velocidad lenta durante 5 min y a velocidad rápida durante 2 min. Se incorporó la levadura y se continuó amasando hasta que la masa quedara elástica. Se dejó descansar 5 a 10 min, se armaron bollos de 198 g, se dejaron descansar 15 min. Se arman y estiban en moldes con tapa de 60 mm de alto, 65 mm de ancho, 155 mm de largo. Se fermentaron durante 60 min a 35 °C y 80% humedad. Se cocinaron a 200 °C durante 25 min, se retiraron del horno y se desmoldaron inmediatamente. Se dejaron enfriar 2 horas.

Medida del índice de absorción de agua (IAA). La medida del índice de absorción en agua se realizó siguiendo el procedimiento de Anderson et al. (1969). Se pesaron 2,5 g de muestra en tubos de centrifuga de 50 mL y se le agregaron 30 mL de agua destilada, se termostató en baño de agua a 30 °C durante 30 min, agitándolos cada 5 min en un vortex durante 15 segundos. Luego se centrifugó a temperatura ambiente, a 5000 rpm por 30 min. Se separó el sobrenadante y se pesó el gel. El IAA se registró como el peso del gel (g) /gramos de muestra. La medida se realizó por triplicado.

Medida del volumen del pan. La medida de volumen de pan se realizó por método de desplazamiento de semillas de canola. Se llenó totalmente un recipiente plástico de 2,0 L, con semillas de canola, se enrasó y se registró el peso de las semillas. Se colocó el pan en el recipiente, se completó con semillas y se volvió a enrasar. Se midió el volumen de las semillas que quedaron en la probeta y se registró ese volumen como el volumen del pan. La medida se realizó por triplicado.

Ensayo de TPA en pan de molde. Ensayo TPA (Texture Analysis Profile) con texturómetro TA.XT2 usando un cilindro de 36 mm con bordes redondeados, en las siguientes condiciones de medida: Test speed: 1 mm/sec, 40 % deformación en 2,43 ± 0,02 cm (dos rodajas) y 5 segundos de relajación. Se realizaron 6 repeticiones en cada ensayo. Las muestras se cortaron en rebanadas de 2,5 cm de altura, la medida se realizó en el centro de la rebanada.

Evaluación sensorial del pan de molde. Las pruebas se llevaron a cabo en una sala de análisis estandarizada (ISO 8589:2007). Los consumidores (entre 40 y 50 por sesión) evaluaron la aceptabilidad de una rodaja de pan de 1 cm, utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1= Me disgusta muchísimo; 9= Me gusta muchísimo). Los evaluadores evaluaron una condición por vez en días diferentes y se utilizó agua sin gas como borrador.

Diseño estadístico

Estudio de la estabilidad lipídica de las harinas. Se realizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) en siete momentos de muestreo en el caso de las medidas de degradación lipídica por hidrólisis y de cuatro momentos de muestreo en el caso de la degradación lipídica por oxidación. Fueron realizadas dos repeticiones reales en los días 0, 30 y 60 en el seguimiento de degradación lipídica. Los factores de estudio son: "extrusión" con dos niveles (con y sin) y factor "harinas" con cinco niveles (soja, sorgo, avena, germen de trigo y salvado de trigo). Se ajustaron funciones de regresión según el comportamiento de las variables medidas en el período considerado.

Ensayo de panificación. Se realizó un diseño en bloques completamente aleatorizado (DBCA) con un factor de estudio "extrusión" con dos niveles (con y sin) y tres bloques. En cada bloque se compara una elaboración de pan con harinas con y sin extrusión. Se estudiaron los resultados de las variables medidas por ANOVA y se compararon por Tukey 5%.



Resultados y Discusión

Análisis fisicoquímico de las harinas

En la Tabla 1 se presentan los valores de caracterización nutricional de las harinas de soja, sorgo, avena, germen y salvado de trigo y su granulometría.

Muestra	% Cenizas	% Fibra total	% Proteína	% Humedad
Germen	3,44	14,1	25,5	10,2
Soja	5,8	27	41,6	8
Avena	2,32	21,3	15,9	11,2
Salvado	5,19	43,4	16	7,9
Sorgo	0,9	4,1	7,4	13,8

Tabla 1. Caracterización nutricional de las harinas de germen, soja, avena y salvado extrudidas.

El tamaño de partícula de las harinas extrudidas resultó ser levemente mayor que las no extrudidas, como se detalla en la Tabla 2.

En la Tabla 3 se presentan los valores de color, MG y actividad ureásica de las harinas con y sin extrusión. Se observó una disminución significativa del WI en las harinas de salvado y la soja con extrusión respecto a las sin extrusión. En el caso del salvado se observó un incremento del color rojo y en la soja aumentó el amarillo; además de la significativa disminución del parámetro L* en ambas harinas extrudidas.

El valor de actividad ureásica de la soja extrudida cumple con la normativa MERCOSUR para consumo humano; es 6,5 veces menor al de la harina no extrudida. Las harinas son parcialmente desgrasadas durante el proceso de extrusión. La harina de sorgo extrudida presenta un 51,5% menos de materia grasa, el salvado un 36,6%, el germen un 26,6%, la soja extrudida presenta solo un 5,7% menos de grasa. La materia grasa de la avena extrudida no presenta diferencia con la no extrudida.

		Tamiz 18 (malla 1 mm)	Tamiz 40 (malla 0,42 mm)	Tamiz 60 (malla 0,25 mm)	Tamiz 80 (malla 0,177 mm)	Base
SALVADO	S/Extrusión	25,4%		70,7%		3,8%
	C/Extrusión	50,4%		42,0%		7,6%
GERMEN	S/Extrusión	38,5%		57,5%		
	C/Extrusión	38,0%		50,4%		11,6%
SOJA	S/Extrusión		13,1%		84,3%	2,0%
	C/Extrusión		44,0%		47,5%	8,5%
AVENA	S/Extrusión	32,3%		52,6%		15,3%
	C/Extrusión	0,0%	63,5%			36,5%
SORGO	S/Extrusión	31,7%		60,6%		7,7%
	C/Extrusión	0,05%		76,46%		26,49%

Tabla 2. Granulometría de las cinco harinas extrudidas.

		L		a		b		WI		% Materia Grasa (Bs.)		Actividad ureásica (Bs.)	
		Media	P valor DMS	Media	P valor DMS	Media	P valor DMS	Media	P valor DMS	Media	P valor DMS	Media	P valor DMS
SALVADO	S/Extrusión	54,67 a	0,011	7,76 a	0,025	14,06 a	0,313	51,91 a	0,01	3,33 a	0,01		
	C/Extrusión	47,46 b	4,53	6,78 b	0,78	14,61 a	1,32	45,04 b	4,32	2,11 b	0,57		
GERMEN	S/Extrusión	62,03 a	0,107	6,06 a	0,0004	16,92 a	0,993	57,98 a	0,26	9,05 a	0,002		
	C/Extrusión	60,43 a	2,14	3,82 b	0,56	16,92 a	2,03	56,80 a	2,54	6,68 b	0,95		
SOJA	S/Extrusión	72,95 b	0,017	3,14 a	0,072	21,19 b	0,0015	65,72 a	0,0023	11,11 a	0,0003	1,82 b	<0,0001
	C/Extrusión	73,26 a	1,31	1,57 a	1,79	23,62 a	0,87	62,87 b	1,15	10,47 b	0,16	0,27 a	0,48
AVENA	S/Extrusión	73,8 a	0,101	3,46 a	0,852	13,12 a	0,054	66,67 a	0,09	5,05 a	0,96		
	C/Extrusión	70,4 a	4,38	3,39 a	1,07	14,98 a	1,91	70,46 a	4,76	5,09 a	1,86		
SORGO	S/Extrusión	77,43 a	0,71	2,00 a	0,027	13,94 a	0,223	73,40 a	0,53	1,73 a	<0,0001		
	C/Extrusión	77,82 a	2,67	1,52 b	0,39	13,17 a	1,49	74,16 a	3,05	0,84 b	0,05		

Tabla 3. Valores de color, % materia grasa y actividad ureásica de las harinas con y sin extrusión. Letras iguales entre valores para un mismo tipo de harina indican que no existen diferencias significativas entre los procesos, según Tukey al 5%.



Seguimiento de degradación lipídica por hidrólisis

En la Tabla 4 se presentan los valores promedios de AGL, Aw y %H de las harinas con y sin extrusión.

DÍAS	TRAT	EXTRUDIDO			NO EXTRUDIDO		
		% AGL	AW	HUMEDAD	% AGL	AW	HUMEDAD
0	SALVADO	1,49	0,520	8,1	28,67	0,700	14,0
10	SALVADO	16,20	0,569	8,4	36,39	0,686	12,9
20	SALVADO	14,50	0,566	8,8	33,33	0,660	12,1
30	SALVADO	13,85	0,590	8,4	36,85	0,600	12,1
40	SALVADO	12,40	0,526	9,1	37,20	0,636	11,8
50	SALVADO	14,80	0,540	9	48,10	0,588	11,4
60	SALVADO	14,85	0,537	8,9	55,35	0,500	10,1
0	GERMEN	6,48	0,640	10,5	14,16	0,700	2,9
10	GERMEN	5,75	0,625	9,5	25,94	0,685	12,5
20	GERMEN	6,23	0,613	9,5	30,26	0,662	12,1
30	GERMEN	6,25	0,618	9	32,20	0,700	11,8
40	GERMEN	6,60	0,596	9,5	36,90	0,636	11,5
50	GERMEN	7,70	0,592	9,3	37,70	0,596	10,6
60	GERMEN	7,85	0,550	8,3	40,95	0,600	10,1
0	SOJA	1,47	0,519	8,1	4,39	0,600	10,1
10	SOJA	1,43	0,578	9,1	5,54	0,626	9,7
20	SOJA	1,72	0,551	8,8	6,93	0,630	10,1
30	SOJA	1,20	0,570	8,8	8,55	0,600	10,3
40	SOJA	1,40	0,533	8,7	8,40	0,622	10,1
50	SOJA	1,40	0,550	8,8	10,60	0,617	10,1
60	SOJA	1,55	0,561	8,8	11,85	0,600	9,5
0	AVENA	5,69	0,634	11,2	38,91	0,600	11,0
10	AVENA	5,06	0,623	11,1	49,22	0,585	10,6
20	AVENA	5,74	0,606	10,9	58,71	0,561	10,9
30	AVENA	4,10	0,605	10,3	61,60	0,600	10,9
40	AVENA	4,00	0,559	11	66,20	0,550	11,0
50	AVENA	5,30	0,542	10,6	68,50	0,522	10,3
60	AVENA	5,30	0,503	10,1	70,65	0,500	10,2
0	SORGO	23,09	0,725	13,8	31,50	0,700	13,8
10	SORGO	23,27	0,672	13,2	33,60	0,666	13,1
20	SORGO	19,31	0,609	12,6	45,98	0,618	12,5
30	SORGO	17,45	0,637	12,7	52,90	0,600	12,6
40	SORGO	16,00	0,596	12,9	59,70	0,562	12,6
50	SORGO	20,20	0,534	12,1	55,40	0,561	11,8
60	SORGO	21,55	0,500	11,2	60,50	0,500	11,5

Tabla 4. Valores de ácidos grasos calculados en base seca (AGL BS), actividad de agua (AW), humedad, durante el almacenamiento a 35 ± 2 °C en las harinas. Los días 0, 30 y 60 los valores corresponden al promedio de dos repeticiones reales.

El efecto del proceso de extrusión en las variables AGL, Aw y % humedad durante el período de almacenamiento se determinó mediante el ajuste de regresión lineal simple de la diferencia entre los valores de la harina sin extrudir y de la harina extrudida. En la Tabla 5 se observan los resultados del ajuste.

	AGL (g ácidos libres / g sólidos secos)						
	β_0			β_1			
	Media	LI _{95%}	LS _{95%}	Media	LI _{95%}	LS _{95%}	P valor
Avena	37,81	32,56	43,07	0,52	0,38	0,66	0,0001
Germen	12,14	7,51	16,77	0,39	0,26	0,51	0,0001
Salvado	20,59	13,11	28,08	0,24	0,14	0,45	0,05
Soja	2,98	2,31	3,65	0,12	0,10	0,14	0,0001
Sorgo	11,84	3,01	20,66	0,54	0,30	0,78	0,0008
	Aw						
Avena	-0,04	-0,06	-0,03	0,00041	0,00008	0,0007	0,02
Germen	0,06	0,05	0,07	-0,00067	-0,0003	-0,003	0,0017
Salvado	0,18	-0,005	-0,002	-0,0034	-0,005	-0,002	0,0004
Soja	0,09	0,07	0,11	-0,0008	-0,0001	-0,001	0,02
Sorgo	-0,02	-0,05	0,001	0,0005	-0,00009	0,001	---
	Humedad (g agua/ g sólido húmedo)						
Avena	-0,16	-0,72	+0,40	0,01	-0,01	0,02	---
Germen	-3,13	-7,53	+1,28	0,11	-0,01	0,23	---
Salvado	5,59	5,05	6,13	-0,07	-0,09	-0,06	0,0001
Soja	1,70	1,18	2,23	-0,01	-0,03	0,001	0,07
Sorgo	-0,13	-0,51	+0,25	0,003	-0,01	0,01	---

Tabla 5. Resultados del ajuste de la diferencia de cada variable entre las harinas sin extrudir y extrudida por regresión lineal simple, $y = \beta_0 + \beta_1x$. Siendo "y" el valor de la diferencia y "x" el tiempo en días del ensayo. Se informa el valor medio del coeficiente de regresión (Coef. Reg.), el límite inferior (LI_{95%}) y el límite superior (LS_{95%}) del intervalo de confianza calculado con un 95% de confianza. El p-valor indica la probabilidad de que el coeficiente de regresión (β_1) no sea significativamente distinto de cero.

La diferencia en el contenido de ácidos grasos libres presentó una ordenada en el origen y un coeficiente de regresión positivo y significativo para todas las harinas evaluadas. La diferencia entre las harinas aumenta durante el almacenamiento. La coordenada en el origen de la avena fue significativamente mayor respecto a las otras harinas. Le siguen de mayor a menor los valores de ordenadas en el origen del salvado, germen, sorgo y soja. Los valores de pendientes del sorgo, avena, salvado y germen no presentan diferencia significativa entre ellos y son significativamente mayores a la pendiente de la soja.

El ajuste por regresión lineal de la diferencia entre harina con y sin extrusión de las variables Aw y % humedad si bien en algunas harinas fue significativo, en todos los casos los valores de ordenada en el origen y coeficientes de regresión fueron muy cercanos a cero e indicando una diferencia muy pequeña entre las harinas durante el almacenamiento.

Seguimiento de degradación lipídica por oxidación

A continuación se expresan en gráficos los valores medios del descriptor "rancio-oxidado" de cada harina con y sin extrusión. Los valores se ajustaron por regresiones logísticas para variables continuas con todos los datos del panel. El análisis de varianza de la regresión ajustada resultó significativo para todas las harinas con y sin extrusión (al 5% de nivel de significación). El modelo del ajuste logístico aplicado se presenta a continuación:

$$y = A + \frac{C}{1 + e^{-B*(x - M)}}$$

Donde x es el tiempo, y la intensidad de aroma rancio y A, B, C y M son los parámetros de la regresión logística. Las regresiones ajustadas con sus promedios se presentan en los Gráficos 1 a 5.

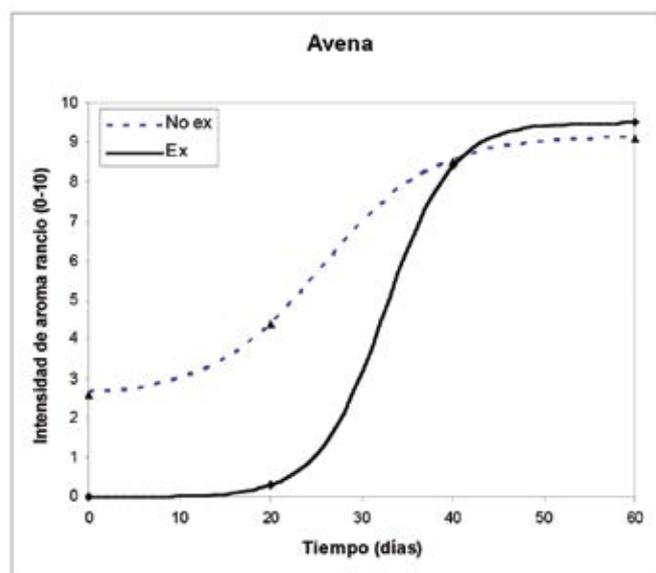


Gráfico 1. Regresión logística avena.

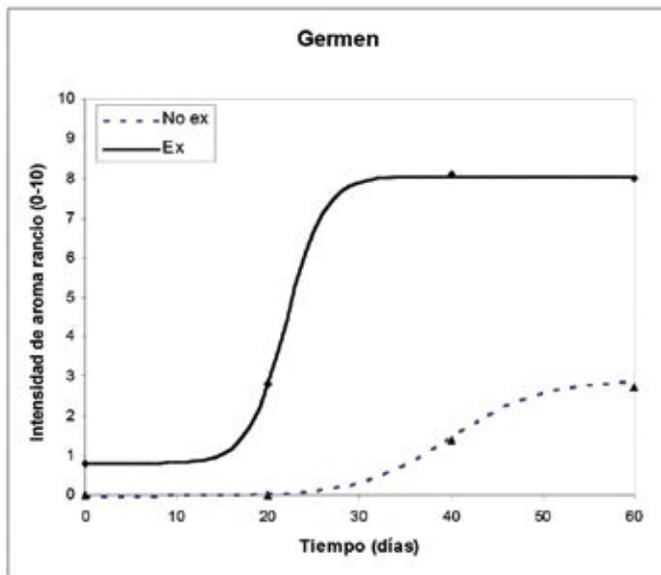


Gráfico 2. Regresión logística germen.

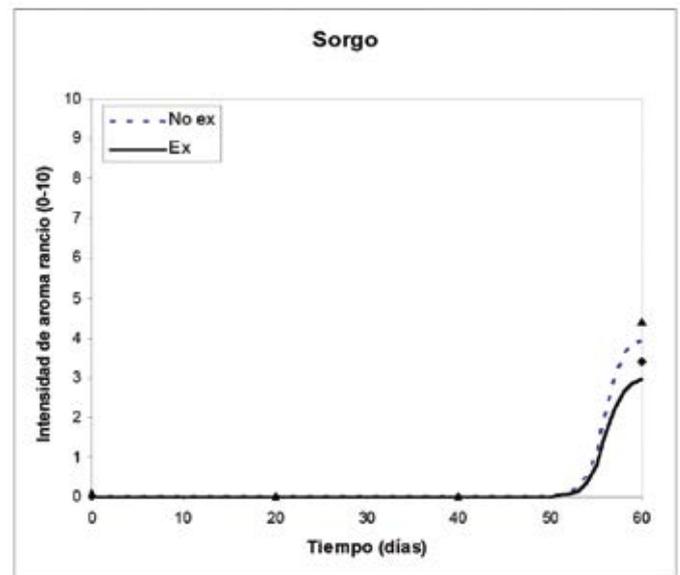


Gráfico 3. Regresión logística sorgo.

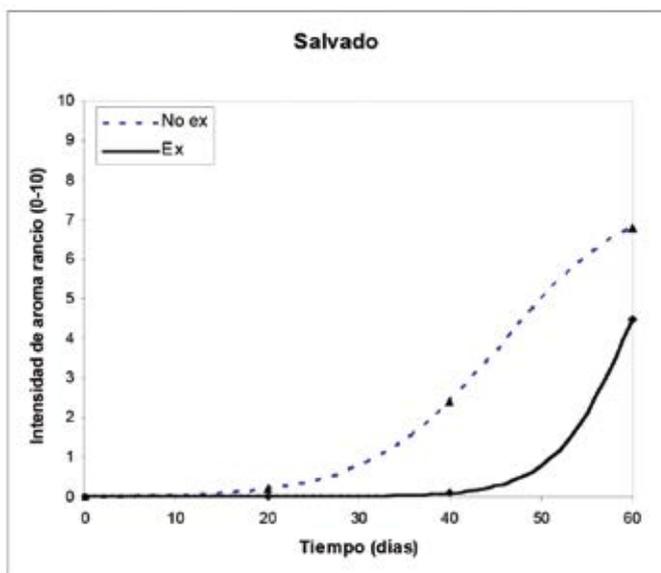


Gráfico 4. Regresión logística salvado.

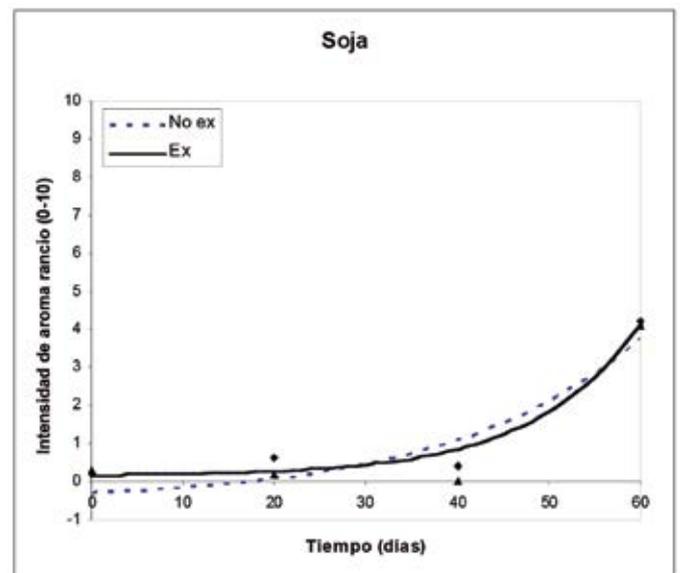


Gráfico 5. Regresión logística soja.

En la harina de avena y en el salvado el tratamiento de extrusión tiene un efecto positivo a fin de evitar el enranciamiento sensorial. La harina de avena no extrudida en el tiempo 0 ya presenta una intensidad apreciable de aroma rancio, lo que posiblemente se deba a que el freezado de las muestras atenuó pero no logró inhibir completamente el enranciamiento enzimático que se da naturalmente en la avena.

En el caso del sorgo y la soja el tratamiento de extrusión no presenta diferencias con el tratamiento de molienda tradicional.

En el caso del germen el tratamiento de extrusión tuvo un efecto favorecedor del enranciamiento, probablemente dado por las condiciones del proceso de producción de la harina hayan favorecido la activación de las reacciones del enranciamiento no enzimático oxidativo. A pesar de no haber encontrado reportes de seguimiento de degradación lipídica por oxidación del germen debido al proceso de extrusión, los autores Manuel Gómez, Jesús González y Bonastre Oliete (2012) han logrado resultados positivos en la incorporación del germen de trigo con extrusión en productos panificados. Será necesario continuar estudios en la selección de las condiciones operativas durante la elaboración del germen de trigo.

Ensayo de panificación

Ha sido extensamente reportado el aumento de la absorción de agua de harinas procesadas por extrusión (Karkle, 2012; Brennan, 2011). En la Tabla 6 se incluyen los valores medios y la mínima diferencia significativa de cada harina. Ensayos previos de panificación indicaron la necesidad de pre-hidratar las harinas antes de usarlas para la elaboración del pan. En el caso de la harina compuesta extrudida se pre-hidrató 1:1. Debido a que la harina compuesta no extrudida absorbe un 40% menos de agua, se pre-hidrataron en una relación 1:0.6.

	Índice de absorción de agua (gramos agua / gramos harina)		
	Harinas con extrusión	Harinas sin extrusión	P valor DMS
Avena	5,28 a	2,84 b	0,0001 0,70
Salvado	5,56 a	5,17 b	0,02 0,33
Soja	5,10 a	3,70 b	0,0001 0,17
Sorgo	4,40 a	2,31 b	0,0001 0,46
Harina Compuesta	6,06	4,07	0,0001 0,24

Tabla 6. Valor medio, Pvalor y DMS del índice de absorción de las harinas con y sin extrusión. Letras iguales entre valores para un mismo tipo de harina indican que no existen diferencias significativas entre la harina extrudida y no extrudida, según Tukey al 5%.

Los resultados en las harinas sin extrusión de ácidos grasos expresados en g de oleico/g materia grasa (34,6 en sorgo; 45,1 en avena; 5,2 en soja; 33,6 en salvado) y de humedad expresados en g de agua/100 g harina (14,0 en sorgo; 11,6 en avena; 10,6 en soja; 14,0 en salvado), previos a la elaboración del pan, fueron similares a los medidos en el día cero del estudio de estabilidad. Sin embargo, el pan elaborado con un 36% de incorporación de la harina compuesta sin extrusión se vio severamente afectado. Se observó una significativa disminución del volumen, aumento de la dureza, pérdida de elasticidad, aumento de cohesividad y masticabilidad. En la Tabla 7 se presentan los resultados.

	Medidas físicas en pan de molde		
	Pan elaborado con harinas sin extrusión	Pan elaborado con harinas con extrusión	P - valor DMS
Volumen	431 b	545 a	0,001 18
Dureza	1016 a	551 b	0,001 64
Elasticidad	0,94 a	0,76 b	0,001 0,02
Cohesividad	0,69 a	0,50 b	0,001 0,01
Masticabilidad	4697 a	4192 b	0,006 359

Tabla 7. Medidas físicas de pan de molde elaborado con harinas con/sin extrusión. Letras iguales entre valores para un mismo tipo de harina indican que no existen diferencias significativas entre la harina extrudida y no extrudida, según Tukey al 5%.

El pan elaborado con la harina compuesta sin extrusión no fue aceptable por parte de los consumidores, quienes lo describieron como seco y con sabor extraño. Los panes elaborados agregando las harinas con extrusión fueron muy bien aceptados por los consumidores.

Tratamiento	Aceptabilidad	p-valor DMS
Con extrusión	6,2 ^a	<0,0001
Sin extrusión	4,7 ^b	

Tabla 8. Medida de aceptabilidad sensorial por consumidores de la rodaja de pan elaborado con harinas compuestas con/sin extrusión. Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencia significativa en la aceptabilidad ($p > 0,05$).

Conclusión

El proceso de extrusión disminuye significativamente la velocidad de deterioro de la materia grasa en las harinas de salvado, avena, sorgo y soja. En la harina de germen las condiciones de extrusión ensayadas provocaron un aumento del enranciamiento, limitando su incorporación en alimentos.

El pan de molde con un 36% de incorporación de harina compuesta extrudida fue sensorialmente aceptable. La incorporación de las harinas sin extrusión dio lugar a un pan sensorialmente no aceptable, con impacto negativo en la textura y el volumen.

Referencias

- AACC INTERNATIONAL. *Approved methods of analysis*. 10a ed. Minnesota: AACC Internacional, 1999. Method 44-40.
- AACC INTERNATIONAL. *Approved methods of analysis*. 10a ed. Minnesota: AACC Internacional, 1999. Method 46-30.01.
- ANDERSON, R. A.; CONWAY, H. F.; PFEIFER, V. F.; GRIFFIN, E. L. JR. Roll and extrusion cooling of grain sorghum grits'. En: *Cereal Science Today*. 1969, 14(11):372-376.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. Ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Bc 2-49.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. Ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Bc 9-58.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. Ed. Illinois: AOCS, 1989. Official Method Cg 2-83.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official method and recommended practices of the AOCS*. 6a. ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Bc 3-49.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official methods of analysis of AOAC International*. 18a. Ed. AOAC, 2010. Official Method 985.29.
- ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD. *Informe sobre la salud en el mundo: reducir los riesgos y promover una vida sana* [En línea]. Ginebra: OMS, 2002. [Consulta : 28 de febrero de 2013]. Disponible en: http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_es.pdf
- ATHAR, N.; HARDACRE, A.; TAYLOR, G.; CLARK, S.; HARDING, R.; MCLAUGHLIN, J. Vitamin retention in extruded food products. En: *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006, 19:379-383.
- BRENNAN, CH.; BRENNAN, M.; DERBYSHIRE, E.; TIWARI, B.K. Effects of extrusion on the polyphenols, vitamins and antioxidant activity of foods. En: *Trends in Food Science Technology*. 2011, 22(10):570-575.
- DOBLADO-MALDONADO, A. F.; PIKE, O.A.; SWELEY, J. C.; ROSE, D. J. Key issues and challenges in whole wheat flour milling and storage. En: *Journal of Cereal Science*. 2012, 56:119-126.
- GÓMEZ, M.; GONZÁLEZ, J.; OLIETE, B. Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. En: *Food Bioprocess Technology*. 2012, 5:2409-2418.
- HSU, C. L.; Chen, W.; Weng Y. M.; Tseng, C. Y. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. En: *Food Chemistry*. 2003, 83:85-92.
- HANSEN, L.; ROSE, M. S. Sensory acceptability is inversely related to development of fat rancidity in bread made from stored flour. En: *J. Am Diet. Assoc.* 1996, 96:792-793.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Bélgica). FIL-IDF 99C :

- Sensory evaluation of dairy products by scoring.* Bruselas: IDF, 1997.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (Suiza). ISO 2171: *Cereales, legumbres y subproductos. Determinación del rendimiento de cenizas por incineración.* Ginebra: ISO, 2010.
 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (Suiza). ISO 8589: *Sensory analysis - General guidance of the design of test room.* Ginebra: ISO, 2007.
 - INSTITUTO ARGENTINO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACION (Argentina). IRAM 20005-1: *Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los evaluadores. Parte 1: evaluadores seleccionados.* Buenos Aires: IRAM, 1996.
 - KARKLE, E.; KELLER, L.; DOGAN, H.; ALAVI, S. Matrix transformation in fiber-added extruded products: impact of different hydration regimens on texture, microstructure and digestibility. En: *Journal of Food Engineering.* 2012, 108:171-182.
 - KILLEIT, U. Vitamin retention in extrusion cooking. En: *Food Chemistry.* 1994, 49:149-155.
 - POMERANZ, Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. En: SAUER, D. B. *Storage of cereal grains and their products.* 4ta. ed. Minnesota: AACC International, 1992. pp. 55-141.
 - ROSE, D. J.; OGDEN, L.; DUNN, M.L.; PIKE, O.A. Enhanced lipid stability in whole wheat flour by lipase inactivation and antioxidant retention. En: *Cereal Chemistry.* 2008, 2:218-223.
 - SOSA MOGUEL, O.; RUIZ-RUIZ, J.; MARTINEZ-AYALA, A.; GONZALEZ, R.; DRAGO, S.; BETANCUR-ANCONA, D.; CHEL-GUERRERO, L. Effect of extrusion conditions and lipoxigenase inactivation treatment on physical and nutritional properties of corn/cowpea (*Vigna unguiculata*) blends. En: *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2009 60(S7):341-354.
 - TAIT, S.P.; GALLIARD, T. Effect of baking quality of changes in lipid composition during wholemeal storage. En: *Journal of Cereal Science.* 1988, 8:125-137.
 - TURGEON, S.; RIOUX, L. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. En: *Food Hydrocolloids.* 2011, 25:1915-1924.
 - U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *Dietary guidelines for americans.* 7ma. ed. Washington: U.S. Government Printing Office, 2010. pp.29-30.
 - U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Health claim notification for whole grain food with moderate fat content* [En línea]. Silver Spring: FDA, 2003. [Consulta: 28 de febrero de 2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/LabelingNutrition/ucm073634.htm>
 - VETRIMANI, R.; HARIDAS, R. Studies on stabilization of wheat bran. En: *Journal of Food Science and Technology.* 1990, 27:332-335.
-

Efecto de la incorporación de transglutaminasa microbiana en las propiedades sensoriales de hamburguesas de desmenuzado de merluza (*Merluccius hubbsi*)

Influence of microbiological transglutaminase on the sensory properties of burgers of minced hake (*Merluccius hubbsi*)

Panuncio, Alicia ⁽¹⁾, Cardeza, Luciana ⁽¹⁾, Quintero, Mariana ⁽¹⁾, Solé, María Laura ⁽¹⁾, Barrios, Sofía ⁽²⁾, Gámbaro, Adriana ⁽³⁾

⁽¹⁾ Instituto de Investigaciones Pesqueras, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay - ⁽²⁾ Departamento de reactores, Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UdelaR, Uruguay - ⁽³⁾ Sección Evaluación Sensorial, Departamento de Alimentos, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay.

Contacto: alpanu08@gmail.com

Recibido: 17/6/2013 - Aprobado: 24/10/2013

Resumen

Se elaboraron hamburguesas de pescado a partir de desmenuzado de merluza (*Merluccius hubbsi*) con la incorporación de transglutaminasa microbiana, con la finalidad de mejorar sus propiedades sensoriales y elaborar un producto pesquero que fomente el consumo de pescado en Uruguay. Se evaluó desde el punto de vista sensorial y de textura instrumental el efecto del agregado de la enzima en la formulación de las hamburguesas. Se elaboraron tres tipos de hamburguesas: sin enzima y con incorporación de 0,5% y 1,0% de enzima transglutaminasa, respectivamente. Para la evaluación sensorial se analizaron las muestras con un panel de seis jueces entrenados y para la determinación de los parámetros de textura instrumental se utilizó un analizador de textura TA.XT2i. Los resultados de ambos estudios indicaron que el agregado de enzima mejoró sustancialmente la apariencia, la textura y el sabor del producto. Se obtuvo un producto pesquero innovador, con características que pueden resultar muy atractivas para el consumidor uruguayo.

Palabras clave: Hamburguesas, merluza desmenuzada, transglutaminasa, evaluación sensorial.

Abstract

Burgers of minced hake (*Merluccius hubbsi*) were prepared with the addition of microbial transglutaminase, in order to improve sensorial properties and hence to develop a fishery product that encourage the consumption of fish in Uruguay. The effect of the enzyme was evaluated by sensory and instrumental analysis. Three types of hamburgers were prepared: two with transglutaminase (0,5% and 1,0%) and a control sample without enzyme. A panel of six trained sensory assessors identified the most relevant descriptors and provided the corresponding ratings on an individual basis. Instrumental texture measurements were performed with a texture analyzer TA.XT2i. The obtained results suggest that the addition of microbial transglutaminase substantially improved the appearance, texture and flavor of the product. An innovating fishing product was obtained with features that can be very attractive to Uruguayan consumers.

Keywords: Burgers, minced hake, transglutaminase, sensorial evaluation.

Introducción

La venta de pescado anual en Uruguay se puede estimar en 1.904.900 kg. En Montevideo, el consumo por habitante tuvo un incremento de 9,1 kg en 1997 a 12,6 kg en 2007 (López, 2007). Comparativamente, España tiene un consumo de 39 kg y Japón alcanza 98 kg por habitante por año. La principal forma de presentación de los productos es el filete, y es la forma de comercialización de aproximadamente el 75% del pescado en las ferias. Según los propios vendedores, la venta de pescado entero ha decaído, suplantado por los filetes, una alternativa más cómoda para el consumidor uruguayo. No se evidencia un aumento en la cantidad de pescado consumida en los últimos años, aunque recientemente el consumo de pescado azul ha ido en aumento por las indicaciones médicas de las bondades de los ácidos grasos omega 3 (López, 2007).

La merluza (*Merluccius hubbsi*) es una de las principales especies vendidas en nuestro país. Presentada en lomos, su comercialización en los diferentes puntos de venta varía según la disponibilidad. Otra forma en la que se la encuentra en el mercado nacional es el desmenuzado (o "minced", como se conoce en la industria), una masa compacta rectangular de 7,5 kg de pescado picado, congelada en armario de placas múltiples. Se obtiene principalmente luego de realizado el fileteado y se utiliza la porción que se encuentra adosada a la columna vertebral, recortes y tamaños de filetes de talla inadecuados para otros fines que se colocan en la máquina extractora de pulpa. De este modo se recupera pulpa para consumo humano directo, dado que generalmente en las plantas pesqueras esta porción se envía para hacer harina de pescado para consumo animal. Otra posibilidad es que el desmenuzado se obtenga luego de realizado el corte espalmado o mariposa a la merluza y ulteriormente procesado en la despulpadora.

Debido al bajo consumo de pescado en Uruguay (Mazza Pérez, 2000) se consideró el desarrollo de una hamburguesa de desmenuzado de merluza como una forma más atractiva y económica de consumir pescado, y se optó por el estudio de la aplicación de la enzima transglutaminasa para mejorar sus propiedades sensoriales.

La transglutaminasa (TG) se encuentra en los tejidos animales y vegetales y en los fluidos corporales de los seres vivos. Al principio se conocía solamente la enzima de origen animal, pero la cantidad que se extraía era escasa, de mediana calidad y requería de calcio como cofactor. En 1994 se descubrió la especie de microorganismo más eficiente en la producción de esta enzima, *Streptovorticillium mobaraense*, con actividad independiente del calcio (Sakamoto et al., 1994). La TG es una enzima capaz de unir proteínas entre un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina y un grupo carboxiamida de un residuo de glutamina, mediante un enlace covalente. Por ende, se genera un enlace inter o intramolecular muy resistente a la proteólisis. La TG microbiana se utiliza en diversos productos alimenticios tales como carne de bovino y de ave, productos panificados, quesos, etcétera (Aguilar-Zárate, 2012; Márquez et al., 2006; Steffolani, 2012).

El empleo de transglutaminasa mejora la formación de geles de pescado. La TG ha sido empleada para obtener surimi de jurel (*Trachurus murphyi*) y abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Asagami et al., 1995; Dondero et al., 2002; Gilleland et al., 1997). Asagami et al. (1995) adicionaron TG en el surimi congelado de diferentes especies demostrando que los efectos de la TG no solo dependían de la especie de la que se extrae el músculo, sino también de otros factores, como por ejemplo su frescura.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la incorporación de transglutaminasa microbiana en la textura y el sabor de hamburguesas de desmenuzado de merluza.

Materiales y Métodos

Se utilizó como materia prima desmenuzado de merluza (Fripur S.A.) y transglutaminasa microbiana (Eresur S.A./Ajinomoto). Se elaboraron tres embutidos de 500 g cada uno, a los que se les incorporó distintas concentraciones de TG (0,5% de enzima, 1,0% de enzima, según recomendación del proveedor, y un blanco sin enzima). Para preparar cada uno de los embutidos se pesaron 500 g de merluza desmenuzada, se colocaron en un recipiente de acero inoxidable y se le agregó la cantidad de enzima especificada, previamente pesada y mezclada con agua en una relación 1:6. La temperatura de trabajo fue de 20 ± 2 °C. Las preparaciones se realizaron por triplicado. Las formulaciones se observan en la Tabla 1.

	Sin enzima	0,5% de enzima	1,0% de enzima
Pescado	500 g	500 g	500 g
Enzima	0 g	2,5 g	5 g
Agua	0 g	15 mL	30 mL

Tabla 1. Formulaciones de cada tipo de hamburguesa. La preparación de TG declarada por el proveedor está compuesta por: cloruro de sodio, gelatina, fosfato trisódico, maltodextrina, transglutaminasa y aceite de cártamo. El pH de la preparación es 11.

Luego se mezcló el pescado y el preparado de enzima durante cuatro minutos para homogenizar bien la muestra. Pasado ese tiempo se colocó sobre un film adherente de PVC y se le dio la forma de un embutido de 5,4 cm de diámetro y 21 cm de largo. Para que su forma quedara homogénea se pasó por un anillo de acero inoxidable de 5,4 cm de diámetro, y de esta manera se aseguró la homogeneidad en la forma de las hamburguesas, facilitando así una cocción pareja.

Las distintas muestras se almacenaron por separado en envases plásticos y en heladera a 4 °C durante 20 horas. Posteriormente se cortaron los embutidos, obteniendo hamburguesas de 1 cm de espesor.

Para la cocción de las muestras se utilizó un horno eléctrico (Punktal, modelo PK-120A) previamente calentado. La temperatura de cocción utilizada fue de 240 °C y se cocinó cada hamburguesa durante 7 minutos y medio de cada lado. Debajo de cada unidad se colocaron cinco gotas de aceite de girasol.

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial fue llevada a cabo por seis integrantes del panel de jueces de Facultad de Química, seleccionados y entrenados según normativa ISO 8586-1 (1993) y con un mínimo de 200 horas de experiencia en pruebas discriminativas y descriptivas de distintos tipos de alimentos.

Para generar los descriptores se cocinaron tres hamburguesas de cada tipo y se les presentaron juntas a los jueces. Primero, los jueces debieron generar los descriptores de manera individual y luego, en una discusión abierta con el líder de panel, se definieron por consenso los descriptores definitivos y su forma de evaluación. Los descriptores seleccionados fueron: forma, aspecto, color, dureza (fuerza requerida para comprimir una sustancia con los dientes molares o con la lengua y el paladar), humedad bucal, masticabilidad (número de veces que hay que masticar el alimento para poder tragarlo), sabor salado e intensidad total de sabor.

Para su evaluación las muestras fueron presentadas a los jueces en orden balanceado y codificadas con tres números al azar, junto con la boleta de evaluación correspondiente. Se utilizó agua sin gas como borrador. Los jueces evaluaron la intensidad de los descriptores seleccionados con una escala no estructurada de 10 cm. Los extremos de las escalas asignados a cada descriptor se observan en la Tabla 2. Las evaluaciones se realizaron por duplicado en un laboratorio de evaluación sensorial que fue diseñado según la norma ISO 8589 (1988).

Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando “juez”, “repetición”, “muestra” y sus interacciones como factores de variación. Las diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de la prueba de Fisher ($p \leq 0.05$).

Análisis instrumental de textura

La textura instrumental se evaluó utilizando un analizador de textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, UK) (Figura 1).



Figura 1. Análisis instrumental de textura con TA.XT2i

Se realizaron ensayos de TPA (Análisis de Perfil de Textura), ejerciendo una doble compresión sobre las muestras con una sonda cilíndrica de 35 mm de diámetro. Los parámetros seleccionados para el análisis fueron: velocidad de ensayo: 1 mm/s, deformación de la muestra 40%, tiempo entre dos compresiones 5 s, célula de carga de 25 kg (Bourne, 2002). Se registró fuerza ejercida para comprimir la muestra vs. tiempo mediante el software Texture Expert (Versión 1.0, Stable Micro Systems Ltd.). De las curvas de fuerza en función del tiempo se calcularon los siguientes parámetros para caracterizar la textura de las hamburguesas (Bourne, 2002; Kilcast, 2004):

Dureza: pico máximo de fuerza durante la primera compresión.

Elasticidad: relación entre el tiempo en el que se alcanza la fuerza máxima en la segunda y en la primera compresión.

Cohesividad: cociente entre las áreas bajo la curva de la segunda y primera compresión.

Masticabilidad: producto de la dureza, cohesividad y elasticidad.

Análisis estadístico

Sobre los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), utilizando “muestra” como factor de variación. Las diferencias significativas entre los promedios se determinaron por medio de la prueba de Fisher ($p \leq 0.05$).

Resultados

En las Figuras 2, 3 y 4 se observan las muestras de hamburguesas sin cocción utilizadas para el estudio.



Figura 2. Hamburguesas sin enzima.



Figura 3. Hamburguesas con 0,5% de enzima.



Figura 4. Hamburguesas con 1% de enzima.

Al retirar las muestras del envoltorio plástico se observó un remanente de líquido en los envases, abundante para la muestra que no contiene enzima, menor para la muestra con 0,5% de enzima y nulo para la de 1,0% de enzima. Como se puede observar en las Figuras 2, 3 y 4, las hamburguesas que no tenían enzima en su formulación se desgranaron parcialmente al corte; las hamburguesas con 0,5% de enzima en su formulación no se desgranaron pero tampoco quedaron muy compactas mientras que las hamburguesas con 1% de enzima quedaron compactas y firmes al corte.

Los resultados de la evaluación sensorial y del análisis de perfil de textura (TPA) se muestran en las Tablas 2 y 3.

Atributos sensoriales	Hamburguesa sin enzima	Hamburguesa con 0,5% de TG	Hamburguesa con 1% de TG
Forma (desuniforme-uniforme)	7,0 ^a	5,1 ^b	1,8 ^c
Aspecto (liso-granulado)	7,6 ^a	5,0 ^b	1,5 ^c
Color (homogéneo-heterogéneo)	5,9 ^a	6,1 ^a	1,2 ^b
Dureza (poco-mucho)	5,6 ^a	2,9 ^b	1,0 ^c
Masticabilidad (poco-mucho)	7,3 ^a	5,3 ^b	2,2 ^c
Humedad bucal (seco-húmedo)	2,1 ^a	4,2 ^b	7,2 ^c
Sabor salado (nada-mucho)	0,8 ^a	3,6 ^b	5,8 ^c
Intensidad de sabor (poco-mucho)	1,2 ^a	4,3 ^b	6,9 ^c

Tabla 2. Resultados de la evaluación sensorial. Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencia significativa según prueba de Fisher ($p \leq 0.05$).

Parámetro de textura	Hamburguesa sin enzima	Hamburguesa con 0,5% de TG	Hamburguesa con 1% de TG
Dureza	68,3 ^a	52,2 ^b	47,7 ^c
Elasticidad	0,89 ^{a,b}	0,89 ^a	0,91 ^b
Cohesividad	0,63 ^a	0,67 ^b	0,63 ^a
Masticabilidad	38,4 ^a	31,0 ^b	27,3 ^c

Tabla 3. Parámetros de textura. Letras distintas dentro de una misma fila indican diferencia significativa según prueba de Fisher ($p \leq 0.05$).

La mayor parte de los atributos sensoriales y los parámetros de textura se modificaron en forma significativa ($p < 0.05$) por la incorporación de la TG.

El agregado de TG disminuyó en forma significativa la desuniformidad de la forma, la granulosis del aspecto, la dureza y la masticabilidad, y aumentó en forma significativa la humedad bucal, el sabor salado y la intensidad del sabor. El único atributo que no se modificó en forma significativa con el agregado de 0,5% de TG fue la heterogeneidad del color; para lograr que fuera más homogéneo se necesitó un 1,0% de TG.

De los parámetros de textura, solo la dureza y la masticabilidad disminuyeron en forma significativa al agregar 0,5% y 1,0% de TG. La elasticidad y la cohesividad de las muestras con 1,0% de TG no mostró diferencias respecto a la muestra sin TG.

Discusión

La formulación de hamburguesas con transglutaminasa ha mostrado un efecto positivo desde el punto de vista sensorial. Visualmente, la hamburguesa con TG se presenta como más homogénea y compacta, con un aspecto más liso y un color más homogéneo, lo que resulta más atractivo para el consumo. En efecto, la transglutaminasa microbiana presenta características de adhesividad de las proteínas componentes

de las partículas musculares de la merluza, que hacen y posibilitan la homogeneidad y cohesión de dichas estructuras, las cuales normalmente, por tratarse de fibras musculares cortas, se disgregan.

La dureza y la masticabilidad medidas con el analizador de textura disminuyeron con el agregado de TG, coincidiendo con los resultados de la evaluación sensorial. Esto es muy importante para el paladar del consumidor. En ambos análisis se demostró que el agregado de enzima, en cualquiera de sus dos concentraciones, provoca que sea menor la fuerza necesaria para comprimir la muestra entre los dientes y poder masticarla.

Otro atributo de textura apreciado por los consumidores es la humedad bucal, la cual se observa que se incrementa en gran medida con el agregado de enzima, que aumenta la retención de agua. La gelificación de las proteínas se facilita debido a la función de la transglutaminasa de unir proteínas a través de enlaces inter o intramoleculares, por lo que la capacidad de retención de agua se ve favorecida. La capacidad de retención de agua de la enzima se evidenció también al abrir los envases plásticos de las muestras, y se observó que las hamburguesas con 1,0% de TG no presentaban líquido remanente.

Estos resultados coinciden con los encontrados por diversos autores que han estudiado el empleo de TG en preparaciones de surimi de varias especies de pescado, que indicaron una mejora en la fuerza del gel (Jiang et al., 2000; Lee et al., 1997; Ramírez et al., 2000; Tsai et al., 1996).

Respecto a los atributos de sabor, existió una diferencia significativa en el sabor salado de las tres muestras y la más salada fue la muestra con mayor concentración de enzima, dado que su formulación incluye cloruro de sodio y fosfato trisódico. De forma similar ocurrió con el atributo intensidad de sabor: la muestra con mayor concentración de enzima presentó mayor intensidad de sabor debido a los componentes que la acompañan.

Conclusiones

El agregado de transglutaminasa al desmenuzado de merluza para la obtención de hamburguesas se presenta como una posibilidad innovadora y práctica. Genera productos con mejor forma, aspecto y color, menos duros, gomosos y masticables, más húmedos y con sabor más intenso, lo cual los hace atractivos para el público de Uruguay, poco consumidor de productos pesqueros.

El desmenuzado de merluza en la actualidad se vende como commodity. Si se logra introducir en el mercado uruguayo las hamburguesas que se desarrollaron en el marco de este trabajo, se aumentaría su valor agregado al ocupar mano de obra nacional.

Esta investigación busca contribuir a profundizar el conocimiento de la utilización de transglutaminasa de origen microbiano en una especie de pescado uruguayo. A su vez, se plantea la realización de ensayos similares a los aquí presentados en otras especies de pescado, incluyendo aquellas no explotadas como congrio (*Conger orbignyanus*), sargo (*Diplodus argenteus*) y pez sable (*Trichiurus lepturus*), entre otras.

Referencias

- AGUILAR-ZÁRATE, P.; AGUILAR-ZÁRATE, M.; CARRILLO, I.; PORTILLA, O. Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. En: *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. 2012, 4(8):1-17.
- ASAGAMI, T.; OGIWARA, M.; WAKAMEDA, A.; NOGUCHI, S.F. Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. En: *Fish Sci*. 1995,

- 61(2):267-272.
- BOURNE, M. *Food texture and viscosity: concept and measurement*. 2^a ed. California: Academic Press, 2002.
 - DONDERO, M.; CUROTTO, E.; FIGUEROA, V. Transglutaminase effects on gelation of jack mackerel surimi *Trachurus murphyi*. En: *Food Sci Tech Int*. 2002, 8(1):49-54.
 - GILLELAND, G.M.; LANIER, T.C.; HAMANN, D.D. Covalent bonding in pressure induced fish protein gels. En: *J Food Sci*. 1997, 62(4):713-716.
 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (Suiza). ISO 8586-1: *Sensory analysis - general guidance for the selection, training, and monitoring of assessors. Part 1-Selected assessors*. Ginebra: ISO, 1993.
 - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (Suiza). ISO 8589: *Sensory analysis: general guidance for the design of test rooms*. Ginebra: ISO, 1988.
 - JIANG, S.T.; HSIEH, F.; HO, M.L.; CHUNG, Y.C. Combination effects of microbial transglutaminase, reducing agent, and protease inhibitor on the quality of hairtail surimi. En: *J. Food Sci*. 2000, 65: 241-245.
 - KILCAST, D. *Texture in food. Volume 2: Solid foods*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004.
 - LEE, H.G.; LANIER, T.C.; HAMANN, D.D.; KNOPP, J.A. Transglutaminase effects on low temperature gelation of fish protein sols. En: *J. Food Sci*. 1997, 62:20-24.
 - LÓPEZ, J. *El mercado de pescado en Montevideo*. Montevideo: INFOPECA, 2007.
 - MÁRQUEZ, E.; ARÉVALO, E.; BARBOZA, Y.; BENÍTEZ, B.; RANGEL, L.; ARCHILE, A. Efecto de la concentración de transglutaminasa y tiempo de reacción en la estabilidad de productos reestructurados. En: *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2006,16(6):662-667.
 - MAZZA PÉREZ, C. A. *Mejoramiento de los mercados internos de productos pesqueros en América Latina y el Caribe*. Montevideo: DINARA, 2000.
 - RAMÍREZ, J.A.; SANTOS, I.A.; MORALES, O.G.; MORRISSEY, M.T.; VÁZQUEZ, M. Application of microbial transglutaminase to improve mechanical properties of surimi from silver carp. En: *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2000, 3:21-28.
 - SAKAMOTO, H.; KUMASAWA, Y.; MOTOKI, M. Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. En: *Journal of Food Science*. 1994, 59(4):866-871.
 - STEFFOLANI, M. E. Efecto de las enzimas pentosanasa, glucosa oxidasa y transglutaminasa en productos de panificación. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2012.
 - TSAI, G.J.; LIN, S.M.; JIANG, S.T. Transglutaminase from *Streptovercillium ladakanum* and application to minced fish product. En: *J. Food Sci*. 1996, 61:1234-1238.

Determinación de la actividad endo-proteolítica en cebada malteada

Endoproteolytic activity assay in malting barley

Gómez Guerrero, Blanca ⁽¹⁾, Edney, Michael J. ⁽²⁾

⁽¹⁾Departamento de Cereales, Oleaginosos y Productos Derivados, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay - ⁽²⁾Applied Barley, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, Canadá.

Contacto: bgomez@latu.org.uy

Recibido: 15/6/2012 - Aprobado: 25/7/2013

Resumen

La hidrólisis de las proteínas de cebada en péptidos y aminoácidos es uno de los procesos más importantes en la germinación de la cebada. La degradación de las proteínas de reserva del endosperma promueven tanto el aumento de la concentración de nitrógeno amínico como la modificación del endosperma, facilitando la movilidad del agua y, por ende, de las enzimas. La actividad proteolítica es el resultado de actividades conjuntas de exo- y endo-peptidasas. Las proteínas de cebada son solubilizadas inicialmente por las endo-peptidasas y luego por las exo-peptidasas. Se han descrito cuatro tipos de endo-peptidasas: serin, cisteín, aspartic y metalo. El objetivo del trabajo consistió en la puesta a punto de un método enzimático para determinar la actividad endo-proteolítica de estas cuatro enzimas, utilizando un método rápido, colorimétrico, con dos sustratos diferentes: azo-gelatina y azo-caseína. Se optimizaron las condiciones de ensayo: pH, tiempo y temperatura de reacción. El sustrato azo-gelatina presentó varias dificultades para estandarizar un método colorimétrico que sea reproducible. En cambio, el sustrato azo-caseína fue muy consistente y permitió realizar las curvas de estandarización para las cuatro enzimas. Luego el método se aplicó exitosamente para la determinación de la actividad endo-proteolítica en cebada, malta y mosto cervecero.

Palabras clave: Endo-peptidasas, malta, proteólisis.

Abstract

Hydrolysis of barley proteins into peptides and amino acids is one of the most important processes during barley germination. The degradation of the endosperm stored proteins facilitates water and enzyme movements, enhances modification, liberates starch granules and increases soluble amino nitrogen. Protease activity is the result of the activities of a mixture of exo- and endo-proteases. The barley proteins are initially solubilized by endo-proteases and the further by exo-proteases. Four classes of endo-proteases have been described: serine-proteases, cysteine-proteases, aspartic-proteases and metallo-proteases. The objective of this work was to develop a rapid and colorimetric enzymatic assay to determine the endo-proteolytic activity of the four endo-protease classes using two different substrates: azo-gelatin and azo-casein. Optimum conditions for the assays such as: pH, reaction time and temperature and absorbance scale were determined. Azo-gelatin presented several difficulties in standardizing an "in solution" assay. On the other hand, azo-casein allowed standardization of the assay for the four enzyme classes to produce consistent results. The endo-proteolytic method developed was applied to determine the endo-protease activity in barley, malt and wort.

Keywords: Endoproteases, malt, proteolysis.

Introducción

La cebada es uno de los cultivos de mayor difusión en el mundo y la cebada malteada (malta) utilizada como materia prima en las cervecerías y destilerías es el producto de mayor valor agregado. A medida que los procesos en las cervecerías se vuelven automáticos, se hace preciso conocer el comportamiento esperado de cada variedad de cebada previo a su procesamiento en la industria. En la actualidad, nuevas variedades de malta deben alcanzar las especificaciones de calidad requeridas por el mercado regional e internacional. Es por esto que son necesarios nuevos métodos analíticos que permitan determinar características del perfil de calidad de una malta.

Las endopeptidasas son las enzimas responsables de la hidrólisis de las proteínas de reserva, en péptidos y aminoácidos, durante el proceso de malteo en la maltería y el macerado en la cervecería

(Briggs, 1998). Si esta hidrólisis ocurre en una baja tasa, habrá insuficientes compuestos nitrogenados de bajo peso molecular en el mosto para una óptima nutrición de la levadura. Por el contrario, una hidrólisis excesiva deja al mosto sin las proteínas necesarias para la formación de la espuma y el cuerpo de la cerveza (Jones, 2008).

La actividad proteolítica es el resultado de un complejo mix de actividades de exo- y endopeptidasas. Las proteínas de cebada son inicialmente solubilizadas por las endopeptidasas y luego por las exopeptidasas. La mayoría de las proteasas actúan en el interior de la cadena peptídica (endopeptidasas) o en su extremo terminal (exopeptidasas) (Palma et al., 2002).

Las endopeptidasas son clasificadas de acuerdo al mecanismo catalítico, el cual implica la especificidad del sitio activo de la enzima. Es importante mencionar que el término endopeptidasas es igual a endoproteinasas. En la cebada se han descrito cuatro tipos de endoproteasas: serin-proteinasas (EC 3.4.21), cisteín-proteinasas (EC

3.4.22), aspartic-proteinasas (EC 3.4.23) y metalo-proteinasas (EC 3.4.24) (Palma et al., 2002).

El grupo de proteasas de cebada que ha sido más estudiado son las cistein endopeptidasas. El mecanismo catalítico de estas enzimas incluye un grupo cisteín en el sitio activo. Su rol principal es la movilización de las proteínas durante la germinación. La familia de la papaína es la más investigada. Estas enzimas se sintetizan como zimógenos, por lo cual que requieren un agente reductor para activarse (Koehler y Ho, 1990).

Las serin endoproteasas son proteasas neutras que tienen en el sitio activo el aminoácido serina. En la cebada, la mayoría de la actividad serin-peptidasas se encuentra en las raíces y tallos, con algo de actividad en el endosperma del grano (Zhang y Jones, 1995b). La enzima tripsina pertenece a la familia de las serin peptidasas.

Aspartic endopeptidasas presentan preferencias por los enlaces peptídicos que se encuentran rodeados con residuos aminoácidos hidrofóbicos, por lo cual son activas a pH ácidos. Si bien en la cebada esta clase de enzima es abundante, se le ha prestado poca atención y todavía se sabe poco de su función biológica (Jones, 2005a).

Las metalo proteasas son el grupo menos conocido dentro de las endopeptidasas de cebada. La mayoría de estas enzimas contienen zinc en su sitio activo, aunque cobalto y manganeso también pueden estar presentes para activar la enzima. Las metalo proteasas han sido detectadas en todos los tejidos del grano de cebada; la capa de aleurona es la que presenta la mayor concentración (Jones, 2005b).

Zhang y Jones (1995a, b) caracterizaron y clasificaron 42 actividades endopeptidasas diferentes en granos de cebada germinados basándose en los valores del punto Isoeléctrico, en la movilidad en geles de dos dimensiones y características bioquímicas. Este método permitió separar las 42 actividades en puntos individuales de actividad, de los cuales 27 pertenecían al tipo cisteín, siete al tipo serin, cuatro al tipo metalo y cuatro al tipo aspartic. Este importante número de peptidasas, que incluyen algunas isoformas, no incluyen a las exopeptidasas. El aporte relevante de la técnica de geles en dos dimensiones es que dentro de cada tipo de proteasas los miembros individuales presentaron un pH óptimo similar, y entre los diferentes tipos se encontraron diferencias. Los tipos cistein y aspartic mostraron mayor actividad a valores de pH entre 4,8 y 4,5, mientras que los tipos serin y metalo fueron activas a niveles de pH óptimo alrededor de 6,0 y 8,5, respectivamente (Zhang y Jones, 1995a).

Algunos estudios han identificado QTL (quantitative trait loci) relacionados con la actividad proteasa y la calidad de malta, a pesar de que los detalles sobre los procesos implicados todavía no son claros (Kihara et al., 2006; Potokina et al., 2006). Las actividades de las endopeptidasas en cebada y malta han sido determinadas principalmente por dos tipos de metodologías: ensayos en solución y ensayos en geles de dos dimensiones. Estas metodologías han sido aplicadas con varios tipos de sustratos y condiciones (pH, temperatura de reacción y tiempo de reacción), por lo cual los resultados varían de gran manera y son difíciles de comparar.

Jones et al. (1998) definieron un sistema para estudiar el mix de actividades de las endopeptidasas de manera rápida, cuantitativa y eficiente. El ensayo utiliza un sustrato proteico coloreado, azogelatina. El principio básico del método es mezclar el sustrato proteico con las endopeptidasas, remover fracciones a tiempos determinados y precipitar el sustrato no hidrolizado con ácido tricloroacético (TCA) y luego medir la absorbancia a 440 nm. El estudio demostró que varias endopeptidasas presentaron un comportamiento lineal por 30 min o menos. Si bien los cuatro tipos de endopeptidasas mencionadas hidrolizan azogelatina, las endopeptidasas aspárticas lo hacen a una velocidad más lenta.

El sustrato azogelatina tiene excelentes atributos: 1) Es una proteína, lo cual permite tener una visión realista de cómo la enzima actúa sobre un sustrato natural. 2) Es hidrolizada por todas las clases de endoproteasas, aunque las aspárticas son las que lo hidrolizan en menor nivel. 3) Los productos de hidrólisis son coloreados y absorben a 440 nm, eliminando el problema de interferencia con la absorción de los péptidos a 280 nm. 4) Es soluble para un rango de pH entre 3 y 10,5, en el cual se encuentran los pH óptimos de las cuatro clases de

endoproteasas. 6) Precipita frente al TCA, permitiendo de esta manera cortar la reacción.

Osman (2003) utilizó un sustrato preparado directamente de la cebada, llamado fracción proteica de cebada altamente degradable (HDBPF – Highly Degradable Barley Protein Fraction) para medir la actividad endopeptidasa de la malta. Jones (2005a) concluyó que las propiedades de HDBPF como sustrato no eran apropiadas para el análisis de endopeptidasas, como si lo es azogelatina.

Yano et al. (2008) utilizaron caseína como sustrato e inhibidores de las distintas clases de proteasas para determinar la actividad de las endoproteasas de malta y cebada usada como adjunto cervecero.

Schmitt y Budde (2007) desarrollaron un método fluorogénico para estimar la actividad de las endoproteasas de malta en grandes sets de muestras, especialmente para poblaciones de mapeo de los programas de mejoramiento genético. El pH del método se ajustó de manera de favorecer la actividad cistein y serin. El uso de sustrato fluorogénico simplifica en gran medida el ensayo, lo que hace posible analizar una mayor cantidad de muestras.

En muchos estudios investigadores han utilizado sustratos como azocaseína, caseína y hemoglobina, que precipitan adecuadamente en presencia de TCA y son útiles para cuantificar endopeptidasas de malta. Sin embargo, estos sustratos son hidrolizados por algunas proteasas y en diferente tasa de hidrólisis.

Debido a esto, el objetivo del trabajo consistió en la puesta a punto de un método enzimático para determinar la actividad endoproteolítica de los cuatro tipos de endopeptidasas, aplicando un método rápido, colorimétrico, con dos sustratos diferentes: azo-gelatina y azo-caseína.

Materiales y Métodos

Cebada y malta

Las muestras de cebada y malta utilizadas en el estudio fueron proporcionadas por el laboratorio Barley Applied del Canadian Grain Commission. Las variedades utilizadas fueron AC Metcalfe, Harrington, AC Madi y MUSA 936.

Elaboración de mosto cervecero

Se realizó un mosto cervecero siguiendo la norma EBC método 4.5.1.

Enzimas puras

Se utilizaron como estándar las enzimas: papaína de carga papaya (Fluka -76218) EC 3.4.22.3; tripsina tipo III de páncreas bovino (Sigma T-8253) EC 3.4.21.4; pepsina A de mucosa estomacal de porcino (Sigma P-7000) EC 3.4.23.1, y proteasa tipo IX proveniente de *Bacillus polymyxa* (Sigma P6141) EC.3.4.24. Todas las soluciones estándar de las enzimas se prepararon disolviendo 1 mg de la enzima pura en 1 ml de agua ultra pura. Los buffers de reacción y dilución utilizados con las enzimas fueron: buffer acetato de amonio 0,1M a pH 4,8 y a pH 4,5; buffer citrato de sodio 0,1M a pH 6,0; buffer fosfato de sodio 0,1M pH 7,0.

Ensayo con el sustrato azogelatina

El sustrato azogelatina se sintetizó siguiendo los pasos descritos por Jones et al. (1998). Se preparó una solución del sustrato al 1% m/v en buffer citrato de sodio a pH 6,0, el sustrato se termostató a 40 °C previo a su uso. La solución permaneció estable por varias semanas, manteniéndose a 4 °C.

La extracción enzimática se realizó mezclando 0,38 g de harina de malta en 1,5 mL de buffer citrato de sodio a pH 6,0, a 4 °C por 30 min. La preparación fue luego centrifugada a 14000 rpm por 20 min.

Se separó el sobrenadante, el cual se utilizó para la reacción inmediata o se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análisis.

La reacción enzimática se llevó a cabo termostatazando por 10 min a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 670 μL de extracción enzimática con 1670 μL de buffer citrato de sodio a pH 6,0. La solución de azogelatina termostatazada (2200 μL) se adicionó a la solución enzimática y se vortexeó. Se removieron alícuotas de 600 μL a tiempo 0 (blanco de reacción), y a los 10, 25, 45 y 60 min de reacción. Las alícuotas removidas fueron dispensadas a tubos que contenían 900 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 15%, de manera de parar la reacción. El tubo se vortexeó y se incubó por 30 min en un baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 11500 g por 8 min. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 440 nm.

Ensayo con el sustrato azocaseína

El sustrato azocaseína fue provisto por Megazyme (S-AZCAS 12/2007). Se disolvió 1 g de sustrato en 2 mL de etanol. Luego se adicionaron 48 mL de buffer citrato de sodio a pH 6,0. La solución se almacenó y permaneció estable a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por varias semanas.

La extracción enzimática se realizó suspendiendo 1 g de malta o cebada en 3,0 mL de buffer citrato de sodio a pH 6,0, por 15 min a temperatura ambiente, vortexeando cada 5 min. Luego se centrifugó por 15 min a 12000 g. Se separó el sobrenadante, el cual se utilizó para la reacción inmediata o se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análisis.

La reacción enzimática se realizó termostatazando por 10 min a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 415 μL de extracción enzimática con 319 μL de buffer citrato de sodio y 100 μL de L-Cisteína (Sigma C-7880) 10 mM. Se adicionaron al tubo de reacción 834 μL de azocaseína termostatazada al 2%. Se vortexeó y se dejó por 30 min a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se adicionaron 3,0 mL de TCA al 5% y se vortexeó vigorosamente por 5 seg. Los tubos de reacción permanecieron por 5 min a temperatura ambiente, se filtró con papel de filtro Whatman N°1 y se midió absorbancia del filtrado a 440 nm contra el blanco de reacción.

El blanco de reacción se preparó adicionando 3,0 mL de TCA a un tubo con 100 μL de Cisteína y 319 μL de buffer citrato de sodio, se vortexeó y, por último, se agregaron 415 μL de la extracción enzimática.

Resultados

Actividad proteolítica utilizando azogelatina como sustrato

La enzima pura papaína se utilizó para realizar la curva de calibración y ajustar las condiciones del ensayo. Los resultados demostraron que la absorbancia a tiempo 0 (blanco de reacción) fue muy alta, con valores desde 0,332 a 0,386, lo cual sugiere una baja estabilidad del sustrato a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las absorbancias obtenidas a los 10, 25, 45 y 60 min de reacción se presentan en el Gráfico 1. Debido a la falta de linealidad encontrada entre la absorbancia y la concentración de la enzima en las condiciones utilizadas, se decidió estudiar el comportamiento de la misma enzima a más altas concentraciones. Los resultados a altas concentraciones mostraron un comportamiento lineal.

Para fijar las condiciones de extracción se utilizaron dos maltas de diferentes variedades y se midió la absorbancia a los 10, 25, 45 y 60 min de reacción (Gráfico 2). La extracción de 15 min a temperatura ambiente para las dos variedades fue la que presentó resultados más consistentes.

La alta absorbancia de los blancos de reacción con azogelatina como sustrato se constató como un inconveniente, por lo que se realizaron varios ensayos de manera de reducir la absorbancia del blanco de reacción pero no se obtuvieron resultados exitosos.

De manera de probar la consistencia del método se ensayaron 10 muestras de malta de variedades diferentes y con distinto nivel de calidad maltera. Los resultados se muestran en el Gráfico 3, y se puede observar la inconsistencia del método, ya que para algunas maltas los valores de absorbancia a los 10 min de reacción fueron mayores que a los 25 min, y en otras muestras se observó lo opuesto. También se esperaba que las variedades de menor calidad, basados en el nivel de nitrógeno amínico libre (muestra cercanas a la número 1), presentaran menor actividad endoproteolítica que las variedades con mayor calidad (muestras cercanas a la número 10) y esto tampoco se pudo observar en los resultados.

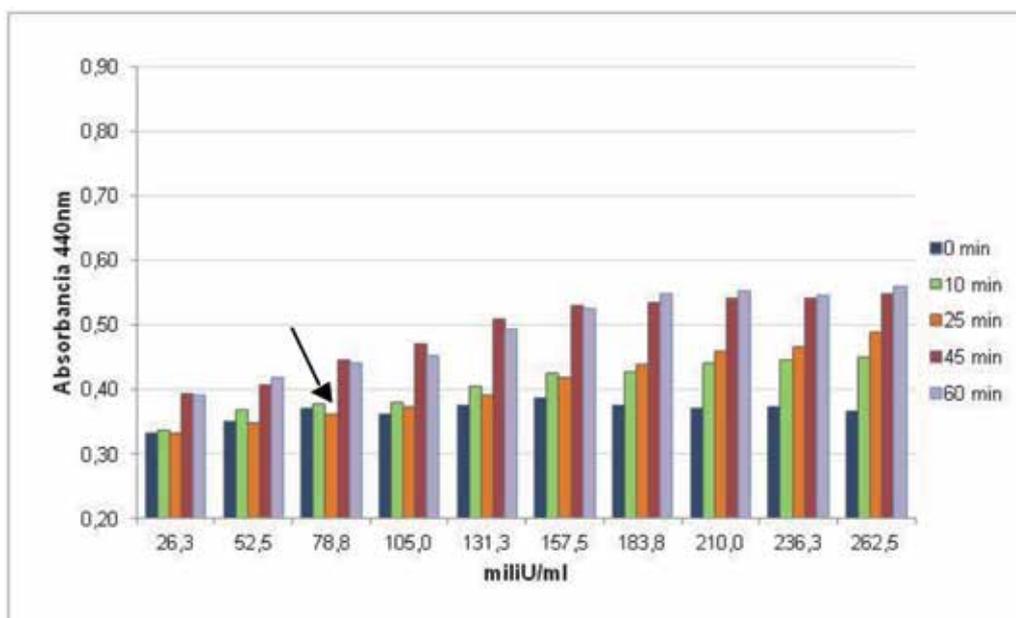


Gráfico 1. Actividad endoproteasa de la enzima papaína a bajas concentraciones, medida a partir del aumento de la absorbancia en un rango de tiempo de reacción. La flecha indica uno de los casos inesperados de baja absorbancia a 25 min de reacción.

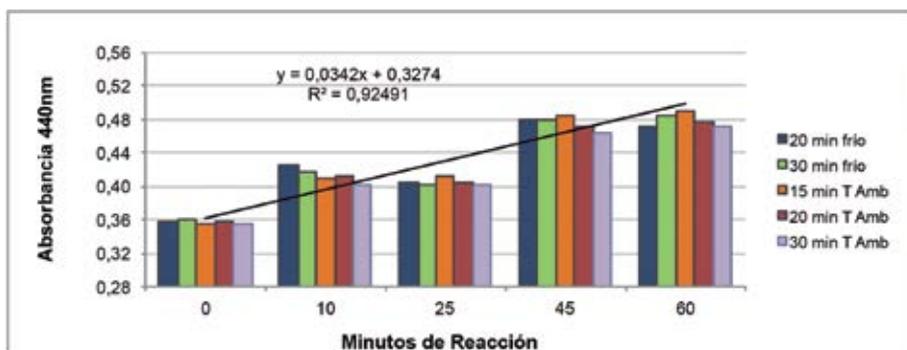


Gráfico 2. Actividad endoproteasa de malta variedad Harrington bajo diferentes condiciones de extracción, y medidas a través del aumento de la absorbancia en un rango de tiempo.

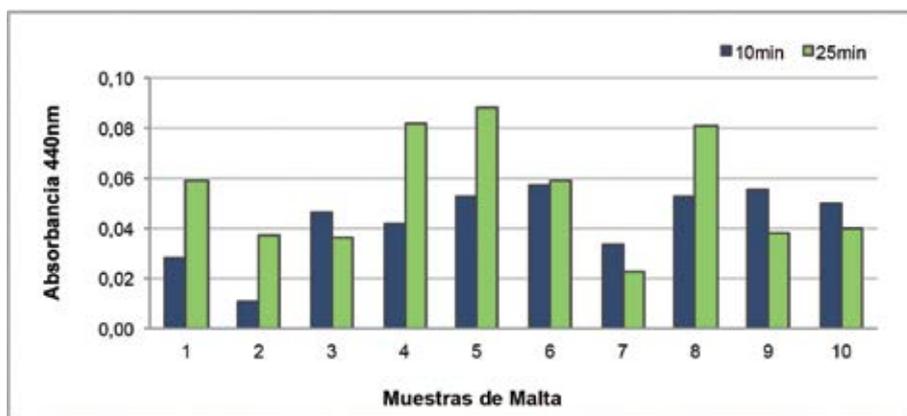


Gráfico 3. Actividad endoproteasa de maltas con distinta calidad maltera utilizando el sustrato azogelatina a pH 6,0. Muestras cercanas a 1 baja calidad, cercanas a 10 alta calidad.

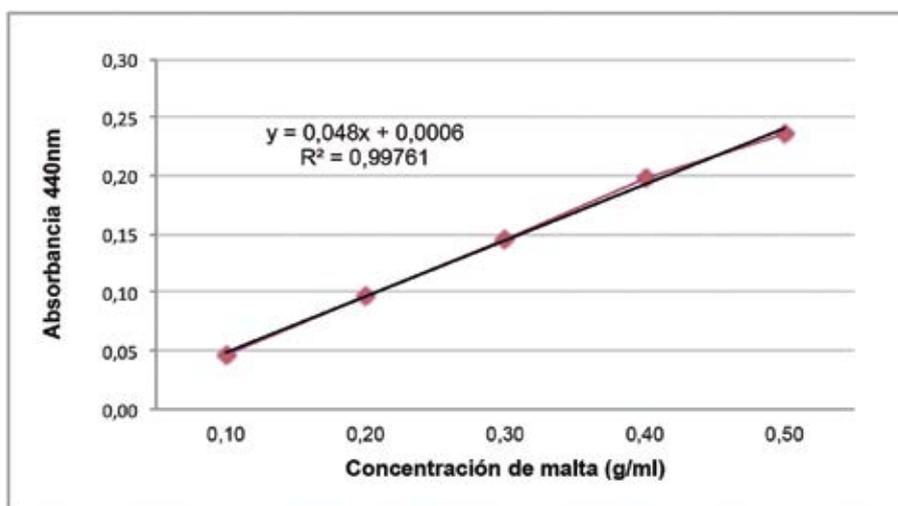


Gráfico 4. Actividad endoproteasa de malta utilizando el sustrato azocaseína a pH 6,0.

Actividad proteolítica utilizando azocaseína como sustrato

Los resultados mostraron que utilizando el sustrato azocaseína se pueden obtener diferencias en los niveles de absorbancia para cada uno de los tipos de endoproteasas utilizadas como estándar (Tabla 1). Estos resultados demuestran la habilidad del sustrato para detectar diferentes clases de endoproteasas y cómo los cambios en el pH afectan la actividad endoproteolítica.

Condiciones/ Enzimas	Absorbancia 440nm - 10 min reacción				
	pH 7,0	pH 7,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,0
Buffer extracción	pH 7,0	pH 7,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,0
Buffer dilución	pH 7,0	pH 7,0	pH 7,0	pH 6,0	pH 6,0
Volumen enzima	100µL	200µL	100µL	100µL	100µL
Adición cisteína	-	-	-	-	2mM
Proteasa	0,074	0,766	0,498	0,007	0,010
Papaína	0,067	0,073	0,024	0,050	2,672
Pepsina	0,010	0,000	0,000	0,102	0,099

Tabla 1. Absorbancia de las endoproteasas utilizando el sustrato azocaseína bajo diferentes condiciones de ensayo.

Así como se investigó el efecto del pH de los buffer utilizados para la extracción de las enzimas, también se estudió la relación entre la concentración de malta y el valor de la absorbancia. Los resultados muestran una excelente correlación lineal positiva para las concentraciones de malta estudiadas (Gráfico 4), a pesar de que los valores de absorbancia obtenidos no fueron muy elevados.

De manera de aumentar los valores de absorbancia de la malta diferentes condiciones de reacción fueron ensayadas (Tabla 2). Los resultados demostraron que las absorbancias aumentaron proporcionalmente con el aumento de las condiciones reductoras (adición de altas concentraciones de cisteína) para todas las concentraciones de malta ensayadas. A su vez, mayores tiempos de reacción ocasionaron mayores valores de absorbancia, con o sin la

adición de cisteína. Por lo tanto, se seleccionó una combinación de adición de cisteína y tiempos de reacción, de manera de aumentar los valores de absorbancia y que estos se encuentren dentro del rango normal de absorbancia (desde 0,1 a 1,0).

Experimentos con diferentes tiempos de reacción (20 min y 40 min) y una adición de cisteína 25 mM fueron ensayados utilizando las enzimas puras y extractos de malta con el fin de fijar las condiciones óptimas de reacción.

A partir de los resultados obtenidos se decidió investigar el efecto de disminuir la concentración de cisteína adicionada y determinar la actividad de las enzimas en una hora de reacción. Los resultados (Gráficos 5 y 6) demostraron que a pH 6,0 (el pH del mosto) y en condiciones reductoras (con adición de cisteína) la enzima que exhibió la mejor performance fue la papaína. Esta enzima presentó una relación lineal positiva significativa con la absorbancia durante una hora de reacción, aunque algunos de los valores de absorbancia se fueron de la escala normal (Gráfico 5A). La enzima proteasa (del tipo metalo) también presentó una relación lineal y positiva entre la absorbancia y el tiempo de reacción (Gráfico 5B), sin embargo los valores de absorbancia fueron menores en un rango más pequeño. La enzima pepsina, por su parte, no presentó un alto coeficiente de determinación (Gráfico 5C), lo cual indica que las condiciones de reacción no son las óptimas para determinar la actividad de las proteasas de clase aspartic. Para determinar si el sustrato azocaseína detectaba los cuatro tipos de endoproteasas se realizó una curva de calibración con la enzima tripsina (Gráfico 5D). Esta enzima presentó una alta asociación positiva entre la concentración y los valores de absorbancia, para valores de absorbancia mayores a 0,6.

Se midió la actividad endoproteolítica utilizando las condiciones descritas en el Gráfico 6 para tres maltas de diferente perfil de calidad maltera. Las medidas de absorbancia determinadas para un rango de reacción de una hora mostraron una relación lineal positiva con un alto valor de coeficiente de determinación. El tiempo de reacción se fijó en 30 min debido a que los valores de absorbancia obtenidos se encuentran en el medio del rango de absorbancia deseado.

De acuerdo a todos los resultados obtenidos se determinó adecuado el uso de la papaína como enzima pura para estandarizar el método y se construyó una curva de calibración (Gráfico 7). De la curva de calibración se extrajo la ecuación de regresión para utilizar en el cálculo de las unidades.

$$\text{mU/ensayo} = [(\text{Abs } 440\text{nm} - \text{Blanco reacción}) * 143.1634] + 22.74447$$

$$\text{Total mU} = \left(\frac{\text{mU/ensayo}}{\text{Alicuota ensayada (mL)}} \right) * \text{Volumen buffer de extrac. (mL)}$$

$$\text{mU/g (base seca)} = \left(\frac{\text{Total mU}}{\text{Toma malta (g)}} \right) * \frac{1}{(100 - \% \text{Humedad}) * 100}$$

Condiciones	Reacción pH 6,0										
	0,02 (g/mL)		0,14 (g/mL)				0,16 (g/mL)				
Tiempo Reac.	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	10 min	25 min	25 min
Adición Cis.	-	2mM	-	2mM	8,3mM	25mM	-	8,3mM	-	8,3mM	8,3mM
Abs. 440 nm	0,011	0,017	0,063	0,099	0,116	0,138	0,072	0,127	0,151	0,260	0,260

Tabla 2. Absorbancia de las endoproteasas de malta con azocaseína como sustrato, bajo diferentes condiciones de ensayo.

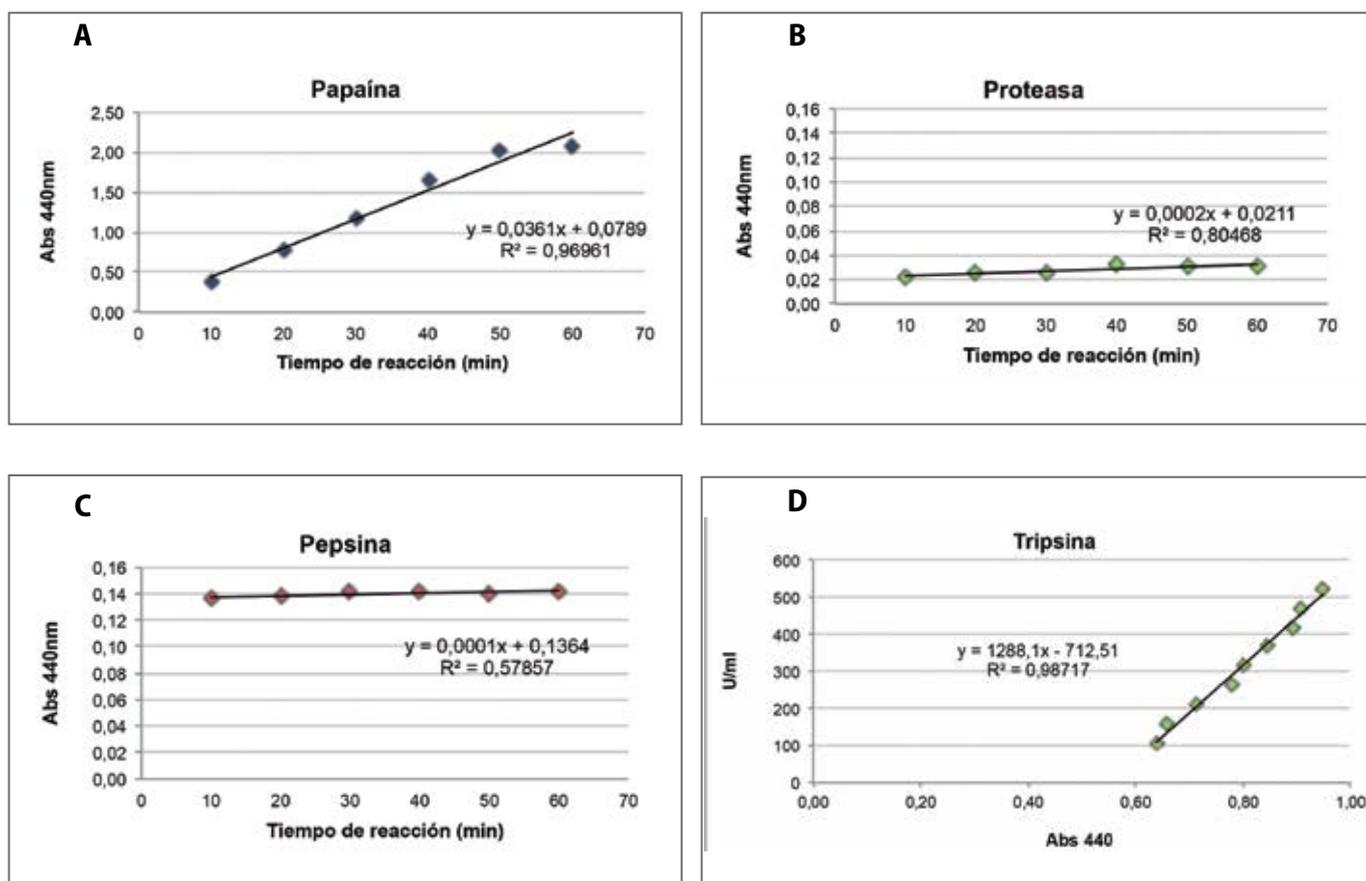


Gráfico 5. Absorbancia de las enzimas puras durante una hora de reacción. A) Tipo cisteína; B) Tipo Metalo; C) Tipo aspartic; D) Tipo Serin. Las condiciones de reacción fueron: Volumen de enzima: A) 20 μ L; B) y C) 100 μ L; azocaseína al 2%, pH 6,0 y adición de cisteína 10 mM. D) Rango de concentración de la enzima utilizando azocaseína al 2%, pH 6,0, adición de cisteína 10 mM por 30 min de reacción.

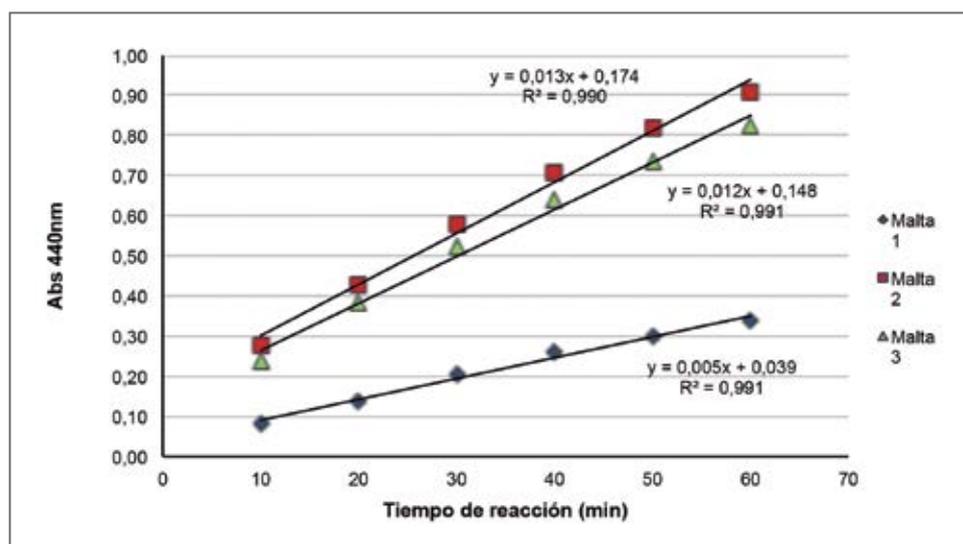


Gráfico 6. Absorbancia de las endoproteasas de tres variedades de malta con diferente perfil de calidad. Las condiciones de reacción fueron: concentración malta 0,33 g/mL; azocaseína al 2%, pH 6,0, adición de cisteína 10 mM durante una hora de reacción.

La reproducibilidad y repetibilidad de la cuantificación de la actividad endoproteolítica de malta se definió utilizando una muestra de malta analizada 10 veces (Tabla 3). El desvío estándar, los valores máximos y mínimos, así como los límites de control fueron determinados a partir de los resultados.

Muestras de cebada fueron analizadas bajo la misma metodología que la malta (no se muestran los resultados).

También se ensayó la actividad endoproteolítica del mosto cervecero y de esta manera se pudo determinar el alcance del método (Gráfico 8).

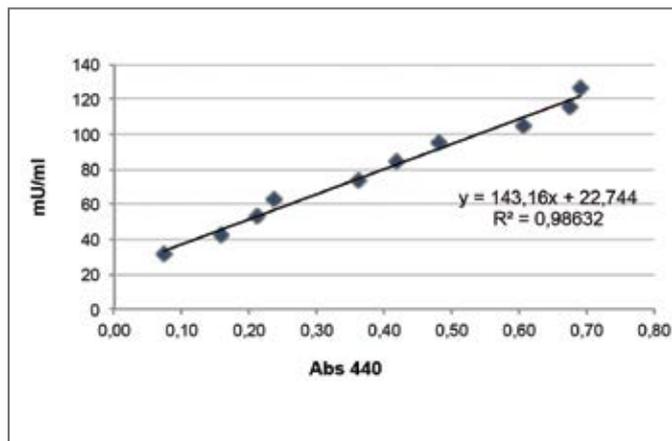


Gráfico 7. Curva de calibración de la enzima papaína utilizada como estándar. Las condiciones de reacción fueron: 1mg/mL; azocaseína al 2%, pH 6,0, adición de cisteína 10 mM durante 30 min de reacción.

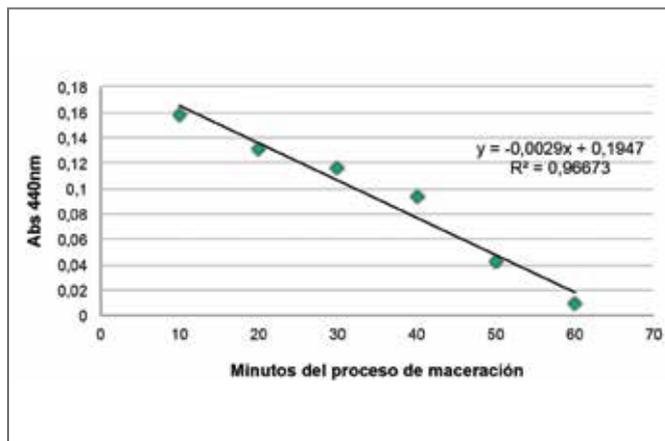


Gráfico 8. Alícuotas de mosto removidas a diferentes tiempos durante el mosto Congreso. Las condiciones de reacción fueron: azocaseína al 2%, pH 6,0, adición de cisteína 10 mM durante 30 min de reacción.

Tubo	Submuestra 1	Submuestra 2	Media	Diferencia	mU/g (base seca)
1	0,579	0,587	0,583	0,521	687
2	0,590	0,598	0,594	0,532	701
3	0,576	0,587	0,582	0,520	721
4	0,576	0,585	0,581	0,519	709
5	0,579	0,594	0,587	0,525	718
6	0,589	0,587	0,588	0,526	724
7	0,590	0,605	0,598	0,536	717
8	0,581	0,580	0,581	0,519	737
9	0,600	0,592	0,596	0,534	723
10	0,606	0,619	0,613	0,551	707

Variaciones entre extracciones

Media	714
Desv Std	14
Mín	686
Máx	742

Variaciones dentro de extracciones

Media	716
Desv Std	8
Mín	700
Máx	733

Tabla 3. Test de reproducibilidad y repetibilidad con malta AC Metcalfe, utilizando azocaseína como sustrato.

Discusión

Los estudios de linealidad entre la actividad proteolítica de la enzima papaína y el aumento de concentración de la enzima (desde 262 miliU/mL hasta 1115 miliU/mL) utilizando el sustrato azogelatina para los tiempos de reacción estudiados mostraron una asociación lineal positiva. Estos resultados coinciden con los establecidos en trabajos de Jones et al. (2000, 2002 y 2003) en los cuales indicaban que para obtener una asociación lineal positiva debía existir una relación enzima:sustrato mayor a 1:1. La mejor relación que se determinó fue 1.32:1. Si bien se hicieron varios intentos por disminuir la absorbancia del blanco de reacción y establecer condiciones de reacción que permitieran obtener resultados consistentes y repetibles, esto no se logró. Tampoco se pudieron obtener resultados de la actividad endoproteolítica que reflejaran la calidad de las maltas analizadas. Por lo cual se considera que el sustrato azogelatina no permite obtener resultados consistentes de actividad endoproteolítica en muestras de malta.

En cambio, con los resultados logrados utilizando el sustrato azocaseína se obtuvieron blancos de reacción con valores de absorbancia bajos (0,074) en comparación con los obtenidos con el sustrato azogelatina. También el sustrato azocaseína permitió detectar los cuatro tipos de endoproteasas que se encuentran en la cebada y ajustar de esta manera una metodología que haga posible la detección de la actividad de una manera consistente y repetible.

Los estudios de las enzimas puras a distintos niveles de pH permitieron demostrar que el tipo de endoproteasa que se encuentra más activo al pH del mosto cervecero (6,00) es el tipo cisteína. Por esto se decidió utilizar la enzima papaína como estándar y realizar la curva de calibración que posibilitó obtener la ecuación para el cálculo de la actividad endoproteolítica.

Se pudo demostrar también que la metodología ajustada permite distinguir maltas de distintos tipos de calidad maltera, con lo cual es de esperar que tengan distinta actividad endoproteolítica. Las maltas 1 y 2 (Gráfico 8) son maltas que presentan mejor calidad maltera, mejor modificación durante el proceso de malteo y mayor valor de amino nitrógeno libre, por lo que era de esperar que presentaran una mayor actividad endoproteolítica en comparación con la malta 3. La malta 3 es una malta de baja calidad maltera, con bajos niveles de nitrógeno amínico libre, y esto se demostró con el bajo nivel de actividad endoproteolítica presentado.

La repetibilidad del método fue muy buena, con un coeficiente de variación de 2,0 para la variabilidad entre extracciones diferentes y un coeficiente de variación de 1,1 utilizando la misma extracción.

El alcance del método se determinó al analizar bajo la misma metodología muestras de cebada y mosto cervecero, además de la malta. Los resultados de actividad endoproteolítica del mosto fueron los esperables, ya que a medida que pasan los minutos del proceso de maceración la temperatura del macerado va aumentando de 45 °C a 70 °C y es esperable que la actividad enzimática disminuya, como se observó en el gráfico correspondiente.

Conclusiones

Se puso a punto el método para determinar la actividad endoproteolítica de la malta, cebada y mosto, en condiciones reductoras (adición de cisteína 10 mM), a pH 6,0 (pH del mosto), por 30 min de reacción, utilizando el sustrato azocaseína. Se lograron buenos niveles de exactitud y precisión bajo la metodología descrita. El tipo cisteína de las endoproteasas es el que principalmente se identifica en las condiciones definidas en el estudio, a pesar de ello, cambios en el pH y en las condiciones reductoras pueden ser ensayados para determinar los otros tres tipos de endoproteasas, aspartic, serin y metalo, como ya se demostró. Estudios en mayor profundidad se deberían realizar para optimizar las condiciones del método, de manera de determinar los otros tipos de endoproteasas que se encuentran en la cebada.

Referencias

- BRIGGS, D.E. Malt analyses. En: *Malts and malting*. London: Blackie Academic & Professional, 1998. pp. 579-614.
- EBC ANALYSIS COMMITTEE. *Analytica-EBC*. 5ta. ed. Grundwerk: Fachverlag Hans Carl, Nüremberg. 1998, Ninth supplement to the fifth edition 2010. Official Method 4.5.1.
- JONES, B.L. The endoproteases of barley and malt and their endogenous inhibitors. En: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 2008, 45:279-282.
- JONES, B.L. Endoproteases of barley and malt. En: *Journal of Cereal Science*. 2005a, 42:139-156.
- JONES, B. L. The endogenous endoprotease inhibitors of barley and malt and their roles in malting and brewing. En: *Journal of Cereal Science*. 2005b, 42:271-280.
- JONES, B.L.; BUDDE, A.D. The effect of reducing and oxidizing agents and pH on malt endoproteolytic activities and on malt mashes. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 51:7504-7512.
- JONES, B.L.; MARINA C, L. The effect of mashing on malt endoproteolytic activities. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002, 50:858-864.
- JONES, B.L.; FONTANINI, D.; JARVINEN, M.; PEKKARINEN, A. Simplified endoprotease assays using gelatin or azogelatin. En: *Analytical Biochemistry*. 1998, 263:214-220.
- JONES, B.L.; MARINAC, L.A.; FONTANINI, D. A quantitative study of the formation of endoproteolytic activities during malting and their stabilities to kilning. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48:3898-3905.
- KIHARA, M.; OKADA, Y.; SAITO, W.; KAWADA, N.; KANEKO, T.; ASAKURA, T.; ITO, K. QTL analysis for proteinase activity based on doubled-haploid progeny of standard Japanese and North American malting barley cultivars. En: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 2006, 43:15-18.
- KOEHLER, S.; HO, T.-H.D. Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteases in barley aleurone layers. En: *The Plant Cell*. 1990, 2:769-783.
- MEGAZYME INTERNATIONAL. *Assay of endo-protease using AZO-CASEIN. S-AZCAS 12/07* [En línea]. Wicklow: Megazyme International, 2007. [Consulta: 11 de noviembre de 2013]. Disponible en: http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/S-AZCAS_0712_DATA.pdf
- OSMAN, A.M. Barley and malt proteins and proteases. I. Highly degradable barley protein fraction (HDBPF), a suitable substrate for malt endoprotease assay. En: *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, 109(2):135-141.
- PALMA, J.M.; SANDALIO, L.M.; CORPAS, F.J.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; MCCARTHY, I.; DEL RÍO, L.A. Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. En: *Plant Physiol. Biochem.* 2002, 40:521-530.
- POTOKINA, E.; PRASAD, M.; MALYSHEVA, L.; RÖDER, M. S.; GRANER, A. Expression genetics and haplotype analysis reveal cis regulation of serine carboxypeptidase I (Cxp1), a candidate gene for malting quality in barley (*Hordeum vulgare* L.). En: *Funct. Integr. Genomics*. 2006, 6:25-35.
- SCHMITT, M.R.; BUDDE A.D. Use of fluorogenic proteinase assays to examine protein mobilization in barley varieties and across populations. En: *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* 2007, 44:273-277.
- YANO, M.; TSUDA, H.; IMAI, T.; OGAWA, Y.; OHKOCHI, M. The effect of barley adjuncts on free amino nitrogen contents in wort. En: *Journal of the Institute of Brewing*. 2008, 114(3):230-238.
- ZHANG, N.; JONES, B.L. Characterization of germinated barley endoproteolytic enzymes by two-dimensional gel electrophoresis. En: *Journal of Cereal Science*. 1995a, 21:145-153.
- ZHANG, N.; JONES, B.L. Development of proteolytic activities during barley malting and their localization in the green malt kernel. En: *Journal of Cereal Science*. 1995b, 22:147-155.

Evaluación de la calidad higiénico sanitaria y de composición de leche de cabra en un rebaño de la raza Saanen

Evaluation of hygienic sanitary and composition quality of goat milk in a Saanen breed herd

Grille, Lucía ⁽¹⁾, Carro, Silvana ⁽¹⁾, Escobar, Daniela ⁽⁴⁾, Bentancor, Lorena ⁽³⁾, Borges, Alejandra ⁽⁴⁾, Cruz, Daniel ⁽³⁾, González, Silvana ⁽²⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay - ⁽²⁾ Parque de Actividades Agroindustriales (PAGRO), Unidad Montevideo Rural, Intendencia de Montevideo, Uruguay - ⁽³⁾ Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay (trabajo final de grado) - ⁽⁴⁾ Gerencia de I+D+I, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay.

Contacto: lgrille@gmail.com

Recibido: 4/6/2013 - Aprobado: 25/11/2013

Resumen

Uruguay es un país lechero y sus reglamentaciones son referidas principalmente a leche bovina. La leche de cabra es un alimento completo, recomendado para niños y adultos mayores, pero su estudio ha sido escaso en el país. Se estudió la calidad higiénico-sanitaria y de composición de leche caprina en un rebaño de raza Saanen durante un ciclo de lactancia. Se utilizaron 25 animales y se obtuvieron muestras de tanque quincenalmente. Se analizaron recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT), coliformes totales (CT) y Staphylococcus coagulasa positiva (SCP), recuento de células somáticas (RCS), composición, ácidos grasos, acidez Dörnic, pH y densidad. Los resultados fueron: RMAT de $3,85 \pm 0,69$ ufc/ml Log_{10} , RCS $6,91 \pm 0,55$ cel/ml Log_{10} , CT $2,47 \pm 0,84$ ufc/ml Log_{10} , SCP $1,13 \pm 0,29$ ufc/ml Log_{10} . Se obtuvieron valores de grasa: $3,58 \pm 0,69\%$, proteína: $2,71 \pm 0,07\%$, lactosa: $3,84 \pm 0,10\%$, acidez: $14,19 \pm 0,39$ °D, pH: $6,66 \pm 0,06$ y densidad: $1,026 \pm 0,26$ g/ml, concordantes con trabajos realizados en animales sanos para la misma raza. Los ácidos grasos de cadena corta (caproico, caprílico, cáprico) representan un 12% de los ácidos grasos totales, valores superiores a la leche de vaca ($\approx 5\%$). Los resultados obtenidos son útiles para una futura reglamentación en leche de cabra. Por sus diferencias con la de vaca es importante generar estándares específicos.

Palabras clave: Cabra, leche, composición, ácidos grasos, calidad.

Abstract

Uruguay is a dairy country where predominates regulations in bovine milk. Goat milk is a complete food, suitable for children and seniors, but there are few studies in our country. We studied the hygienic-sanitary quality and composition of milk in Saanen goats during a complete lactation. 25 animals were used. Samples were obtained from the milk tank every two weeks. Total aerobic mesophilic count (TAMC), coliforms and Staphylococcus coagulase positive, Dörnic acidity, pH, composition, fatty acids and Somatic Cell Count (SCC) were analyzed. The results were: TAMC: $3,85 \pm 0,69$ ufc/ml Log_{10} , SCC $6,91 \pm 0,55$ cel/ml Log_{10} , CT $2,47 \pm 0,84$ ufc/ml Log_{10} , SCP $1,13 \pm 0,29$ ufc/ml Log_{10} . Values of fat $3,58 \pm 0,69\%$, protein $2,71 \pm 0,07\%$, lactose $3,84 \pm 0,10\%$, acidity $14,19 \pm 0,39$ °D, pH $6,66 \pm 0,06$ and density $1,026 \pm 0,26$ g/ml were obtained, being consistent with work performed in healthy animals and reported for the same breed. Caproic, caprylic and capric acids account for a 12% of the total fatty acids, higher than the cow milk ($\approx 5\%$).

The values obtained are a useful basis for future goat milk regulation. Considering its difference with cow's milk specific standards are necessary.

Keywords: Goat, milk, composition, fatty acids, quality.

Introducción

Importancia en la nutrición y salud humana

La imagen de la leche de cabra se basa en la salud y el valor nutricional. Estos aspectos positivos pueden ser beneficiosos para los productores e industriales siempre que se mantengan estrictas

condiciones microbiológicas. Al igual que la de vaca, la leche de cabra no puede sustituir la materna, sin embargo podría ser utilizada en humanos con efectos beneficiosos asociados con otros alimentos después del año de edad (Desjeux, 1993). De acuerdo con Haenlein (2004), existen tres razones para la demanda de leche de cabra, la primera es el consumo doméstico, demanda en aumento debido al crecimiento de la población humana. La segunda razón es el interés en los subproductos, especialmente quesos y yogures, en muchos países desarrollados. La tercera razón se deriva de un aspecto

médico, relativo a las alergias a la leche de vaca y otros problemas gastrointestinales. Los triglicéridos de cadena media, MCT (entre 6 y 10 átomos de carbono, según estos autores), presentan un interés muy particular desde un punto de vista terapéutico, a causa de su utilidad en el tratamiento de ciertas enfermedades metabólicas (Boza y Sanz, 1997; Sanz et al., 2003). También son beneficiosos para los síndromes de mala absorción, mejora de la digestión y trastornos del sueño, especialmente en los niños (Haenlein, 2001), y de enfermedades coronarias, fibrosis quística y cálculos biliares por su capacidad única de proporcionar energía metabólica mientras que reduce, inhibe y disuelve los depósitos de colesterol (Park, 1994; Sanz et al., 2003).

El bajo peso molecular e hidrosolubilidad de los MCT facilita la acción de las enzimas digestivas, haciendo que su hidrólisis sea más rápida y completa que la de los triglicéridos de cadena larga. A diferencia de éstos, la digestión de los MCT comienza a producirse en el estómago, ya que la lipasa gástrica prácticamente sin acción sobre los triglicéridos de cadena larga inicia la hidrólisis de los MCT, la cual será completada por la lipasa pancreática a un ritmo cinco veces superior a la hidrólisis de los triglicéridos de cadena larga (García, 1996 citado por Sanz et al., 2003).

Otra cualidad destacada de la leche de pequeños rumiantes son sus efectos beneficiosos y terapéuticos en las personas y especialmente en los niños que tienen alergia a la leche de vaca (Ribeiro y Ribeiro, 2010; Haenlein, 2001; Park, 1994). Park (1994) encontró que aproximadamente el 40% de todos los pacientes que son sensibles a la proteínas lácteas de la vaca toleran las de la cabra y que es muy útil para las personas que sufren de problemas como acidez, eczema, asma, migraña, colitis, úlcera estomacal, trastornos digestivos, enfermedades del hígado y de la vesícula biliar y síntomas relacionados con el estrés, tales como insomnio e indigestión neurótica.

Características de la leche de cabra

Según Larrosa y Kremer (1990), esta leche recién ordeñada presenta un sabor dulzón y olor neutro. Sin embargo, Boza y Sanz (1997) mencionan que su olor es fuerte como consecuencia de la absorción de compuestos aromáticos durante su manejo, generalmente inadecuado. Estos autores coinciden en que el color es más blanco que el de vaca, lo que se debe a la diferencia en el contenido de carotenos. Park et al. (2007), citando a varios autores, indican que la leche de cabra posee un contenido de sólidos totales y de nutrientes en una posición intermedia entre la leche de vaca y oveja. Se diferencia de la leche de vaca y humana en la digestibilidad más alta, alcalinidad, capacidad buffer y en sus características terapéuticas para la salud y nutrición humanas (Jandal, 1996; Park et al., 2007). La digestibilidad es más alta en la leche de cabra que en la de vaca debido a la homogeneización natural, ya que los glóbulos de grasa de la leche caprina son más pequeños (promedio de 3,49 μm frente a 4,55 μm en los de leche de vaca) y tienen una superficie mayor para el ataque de las lipasas intestinales, lo cual mejora la digestibilidad y la eficiencia del metabolismo de los lípidos (Park, 1994; Jandal, 1996; Park et al., 2007; De Souza et al., 2009).

De acuerdo a Morand-Fehr et al. (2007), la composición de macro y micronutrientes en la leche de cabra depende de los principales factores de producción que constituyen el sistema productivo: genotipo, características reproductivas y sanitarias de los animales, condiciones agro-climáticas y ambiente socioeconómico; así como de los métodos de producción: alimentación y ordeño. Las proteínas de esta leche no tienen grandes diferencias en comparación con la leche de vaca, excepto en la digestibilidad y en la secuencia de ciertas variantes genéticas (Desjeux, 1993). Los lípidos son los componentes más importantes de la leche en términos de costo, nutrición y en las características físicas y sensoriales que imparten a los productos lácteos. Los triglicéridos son el grupo más importante (casi 98%), incluyendo un gran número de ácidos grasos esterificados (Park et al., 2007). Los ácidos grasos de cadena media (MCT) son triglicéridos formados por ácidos grasos cuya cadena carbonada tiene entre 6 y 14 átomos de carbono, y alcanzan normalmente un porcentaje mayor

del 30%, a diferencia de la leche de vaca que no alcanza más del 20% (Sanz et al., 2003). Es por esto por lo que los ácidos grasos caproico (C6:0), caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) toman su nombre concretamente de la leche en donde aparecen mayormente y en la cual estos ácidos alcanzan un 15%, valor que solo llega al 5% en la leche de vaca (Boza y Sanz, 1997). Estos niveles elevados de ácido butírico, caproico, caprílico y cáprico le confieren características únicas para fabricar quesos, ya que intervienen en su sabor (Draksler et al., 2002).

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche y es un valioso nutriente que favorece la absorción intestinal del calcio, magnesio y fósforo, y la utilización de la vitamina D. Es importante para el mantenimiento del equilibrio osmótico entre el torrente sanguíneo y las células alveolares de la glándula mamaria durante la síntesis de leche, también para la secreción en la luz alveolar y en el sistema de conductos de la ubre (Park et al., 2007).

La calidad higiénico-sanitaria puede ser avalada en base a dos indicadores: el recuento de células somáticas, que indica la frecuencia de animales con mastitis en el rebaño, y el recuento total de bacterias, que refleja las condiciones de higiene y almacenamiento de la leche desde su obtención hasta el envío a la industria (De Souza et al., 2009). Según Zweifel et al. (2005), la evaluación de la calidad microbiológica es importante en la inocuidad alimentaria y, por tanto, en la protección de la salud de los consumidores. En la Unión Europea el recuento total de mesófilos aerobios (RTMA) en leche cruda de pequeños rumiantes, usada para el consumo de leche fluida y subproductos y tratada térmicamente, no debe superar el valor de 6,0 ufc/ml Log_{10} ; en cambio, si esa leche cruda se destina para la producción de productos sin tratamiento térmico no debe exceder a 5,69 ufc/ml Log_{10} . En Brasil uno de los requisitos para que la leche de cabra sea de buena calidad, además de los tenores mínimos de los principales componentes, es el RTMA, el cual no puede superar a 5,69 ufc/ml Log_{10} para la leche cruda (De Souza et al., 2009).

Las células somáticas son las células blancas de la sangre (leucocitos) y constituyen la defensa contra aquellas bacterias que penetran la barrera física del canal del pezón de la ubre. Además, se encuentran células epiteliales provenientes de la descamación del epitelio de la glándula mamaria (De Souza et al., 2009). En las cabras el recuento de células somáticas (RCS) presenta algunas particularidades, ya que en su secreción de leche se eliminan partículas citoplasmáticas junto a los leucocitos y células epiteliales. Estas partículas son no nucleadas, pero similares a los leucocitos en el diámetro y morfología (Gomes et al., 2006). De acuerdo con Paape et al. (2007), el RCS se ha convertido en un parámetro aceptado para evaluar la calidad de leche y es la base de los programas de control mundiales de leche de vaca, oveja y cabra para prevenir el ingreso de la leche anormal o no apta para el consumo humano. No obstante, Robertson y Muller (2005) sostienen que en cabras es más difícil conectar el RCS con una posible infección intramamaria. La razón de la controversia que existe entre RCS y la infección por mastitis es que la secreción de la leche de cabra difiere de la de vaca. Mientras que en la vaca la secreción es merócrina (la leche es presionada hacia afuera de los alvéolos), en la cabra es apócrina, con la aparición de un gran número de partículas citoplasmáticas en la leche normal. Estas partículas que no contienen ADN enmascaran y complican la interpretación de la respuesta de los leucocitos a la inflamación. Paape et al. (2007) coinciden con Robertson y Muller (2005) al mencionar que en las cabras el RCS no es aplicable para evaluar la calidad de leche debido a que el RCS de cabras sanas es más alto que en vacas y ovejas sanas. Pridalová et al. (2009) indican que el alto valor de RCS de la leche caprina es en parte causado por un aumento en la tasa de desprendimiento de células epiteliales y partículas de citoplasma como consecuencia de la secreción apócrina.

Por todo esto se considera de importancia el estudio de la leche de cabra en Uruguay, donde no existía, hasta el momento de realizar este trabajo, reglamentación que definiera sus parámetros de calidad higiénico-sanitaria ni de composición. Luego de culminado este estudio se establecieron pautas a nivel oficial para esta especie, con base en los resultados hallados.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 25 cabras de la raza Saanen, las cuales se encontraban en el Parque de Actividades Agropecuarias (PAGRO) perteneciente a la Intendencia de Montevideo, localizado en la zona de Colón, Montevideo, Uruguay.

Al tratarse de un sistema semi-extensivo, los animales se alimentaron con ración lechera y praderas implantadas (avena y alfalfa) durante toda la lactancia.

Metodología de muestreo

Para cumplir con los objetivos planteados se realizaron muestreos para análisis fisicoquímicos y microbiológicos, según la metodología descrita por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 50C:1995 citado por Pinto et al., 1998).

Las muestras se tomaron por triplicado con una frecuencia quincenal del volumen producido en el ordeño matutino (2 por mes, exceptuando el primer mes que se realizó 1 muestreo). Este muestreo tuvo lugar durante los meses que duró la lactancia (setiembre de 2010 a febrero de 2011), constituyendo un total de 11 muestreos (M1 a M11). Se tomaron muestras representativas del ordeño (tanque), para lo cual previamente se mezcló mecánicamente durante por lo menos 5 minutos (hasta obtener una homogeneización adecuada) y luego se extrajo una alícuota del volumen. Las muestras se colocaron en recipientes isotérmicos refrigerados y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante el transporte hasta su llegada al laboratorio. Los análisis fueron realizados dentro de las 24 horas posteriores a la extracción.

Análisis de laboratorio

Análisis de composición y fisicoquímico

Las muestras se analizaron en el laboratorio de calidad de leche del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de Facultad de Veterinaria (UdelaR) y en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). A cada muestra se le realizaron análisis de composición: materia grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG) y densidad, utilizando un equipo denominado Lactomilk® marca Lactoscan, modelo SLP, origen Bulgaria. El equipo se calibró utilizando los métodos de referencia para cada análisis (materia grasa: Gerber, proteína: Kjeldahl, SNG: gravimétricos). Se realizó recuento de células somáticas (RCS) mediante la técnica de Breed (International Dairy Federation, 1995) determinación de acidez Dörnic (Pinto et al., 1998) y pH mediante método de evaluación potenciométrico, utilizando un modelo de electrodos denominado Oakton®. El equipo analizador de leche presenta para cada componente analizado la siguiente precisión: materia grasa: $\pm 0,06\%$; proteína: $\pm 0,15\%$; lactosa: $\pm 0,2\%$; SNG (sólidos no grasos): $\pm 0,15\%$; densidad: $\pm 0,3\text{kg/m}^3$.

Análisis microbiológicos

Se realizó recuento de mesófilos aerobios totales (RTMA), coliformes totales y *Staphylococcus coagulasa positiva* (APHA, 2001).

Análisis de composición de ácidos grasos

La determinación del análisis de la composición de ácidos grasos de leche de cabra fue realizada mediante cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masa (EI), conforme con el método AOCS Ce 1-62, AOCS Ce 1-91. Para ello se realizó una extracción en frío con distintos solventes, según Norma ISO 14156 (2001), y una metilación de los ácidos grasos conforme método AOCS Ce 2-66, según la misma norma. Los ácidos grasos metilados se analizaron

mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 6890N con detector de masa Agilent 5973 Inert), equipado con una columna capilar (Supelco SP- 2560, 100 m x 0.25 mm ID x 0.20 μm film). Se utilizó gas Carrier Helio 99.999% de pureza. La inyección split fue hecha a una relación 1:10; volumen 1 μL . Las condiciones adoptadas del equipo fueron: temperatura del inyector 250 °C; temperatura inicial del horno: 170 °C; rampa de temperatura 1 °C/min; temperatura final del horno 225 °C durante 40 min; temperatura de la fuente 200 °C, Ionización por impacto electrónico. La identificación y cuantificación de los ácidos grasos se llevó a cabo mediante la comparación de los tiempos de retención relativos de cada pico cromatográfico con los picos obtenidos de la inyección de la solución de FAME de 37 componentes (Supelco 47885-U). Los resultados de los ácidos grasos fueron expresados en porcentaje máscico.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando estadística descriptiva con el programa Microsoft Excel (Office 2010).

Resultados

A continuación se presentan los resultados obtenidos de calidad higiénico-sanitaria de leche caprina durante un ciclo de lactancia (6 meses).

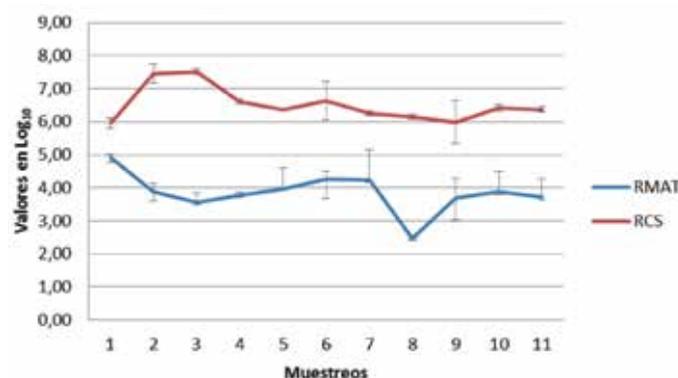


Gráfico 1. Recuento de mesófilos aerobios totales (RMAT) y recuento de células somáticas (RCS) durante un ciclo de lactancia en leche caprina (ufc/ml Log₁₀). (n=33)

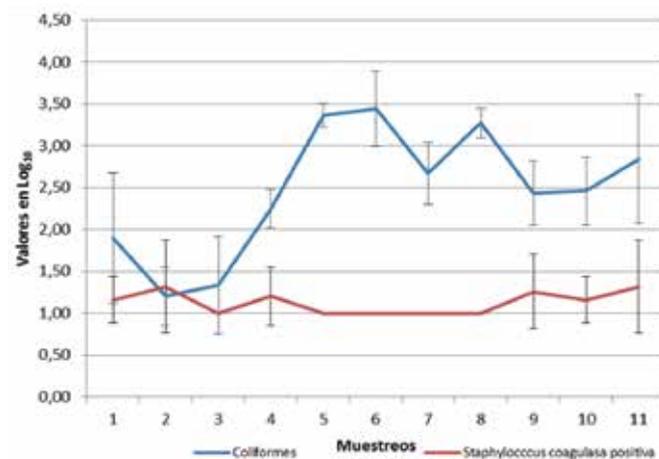


Gráfico 2. Recuento de coliformes totales y *Staphylococcus coagulasa positiva* durante un ciclo de lactancia en leche caprina (ufc/ml Log₁₀) (n=33).

En las Tablas 1 y 2 y Figura 1 se muestran los resultados obtenidos de composición de leche caprina.

	MG (%)	PROTEÍNA (%)	LACTOSA (%)	SNG (%)
M1	3,71±0,02	2,8±0,01	3,97±0,02	7,53±0,03
M2	3,91±0,04	2,71±0,02	3,84±0,03	7,28±0,06
M3	3,46±0,18	2,79±0,02	3,96±0,04	7,49±0,05
M4	4,10±0,08	2,72±0,00	3,84±0,05	7,29±0,05
M5	2,83±0,01	2,75±0,03	3,94±0,01	7,47±0,03
M6	3,16±0,07	2,66±0,05	3,78±0,01	7,16±0,02
M7	3,30±0,16	2,69±0,02	3,82±0,02	7,24±0,04
M8	2,60±0,02	2,75±0,11	3,93±0,03	7,42±0,06
M9	4,98±0,05	2,56±0,01	3,62±0,01	6,88±0,01
M10	3,30±0,05	2,64±0,01	3,74±0,01	7,09±0,03
M11	4,06±0,05	2,71±0,01	3,83±0,03	7,28±0,03
Media	3,58±0,65	2,71±0,07	3,84±0,10	7,28±0,19

Tabla 1. Composición de la leche caprina durante un ciclo de lactancia (6 meses) (n=33). La media corresponde a 11 muestreos.

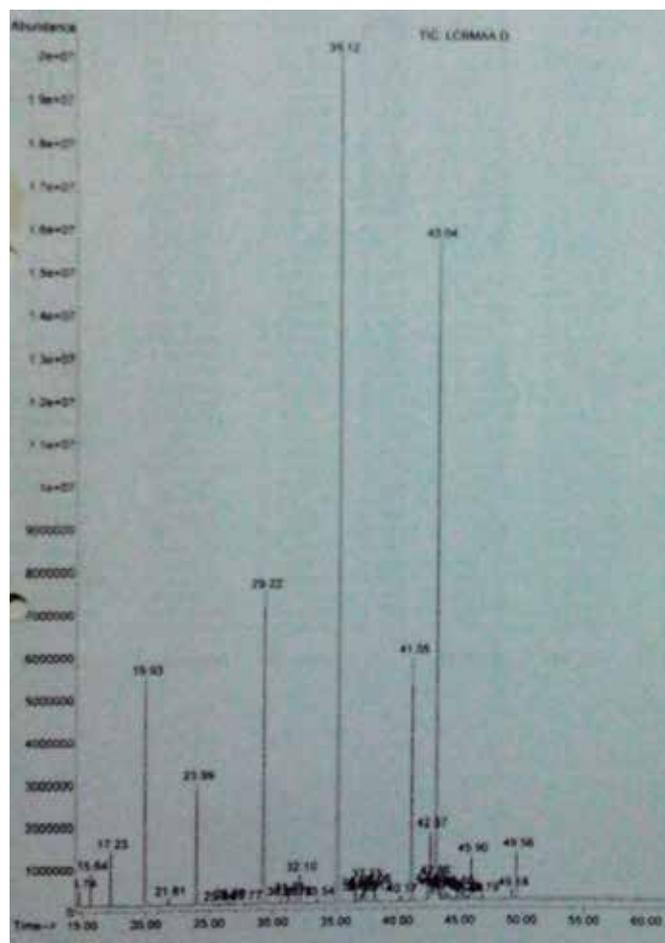


Figura 1. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en leche de cabra.

Ácidos grasos	g/100 g total de ácidos grasos
C 4:0	0,56
C 6:0	1,28
C 8:0	2,05
C 10:0	8,33
C 10:1	0,15
C 11:0	0,09
C 12:0	4,21
C 12:1 cis	0,19
C 13:0	0,21
C 14:0	11,72
C 14:1 cis	0,21
C 15:0	1,62
C 15:1	0,04
C 16:0	31,09
C 16:1 cis	0,65
C 16:1 trans	0,25
C 17:0	1,70
C 17:1 cis	0,30
C 18:0	9,55
C 18:1 cis	20,36
C 18:1 trans	2,24
C 18:2 cis (n-6)	1,44
C 18:2 trans (n-6)	0,55
C 18:2 CLA	0,83
C 18:3 (n-3)	0,56
C 19:0	0,22
C 19:1	0,15
C 20:0	0,17
C 20:1 cis	0,05
C 20:2 cis (n-6)	0,04
C 20:3 cis (n-3)	0,06
C 20:4 (n-6)	0,08
C 20:5 (n-3)	0,03
C 21:0	0,05
C 22:0	0,05
C 22:1 cis	0,04
C 22:2 cis	0,02
C 22:5 (n-6)	0,06
C 22:6 (n-3)	0,02
C 23:0	0,03
C 24:0	0,01
SFA	2,34
MUFA	0,70
PUFA	0,07
GRASA TRANS	0,10
CLA	0,03
GRASA TOTAL	3,22
UFA (%)	27,33
SFA (%)	72,67

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de leche de cabra de la raza Saanen (n=11). SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos poliinsaturados; CLA: ácido linoleico conjugado; %UFA: porcentaje de ácidos grasos insaturados; %SFA: porcentaje de ácidos grasos saturados.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de las propiedades fisicoquímicas de las muestras de leche analizadas para este rebaño.

	MG (%)	PROTEÍNA (%)	LACTOSA (%)
M1	13,66±0,55	6,81±0,02	1,030±0,00
M2	19,00±0,22	6,65±0,01	1,025±0,00
M3	14,00±0,28	6,65±0,04	1,026±0,57
M4	13,00±0,00	6,62±0,01	1,025±0,00
M5	13,66±0,57	6,63±0,01	1,026±0,00
M6	12,66±1,10	6,68±0,05	1,025±0,00
M7	14,00±0,00	6,69±0,00	1,025±0,00
M8	12,66±0,57	6,64±0,05	1,026±0,00
M9	15,00±0,00	6,62±0,02	1,026±0,57
M10	14,33±0,57	6,64±0,02	1,025±0,00
M11	16,00±0,00	6,61±0,00	1,025±0,57

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la leche caprina durante un ciclo de lactancia (n=33).

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo en relación a la calidad higiénica en base al RMAT durante toda la lactación mostraron un promedio $3,85 \pm 0,69$ ufc/ml Log_{10} (Gráfico 1). Se observan valores considerablemente inferiores a los encontrados en estudios similares en países como Venezuela y Argentina, donde Cordiviola et al. (2007) obtuvieron valores de 6,33 ufc/ml Log_{10} y García et al. (2009), en cabras Saanen, de 7,52 ufc/ml Log_{10} . También coinciden con Morgan et al. (2003) en Grecia, 7,55 ufc/mL Log_{10} y Portugal, 7,66 ufc/ml Log_{10} , y Zweifel et al. (2005) en Suiza, 6,00 ufc/ml Log_{10} .

En referencia al recuento de células somáticas en la región, en Brasil Gomes et al. (2006) hallaron valores promedio de 5,41 y 5,93 cél/ml Log_{10} . Mientras que en Argentina, Cordiviola et al. (2007), utilizando el método de recuento por microscopía directa (Prescott y Breed), encontraron un valor promedio de 6,90 cel/ml Log_{10} en animales que no presentaban mastitis, lo cual se asemeja a los valores hallados en este estudio aplicando la misma metodología. A su vez, Robertson y Muller (2005) afirman que los valores varían dependiendo del método de análisis, y que estos aumentan si dicho método no distingue células nucleadas de las no nucleadas. En esta investigación se observó un valor promedio de recuento de células somáticas de 6,91 cel/ml Log_{10} , todos animales sanos (Gráfico 1), lo que indicaría que existe una marcada coincidencia con el resto de los autores citados acerca del poco valor relativo del recuento de células somáticas como indicador de infecciones intramamarias en leche caprina.

En cuanto a los microorganismos, los coliformes constituyen el grupo de enterobacterias más importante presente en leche cruda. Se encuentran prácticamente en todas partes, por lo que son utilizados como "indicadores", es decir, microorganismos cuya presencia en gran número delata prácticas de trabajo en malas condiciones higiénicas (Draksler et al., 2002). En relación a coliformes totales para leche cruda de cabra, Bergonier et al. (2009) reportaron valores de 5,92 ufc/ml Log_{10} ; Cordiviola et al. (2007) obtuvieron valores de 5,00 ufc/ml Log_{10} , y Morgan et al. (2003) hallaron valores promedio de coliformes totales de 6,22 ufc/ml Log_{10} , 7,60 ufc/ml Log_{10} en Grecia y Portugal, respectivamente. En rodeos caprinos en países de la región algunos autores como Chávez et al. (2007) registraron un promedio de 5,00 ufc/ml Log_{10} . Schmidt et al. (2008) indican que los coliformes totales variaron entre 3,63 y 6,14 ufc/ml Log_{10} . Por otro lado, en Venezuela se observaron valores más elevados; García et al. (2009) reportan un valor promedio de 5,91 ufc/ml Log_{10} . En este estudio los valores de coliformes totales encontrados para este rodeo fueron de $2,47 \pm 0,84$ ufc/ml Log_{10} , muy inferiores a los citados por la bibliografía.

Los patógenos más prevalentes en la cabra son los estafilococos. Las enterotoxinas estafilocócicas, producidas por *Staphylococcus* coagulasa positiva, en general se caracterizan por ser termorresistentes y persisten en los productos lácteos elaborados con leche de animales infectados, a pesar de la pasteurización o esterilización, lo que implica un riesgo para el consumidor (Contreras et al., 2010). En cuanto a valores de *Staphylococcus* coagulasa positiva, Morgan et al. (2003) registraron valores promedio de 5,22 ufc/ml Log_{10} , 4,87 ufc/ml Log_{10} . En Brasil, Queiroga et al. (2002) indican un valor máximo de *Staphylococcus aureus* de 3,54 ufc/ml Log_{10} . Muehlherr et al. (2003), en Suiza, detectaron *Staphylococcus aureus* en el 31,7% de las muestras, con un valor promedio menor a 1,00 ufc/ml Log_{10} y el valor máximo fue de 4,34 ufc/ml Log_{10} . En Uruguay en el Reglamento Bromatológico Nacional (1994) se admiten hasta 3,00 ufc/mL Log_{10} de *Staphylococcus aureus* en leche cruda bovina, y no existen niveles establecidos para leche caprina. En este trabajo el valor promedio encontrado, de $1,13 \pm 0,29$ ufc/ml Log_{10} , es sensiblemente inferior a los reportados por los autores citados. De acuerdo a estos resultados es posible considerar que la leche estudiada presenta una muy buena calidad desde el punto de vista microbiológico.

En cuanto a la calidad de composición de leche de cabra, los valores promedio hallados fueron: materia grasa $3,58 \pm 0,69\%$, proteína $2,71 \pm 0,07\%$, lactosa $3,84 \pm 0,10\%$, SNG $7,28 \pm 0,19\%$. En Uruguay, Damián et al. (2008) consignaron valores de materia grasa, proteína y lactosa en cabras Saanen de 3,59%, 2,84% y 4,54%. En Brasil, De Souza et al. (2009) presentaron los siguientes valores promedio: grasa 3,46%, proteína 2,89%, lactosa 4,44%. Queiroga et al. (2007) reportan 3,4%, 2,7% y 4,1% en los mismos componentes, respectivamente, en cabras Saanen. En este trabajo se observa que los valores de materia grasa fueron levemente más altos, y los de lactosa y proteína fueron más bajos, en comparación con los de los autores citados. En Argentina, Frau et al. (2010) en cabras Saanen cruza Anglo Nubian (75% Saanen), pertenecientes a un rebaño con manejo extensivo, encontraron valores de 5,59%, 3,39%, y 4,36% en materia grasa, proteína y lactosa. Estas diferencias evidencian la importancia de la raza y sistemas de producción en la composición de la leche. De acuerdo con Morand-Fehr et al. (2007), se registran diferencias significativas en la composición cuando la ingesta de energía proviene de sistemas de producción basados en pasturas o de sistemas intensivos con estabulación. Los sistemas de producción basados en pasturas se caracterizan por dar un alto rendimiento en el contenido de grasa láctea debido a la dieta rica en fibra. Mientras que en los sistemas intensivos, altos suministros de concentrados permiten una producción de leche rica en proteínas y relativamente baja en grasas (Morand-Fehr et al., 2007). Park et al. (2007) indican que los cambios en la composición se producen por temporadas, debido a que al final de la lactación los valores de grasa, proteína, sólidos totales y minerales se incrementan, en tanto que el contenido de lactosa decrece.

Como se especificó anteriormente, los animales utilizados en este estudio consumieron ración y praderas implantadas durante toda la lactancia. La materia grasa es el componente más variable de la leche y está muy estrechamente relacionado al tipo de alimentación. Dado que este estudio se realizó en un sistema semi extensivo (básicamente pastoril), las variaciones climáticas y de manejo afectan el tipo de alimentación y, por ende, la composición de la leche, con la materia grasa como el componente más afectado. En cuanto a la lactosa, si bien es el componente más constante de la leche, también está muy influenciado por la alimentación (principalmente relacionado a la síntesis de proteínas), por tanto las diferencias obtenidas en este trabajo podrían explicarse por el bajo porcentaje de concentrados administrado en la dieta.

En leche de cabra se encuentran los ácidos grasos de cadena corta (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0) en una proporción tres veces mayor que en la leche de vaca (Haenlein, 2004). Según lo reportado por Páez et al. (2002), en un estudio realizado en vacas Holando alimentadas en sistemas pastoriles, la leche presentó valores de ácidos grasos de cadena corta de 2,6%, muy inferior al 12,37% para leche de cabra observado en este estudio. Varios autores en distintos países han caracterizado el perfil de ácidos grasos de leche bovina. En leche

sueca se han reportado valores para C6:0, C8:0 y C10:0 de 1,4%, 2,7% y 3,3%, respectivamente (Lindmark Mansson, 2008). Valores similares se han observado en estudios realizados en vacas Holando en rebaños con distintos niveles de producción de Estados Unidos, obteniendo niveles de ácido cáprico (C10:0) de 2,79% (Bobe et al., 2007). Ceballos et al. (2009) compararon leche de vaca y de cabra y obtuvieron valores de ácido cáprico de 3,36% en vaca y 11,07% en cabra, bajo las mismas condiciones de producción. Si bien la proporción de ácidos grasos puede ser alterada mediante factores como alimentación, animales (individuo y etapa de lactancia) y medio ambiente, hasta la fecha la mayor atención se ha centrado en los factores de alimentación, los que buscan cambios hacia un mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados. Jensen et al. (2002) obtuvieron valores de ácidos caproico, caprílico y cáprico en los siguientes rangos: 1 a 5%, 1 a 3% y 2 a 4%, respectivamente. Los valores obtenidos de ácido cáprico (8,4%) en la leche de cabra Saanen estudiada en este trabajo es de 2 a 3 veces mayor que los de leche bovina referidos en la bibliografía. Sin embargo, más allá de los cambios producidos por los factores mencionados, la leche de cabra se caracteriza por mantener mayor porcentaje de ácidos caprílico, caproico y cáprico (asociados a propiedades benéficas para la salud), en comparación con la leche bovina.

Por otro lado, es aseverado por Chacón (2005) que la leche de cabra tiene por lo general 35% de ácidos grasos de cadena mediana contra un 17% de la leche de vaca.

Según Chávez (2007), la leche de cabra presenta valores de ácidos grasos mono (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de 29% (dado que el 71% de los ácidos grasos de cadena larga son insaturados), los que coinciden con los valores observados en este estudio de 27,33% para leche caprina (Tabla 2). En leche bovina con alimentación exclusivamente a base de pastura se observaron valores de ácidos grasos insaturados (UFA) de 32,07% (Páez et al., 2002), los cuales son similares y hasta sensiblemente superiores a los encontrados en este trabajo para leche caprina.

La leche de cabra presenta muy bajo contenido de ácidos grasos trans (aproximadamente 2-3 %), factor que contribuye a disminuir el colesterol denominado "malo" (Chávez, 2007). En leche de vaca se reportan valores de ácidos trans de 5,2% (Griguol 2007). En este estudio se encontraron valores para leche de cabra de 3,04%, que coinciden con la bibliografía citada para leche caprina (Tabla 2).

Por lo expuesto, la leche de cabra podría ser considerada más saludable en comparación con la leche de vaca, principalmente en lo relacionado a la salud cardiovascular. Esta condición estaría dada por su alto contenido de ácidos grasos de cadena corta (caproico, caprílico y cáprico) y a una más baja proporción de ácidos grasos trans que los de la leche bovina. Los ácidos grasos de cadena corta le confieren, además, la característica de ser una leche más digestible para el organismo humano, y la posicionan mejor que la leche bovina en este sentido. No obstante, no se observaron diferencias en cuanto al contenido de ácidos grasos insaturados (MUFA y PUFA) cuando se compara con leche de vacas alimentadas exclusivamente con pasturas.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas, en Argentina Frau et al. (2010) registraron el valor promedio de acidez de 19,52°D (16,55 – 22,63°D). Queiroga et al. (2007) analizaron leche de cabras Saanen y reportaron valores de acidez de 15, 14,2 y 16,5°D a los 35, 85 y 135 días de lactación, respectivamente. Morgan et al. (2003) hallaron en Grecia valores de acidez de 16, 17, 18 y 20°D; en Portugal 16°D, y en Francia de 14 y 16°D. El resultado encontrado en este trabajo es de 14,19±0,39°D y es similar al citado por Queiroga et al. (2007). Existe una coincidencia con Luquet (1991) y Frau et al. (2010), quienes indican que los altos valores de acidez se encuentran asociados con altos porcentajes de caseínas. Los valores reportados por Luquet (1991) para leche de cabra son de 16 a 18°D. A su vez, coinciden con Draksler et al. (2002), quienes afirman que la acidez de la leche se debe a la presencia de fosfatos ácidos, aminoácidos, CO₂ y caseína en solución.

En relación a los valores de pH, Draksler et al. (2002) han encontrado variaciones de aspecto racial, pero en general la mayoría de los autores que estudiaron esta propiedad en leche de cabras Saanen

observaron valores entre 6,1 y 6,7 (Park et al. 2007; Morgan et al., 2003). Este rango se podría explicar, ya que según Arnaud et al. (2009) el pH representa la acidez actual o verdadera de la leche, pudiendo variar durante el curso del ciclo de la lactación y bajo la influencia de la alimentación. El valor medio de pH obtenido en este trabajo fue de 6,66±0,06, similar a los obtenidos por los autores citados.

En relación a la densidad de la leche de cabra, según Luquet (1991) varía entre 1,026 y 1,042 g/ml, y esta magnitud depende principalmente de dos factores: el contenido de extracto seco y la concentración de materia grasa. Ludeña et al. (2006) reportaron un valor promedio para densidad de 1,030 g/ml. La media de densidad en este estudio fue de 1,026±0,26 g/ml, valor que se encuentra dentro de los rangos reportados por los autores citados.

Conclusiones

Los resultados obtenidos de la leche caprina de raza Saanen concuerdan con otros estudios similares a nivel internacional, excepto los valores de materia grasa y lactosa que están muy relacionados a la alimentación y manejo de cada sistema productivo en particular.

Se confirmó que el rebaño de raza Saanen de este estudio posee cantidades superiores en ácidos caproico, caprílico y cáprico y bajas cantidades de ácidos grasos trans que los reportados para leche de vaca, lo cual redundará en beneficios a la salud de la leche caprina en comparación con la bovina.

Reconocimientos

Al equipo del laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Dr. Álvaro González, Lic. Sheila Giacaman y Lic. Karina Cal por el apoyo en los análisis de laboratorio.

A Laura Olazábal del Departamento de desarrollo de métodos analíticos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

A la Prof. Adj. Carmen Silvia Gallo Muniz, encargada del área de inglés de Facultad de Veterinaria de UdelaR por la corrección del resumen.

Referencias

- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Ce 1-62.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6a ed. Urbana: AOCS, 2009. Official Method Ce 2-66.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 4a ed., reapproved 1993. Urbana: AOCS, 1995. Official Method Ce 1-91.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. 2 ed. Washington: APHA, 1984.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 4a.ed. Washington DC: American Public Health Association. 2001, 676p.
- ARNAUD, F.; CARRO, S.; DE LOS SANTOS, R.; GRILLE, L.; VERA, S. *Acidez y prueba de estabilidad de leche y derivados*. Departamento de Ciencia y Tecnología de la leche. Montevideo: Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, 2009.
- BERGONIER, D.; CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.; BERTHEL, X. Mastitis of dairy small ruminants. En: *Veterinary*

- Reserch.* 2009, 34:689-716.
- BOBE, G.; LINDBERG, G.; FREEMAN, A.; BEIT, D. Short communication : composition of milk protein and milk fatty acids is stable for cows differing in genetic merit for milk production. En: *Journal Dairy Science.* 2007, 90:3955–3960.
 - BOZA, J.; SANZ, S. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. En: *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.* 1997, 10:109-139.
 - CEBALLOS, L.; MORALES, E.; DE LA TORRE ADARVE, G.; CASTRO, J.; MARTINES, L.; SANZA SAMPELAYO M.R. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. En: *Journal of Food Composition and Analysis.* 2009, 22:322-329.
 - CHACÓN VILLALOBOS, A. Aspectos nutricionales de la leche de cabra (*Capraeircus*) y sus variaciones en el proceso agroindustrial. En: *Agronomía Mesoamericana.* 2005, 16(2):239-252.
 - CHÁVEZ, M.; MARGALEF, M.; MARTÍNEZ, M. Cuantificación de lipólisis en leche caprina (Saanen) cruda y térmicamente tratada. En: *ALEPRyCS. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos,* (Mendoza, 2-4 de mayo de 2007). Mendoza: ALEPRyCS, 2007.
 - CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. Etiología de la infección intramamaria caprina en relación con los programas de control [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 2010. [Consulta: 6 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.exopol.com/seoc/docs/1pmbcg09.pdf>.
 - CORDIVIOLA, C., ARIAS, R., VAAMONDE, G., LACCHINI, R., ANTONINI, A. Calidad Higiénico-Sanitaria de la leche de cabra en la cuenca de Cañuelas, Provincia de Buenos Aires. En: *ALEPRyCS. Vº Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos,* (Mendoza, 2-4 de mayo de 2007). Mendoza: ALEPRyCS, 2007.
 - DAMIÁN, J.P.; SACCI, I.; REGINESI, S.; DE LIMA, D.; BERMÚDEZ, J. Cheese yield, casein fractions and mayor components of milk of Saanen and Anglo Nubian dairy goats. En: *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* 2008, 60:1564-1569.
 - DE SOUZA, G.; RENALDI, J.; GOMES DE FARIA, C.; CASTRO, L. Composição e qualidade higienico-sanitária do leite de rebanhos caprinos. Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica. Juiz de Fora, MG. En: FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H. *Produção de caprinos na região da Mata Atlântica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite.* Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009.
 - DESJEUX, J.F. Valeur nutritionnelle du lait de chevre. En: *Lait.* 1993, 73:573-580.
 - DRAKSLER, D.; NÚÑEZ, M.; GONZÁLEZ, S.; OLIVER, G. Leches de pequeños rumiantes: características generales y su microbiología. En: BARBERIS, S. *Bromatología de la leche.* San Luis: Hemisferio Sur, 2002. pp. 121-148.
 - FRAU, S.; TOGO, J.; PECE, N.; PAZ, R.; FONT, G. Estudio comparativo de la producción y composición de leche de cabra de dos razas diferentes en la provincia de Santiago del Estero. En: *Revista de la Facultad de Agronomía.* 2010, 109(1):9-15.
 - GARCÍA, U.; RIVERO, J.; GONZÁLES, P.; VALERO-LEAL, K.; IZQUIERDO, P.; GARCÍA, A.; COLMENARES, C. Calidad bacteriológica de la leche cruda de cabra producida en la parroquia Faria, Municipio Miranda, estado Zulia, Venezuela. En: *Revista Facultad de Agronomía (LUZ).* 2009, 26:59-77.
 - GOMES, V.; DELLA-LIBERA, A.; PAIVA, M.; MADUREIRA, K.; ARAÚJO, W. Effect of stage of lactation on somatic cell counts in healthy goats (*Capraeircus*) breed in Brazil. En: *Small Ruminant Reserch.* 2006, 64:30-34.
 - GRIGUOL, V.; LEÓN-CAMACHO, M.; VICARIO, I. Revisión de los niveles de ácidos grasos trans encontrados en distintos tipos de alimentos. En: *Grasas y Aceites.* 2007, 58(1):87-98.
 - HAENLEIN, G. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy res. En: *Journal of Dairy Science.* 2001, 84:2097-2115.
 - HAENLEIN, G. Goat milk in human nutrition. En: *Small Ruminant Reserch.* 2004, 51:155–163.
 - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (Belgium). IDF 148A: *Milk enumeration of somatic cells.* Brussels: International Dairy Federation, 1995.
 - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. IDF. (Brussels, Belgium). *Milk and milk products—Guidance on sampling.* FIL / IDF Standard 50C. International Dairy Federation. 1995.
 - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 14156/IDF 172: *Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds.* Geneva: ISO, 2001.
 - JANDAL, J.M. Comparative aspects of goat and sheep milk. En: *Small Ruminant Reserch.* 1996, 22:177-185.
 - JENSEN, R. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. En: *Journal Dairy Science.* 2002, 85:295-350.
 - LARROSA, J.; KREMER, R. *Leche ovina y caprina. Una nueva alternativa agroindustrial.* Montevideo: Hemisferio Sur, 1990.
 - LINDMARK MANSSON, H. Fatty acids in bovine milk fat. En: *Food and Nutrition Research.* 2008, 1821.
 - LUDEÑA, F.; PERALTA, S.; ARROYO, O.; FUNG, L.; GONZALEZ, C. Caracterización físico-química y microbiológica de la leche de cabra y su conservación por el sistema lactoperoxidasa. En: *Mosaico Científico.* 2006, 3(1):17-27.
 - LUQUET, F.M. *Leche y productos lácteos. Vaca-Cabra-Oveja.* Zaragoza: Acribia. 1991.
 - MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M.; LE FRILEUX, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. En: *Small Ruminant Reserch.* 2007, 68:20–34.
 - MUEHLHERR, J.; ZWEIFEL, C.; CORTL, S.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. En: *Journal Dairy Science.* 2003, 86:3849-3856.
 - MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and médium enterprises in Greece, Portugal and France. En: *Small Ruminant Reserch.* 2003, 47:39-49.
 - PAAPE, M.; WIGGANS, G.; BANNERMAN, D.; THOMAS, D.; SANDERS, A.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. En: *Small Ruminant Reserch.* 2007, 68:114-125.
 - PÁEZ, R.; GARCÍA, P.; COMERÓN, E.; ARONNA, M.; ROMERO, L.; TAVERNA, M.; PENSEL, N. Perfil de ácidos grasos en leche de vacas Holando Argentino y Jersey sometidas a dos sistemas de alimentación. En: *Revista Argentina Producción Animal.* 2002, 22(Suplem. 1):43-44.
 - PARK, Y. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. En: *Small Ruminant Reserch.* 1994, 14:151–159.

- PARK, Y.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. En: *Small Ruminant Reserch*. 2007, 68:88-113.
- PRIDALOVÁ, H.; JANSTOVÁ, B.; CUPAKOVÁ, S.; DRACKOVÁ, M.; NAVRATILOVÁ, P.; VORLOVÁ, L. Somatic cell count in goat milk. En: *Folia Veterinaria*. 2009, 53(2):101-105.
- PINTO, M.; VEGA Y LEON, S. *Métodos de análisis de la leche y derivados*. Valdivia: Universidad Austral de Chile, 1998.
- QUEIROGA, R.; COSTA, R.; BISCONTINI, T. Características microbiológicas de la leche de cabra producida en el Nordeste de Brasil [En línea]. [s.l.]: SEOC, 2002. [Consulta: 3 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.exopol.com/seoc/docs/vsci0opl.pdf>
- QUEIROGA, R.; COSTA, R.; BISCONTINI, T.; MEDEIROS, A.; MADRUGA, M.; SCHULER, A. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. En: *Revista Brasileira Zootecnia*. 2007, 36(2):430-437.
- *Reglamento bromatológico nacional decreto 315/1994 de fecha 05/07/1994 : anotado y concordado con apéndice normativo*. Montevideo: MSP, 1994. pp. 143-155.
- RIBEIRO, A.; RIBEIRO, S. Specialty products made from goat milk. En: *Small Ruminant Reserch*. 2010, 89:225-233.
- ROBERTSON, N.; MULLER, C. Somatic cell count in goat's milk as an indication of mastitis [En línea]. En: *SA-ANIM SCI*, 2005, v. 6. [Consulta 8 de mayo de 2012]. Disponible en: <http://www.sasas.co.za/sites/sasas.co.za/files/RobertsonAPop05.pdf>
- SANZ, S.; FERNÁNDEZ, J.; DE LA TORRE, G.; RAMOS, E.; CARMONA, F.; BOZA, J. Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. En: *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 2003, 16:155-166.
- SCHMIDT, V.; GOTTARDI, C.; MURICY, R.; CARDOSO, M. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. En: *Ciência Rural*. 2008, 38(3):743-748.
- ZWEIFEL, C.; MUEHLHERR, J.; RING, M.; STEPHAN, R. Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. En: *Small Ruminant Reserch*. 2005, 58:63-70.

Efecto de la congelación de leche caprina sobre la estabilidad oxidativa, calidad higiénico sanitaria y de composición en un rebaño de la raza Saanen

Effect of goat milk freezing on oxidative stability, hygienic sanitary and composition quality in a Saanen breed herd

Grille, Lucía ⁽¹⁾, Carro, Silvana ⁽¹⁾, Escobar, Daniela ⁽⁴⁾, Fros, Carolina ⁽³⁾, Cousillas, Georgina ⁽³⁾, Lazzarini, Florencia ⁽³⁾, Borges, Alejandra ⁽⁴⁾, González, Silvana ⁽²⁾

⁽¹⁾Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay - ⁽²⁾Parque de Actividades Agroindustriales, PAGRO, Unidad Montevideo Rural, Intendencia de Montevideo, Uruguay - ⁽³⁾Facultad de Veterinaria, UdelaR (trabajo final de grado) - ⁽⁴⁾Gerencia de I+D+I, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU, Uruguay.

Contacto: lgrille@gmail.com

Recibido: 29/5/2013 - Aprobado: 6/12/2013

Resumen

En establecimientos caprinos para la conservación de la leche es común aplicar la tecnología de congelación, ya sea para venta directa o para la elaboración de quesos. En este trabajo se estudió la congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ como método de conservación de la leche caprina durante 6 meses. Se evaluó el efecto de la congelación en leche cruda y en leche pasteurizada. Se utilizaron dos métodos de descongelado: baño María ($27\text{ }^{\circ}\text{C}$) y heladera ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). En los días 0, 60, 120 y 180 se analizó la composición (% materia grasa, % proteínas totales, % lactosa, % sólidos totales y % sales), parámetros fisicoquímicos (pH, acidez y densidad), parámetros microbiológicos (recuento de mesófilos aerobios totales, coliformes totales, *Staphylococcus coagulasa positiva*), recuento de células somáticas y la estabilidad a la oxidación (según tiempos de inducción a la oxidación por Rancimat). Se concluye que no se afectó la calidad de la leche de acuerdo a los parámetros de este estudio durante la congelación por el período de 6 meses. Como método de conservación podría ser una alternativa para los establecimientos rurales. No se encontró diferencia en los métodos de descongelación evaluados.

Palabras clave: Conservación, leche caprina, congelación.

Abstract

In goat milk farm, in order to prevent milk from going off, it is common to apply the freezing technique, either to sell to public or for cheese making. We studied the freezing at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ as a method of conservation of goat milk for 6 months. We evaluated the effect of freezing on raw and pasteurized milk. Two thawed methods were evaluated: water bath ($27\text{ }^{\circ}\text{C}$) and refrigerator ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). The composition was analyzed at 0, 60, 120 and 180 days (% fatty matter, % total protein, % lactose, % total solids and % salt), physicochemical parameters (pH, acidity and density), microbiological parameters (total aerobic mesophilic count, total coliforms, *Staphylococcus coagulase positive*), somatic cell count and the oxidation stability (oxidation induction times, OIT, according to Rancimat). The quality of milk was not affected according to the parameters in this work during a six months freezing period. It could be an alternative as a conservation method for farms. We did not find any difference in the defrosting methods studied.

Keywords: Conservation, goat milk, freezing.

Introducción

En Uruguay, la mayoría de los productores de leche caprina posee tambos de pequeña extensión donde la mayor parte de la producción se destina a la elaboración de quesos (70%) y el resto a consumo directo y alimentación de cabritos (Barberis, 2002). Estos productores se concentran en la zona suroeste del país (aproximadamente 16.000 km²), región que posee una larga tradición lechera. Generalmente, estos tambos de pequeña extensión emplean mano de obra familiar (Ciappesoni, 2006). En estos establecimientos se utiliza la tecnología de congelación, ya sea para venta directa o para materia prima, y así se

hace posible mantener la elaboración de quesos artesanales en forma continua durante todo el año.

Para considerar una leche de calidad se deben tener en cuenta dos aspectos importantes: sus componentes y los factores contaminantes. La leche se puede afectar tanto en la propia glándula mamaria como en el medio ambiente, o incluso durante los procesos de la cadena de comercialización y procesamiento (Ávila, 2000).

La calidad higiénico-sanitaria puede ser evaluada por medio del recuento de células somáticas (RCS), que indica la frecuencia de animales con mastitis en el rebaño, y el recuento total de bacterias, que indica las condiciones de higiene y almacenamiento de la leche desde su obtención hasta el envío a la industria (Nunes de Sousa et al.,

2009). De acuerdo con Paape et al. (2007), el RCS se ha convertido en un parámetro aceptado para evaluar la calidad de leche y es la base de los programas de control mundiales de leche de vaca, oveja y cabra para prevenir el ingreso de la leche anormal o no apta para el consumo humano. Sin embargo, según Robertson y Muller (2005) en cabras es más difícil conectar el RCS con una posible infección intramamaria. Entre los microorganismos indicadores de calidad higiénico-sanitaria existentes, los más utilizados en leche son los coliformes totales y *Staphylococcus coagulasa* positiva. Cardoso (1985) plantea que los coliformes termotolerantes son indicadores de contaminación fecal y de riesgo de presencia de microorganismos patógenos que pueden causar toxiinfecciones en el consumidor. Los estafilococos son de gran importancia, principalmente los coagulasa positiva, pues son capaces de producir enterotoxinas termoestables que pueden llegar al consumidor después de la pasteurización.

La conservación de la leche es realizable, entre otros métodos, por medio de la refrigeración o incluso la congelación, que es uno de los métodos de conservación de la leche caprina que utilizan ciertos establecimientos con el fin de obtener mayor vida útil y mayor disponibilidad de la leche en distintas épocas del año.

Algunos autores hallaron que este método puede tener efectos adversos en la calidad, así como también en las propiedades fisicoquímicas, de composición y sensoriales (Needs, 1992). De la Fuente et al. (1997), Gomes et al. (1997) y Haenlein (2002) señalan que durante la congelación se puede dar una oxidación de la leche, de modo que se incrementa el contenido de ácidos grasos libres y, por lo tanto, la acidez de la leche, en especial si la lipasa no fue inactivada previamente por tratamiento térmico. Con respecto a la oxidación de lípidos, es una de las causas principales del deterioro de grasas y aceites y conduce a la pérdida de calidad (Meshref et al., 2008).

En cuanto a las proteínas, la congelación puede alterar su estructura en la leche y el queso (Fontecha et al., 1993).

De acuerdo a algunos autores, la congelación como método de conservación no altera las características microbiológicas de la leche y el producto, e inmediatamente después del descongelado tiene una calidad similar a la leche de la que se originó (Benedet y Schwinden, 1991; Gomes et al., 1997). Sin embargo, la congelación puede tener efectos negativos sobre las células bacterianas (Alur y Greez, 1975). Vilhena et al. (2008) exponen que la congelación de la leche puede alterar la pared celular de las bacterias perjudicando su capacidad de multiplicación, no obstante puede haber aumentos aparentes en los recuentos provocados por la separación de los aglomerados de bacterias durante el almacenamiento. Benedet y Schwinden (1991) y Gomes et al. (1997) demostraron que la congelación de la leche de cabra pasteurizada hasta por 90 días no altera significativamente sus características microbiológicas.

A pesar de que a nivel mundial no hay muchos estudios, algunos países como Brasil aceptan la aplicación de una temperatura igual o inferior a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, la cual debe alcanzarse en el menor tiempo posible (MAPA, 2000).

En Uruguay hasta el momento de la realización de este trabajo no existía recomendación oficial que contemplara la conservación de leche caprina a través de congelación. A partir de los resultados obtenidos, el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en su resolución N° 27/011, reglamenta la congelación de leche caprina a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por el período de cinco meses (MGAP, 2011).

Este estudio se propone obtener resultados que avalen la conservación de leche caprina por medio de la congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante seis meses, sin que se afecte la estabilidad oxidativa ni la calidad composicional y microbiológica. Para cumplir con lo anterior se definieron los siguientes objetivos específicos:

Evaluar y comparar, con respecto a la leche caprina cruda, cómo afecta el tratamiento térmico (pasteurización) previo a la congelación a los diferentes parámetros de calidad y estabilidad.

Evaluar el efecto de dos métodos de descongelado sobre los parámetros de calidad y de estabilidad de la leche caprina.

Evaluar cómo afecta el tiempo de congelación los valores referentes a calidad y estabilidad de leche caprina cruda y pasteurizada.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron 35 cabras de la raza Saanen, las cuales se encuentran en el Parque de Actividades Agropecuarias (PAGRO), perteneciente a la Intendencia de Montevideo, localizado en la zona de Colón, Montevideo, Uruguay.

Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizaron muestreos para análisis fisicoquímicos y microbiológicos según la metodología descrita por la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF 50C:1995).

Se realizaron 6 muestreos con un intervalo de 7 días cada uno, del total del volumen producido en el ordeño matutino, en el momento en que los animales se encontraban en el pico de lactación. En cada muestreo y previa homogeneización se extrajeron 14 litros de leche del tanque, de los cuales 7 se envasaron como tal (leche cruda - LC), y los 7 restantes fueron sometidos a un proceso de pasteurización lenta LTLT ($63\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos) y se fraccionaron y envasaron como leche pasteurizada (LP). Luego del tratamiento térmico se utilizó la prueba de detección de la fosfatasa alcalina para verificar la efectividad del mismo. Antes de proceder a la congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ se extrajo una muestra de cada tipo de leche (LC y LP) y se le realizaron los análisis correspondientes al control de calidad. Estas muestras fueron consideradas como muestras control (t_0). Posteriormente se procedió a la congelación del resto de las muestras. La descongelación se llevó a cabo por medio de dos métodos: baño María (BM) y heladera (H). La descongelación en H se realizó durante 60 hs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la de BM durante 2,5 hs a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estos tiempos fueron determinados previamente para asegurar la completa descongelación así como para no favorecer el crecimiento de microorganismos mesófilos durante el tiempo que duraba la descongelación por este último método. A los 60, 120 y 180 días de congelación (t_1 , t_2 y t_3 , respectivamente) se procedió a realizar la descongelación por los métodos anteriormente nombrados (H y BM) de dos muestras de cada tipo de leche (LC y LP). Se obtuvieron las siguientes muestras: leche cruda baño María (LCBM), leche cruda heladera (LCH), leche pasteurizada baño María (LPBM) y leche pasteurizada heladera (LPH). Este ensayo se repitió 6 veces, constituyendo un total de 6 repeticiones (Tabla 1).

Frecuencia de análisis	LC	LP
t_0 : día 0	Previo a la congelación y pasteurización	Luego de pasteurizar y previo a la congelación
t_1 : 60 días	BM H	BM H
t_2 : 120 días	BM H	BM H
t_3 : 180 días	BM H	BM H

Tabla 1. Muestreos de leche con los distintos tratamientos (LCBM, LCH, LPBM y LPH) y los diferentes tiempos (t_0 , t_1 , t_2 y t_3).

Los recipientes en los que se envasó la leche para su posterior congelación fueron botellas cilíndricas, con capacidad de 1 litro, material: PET (Poliétileno Tereftalato) con tapa rosca (de dimensiones estándar: 80 mm de diámetro x 230 mm de altura). Previo al envasado se sometió a cada uno de ellos a un proceso de limpieza y desinfección. Para este último procedimiento se utilizó ácido peracético 0,2% por 30 min asegurando que el ácido tomara contacto con toda la superficie del recipiente. Finalizado este tiempo se descartó el contenido de este ácido.

Verificación de la pasteurización

La comprobación de la efectividad del proceso térmico se comprobó a través de la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (Silva et al., 1997), utilizando el kit comercial Phosphatase MI, MN®.

Análisis de composición y fisicoquímicos

Las muestras se analizaron en el laboratorio de calidad de leche del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche de Facultad de Veterinaria (UdelaR) y en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). A cada muestra se le realizaron análisis de composición: materia grasa, proteína, lactosa, sólidos no grasos (SNG), sales (cenizas) y densidad, utilizando un equipo denominado Lactomilk® marca Lactoscan, modelo SLP, origen Bulgaria. Dicho equipo se calibró utilizando los métodos de referencia para cada análisis (materia grasa: Gerber; proteína: Kjeldahl; SNG: gravimétricos). El equipo analizador de leche presenta para cada componente analizado la siguiente precisión: materia grasa: $\pm 0,06\%$; proteína: $\pm 0,15\%$; lactosa: $\pm 0,2\%$; SNG (sólidos no grasos): $\pm 0,15\%$; sales (cenizas): $\pm 0,05$; densidad: $\pm 0,3\text{kg/m}^3$.

Se realizó recuento de células somáticas (RCS) mediante la técnica de Breed, FIL 148A (Internacional Dairy Federation, 1995) determinación de acidez Dörnic (Pinto et al., 1998) y pH mediante método de evaluación potenciométrico, utilizando un modelo de electrodos denominado Oakton®.

Análisis microbiológicos

A cada muestra se le realizó análisis de recuento de mesófilos aerobios totales (RTMA), coliformes totales (CT) y *Staphylococcus coagulosa* positiva (ST) (APHA, 2001).

Determinación de la estabilidad oxidativa

Para evaluar la estabilidad oxidativa de la leche de cabra durante el almacenamiento se aplicó un método que utiliza condiciones de oxidación acelerada, temperaturas elevadas y presencia de oxígeno y aire en exceso, obteniendo resultados en períodos razonablemente cortos de tiempo.

El método de índice de estabilidad del aceite (OSI), también llamado Rancimat, permite medir la estabilidad oxidativa bajo condiciones estandarizadas (AOCS, 2009). El punto final es el correspondiente a un aumento repentino de ácidos volátiles generados a partir de las muestras de aceite calentado a alta temperatura bajo aireación constante. Estos compuestos se encuentran atrapados en agua y supervisados por electro-conductividad (Velasco et al., 2004).

Se midió la estabilidad oxidativa de la materia grasa de la leche. La extracción de la materia grasa se realizó según la norma ISO14156/IDF172 (2001). Luego se determinaron los tiempos de inducción a la oxidación en el Rancimat (873), a 110 °C, flujo de aire L7h, y toma de 2,5 g de muestra.

Análisis estadísticos

Las diferencias en los parámetros de calidad (composicional, fisicoquímicos y microbiológicos) obtenidas en los sucesivos muestreos para cada variable fueron analizadas estadísticamente mediante la prueba de análisis de varianza factorial en bloque, por parcelas divididas, con el programa INFOSTAT. Para determinar la diferencia entre los tiempos de congelado se realizó el Test de Tukey. Se consideran cambios significativos en cada variable cuando α sea $< 0,05$. Los resultados microbiológicos y recuento de células somáticas (ufc/ml y cel/ml, respectivamente) se expresaron en log en base 10 para normalizar su distribución.

Resultados

Se evaluaron los parámetros de composición, fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos al comparar los diferentes tratamientos: tratamiento térmico (LC y LP) y métodos de descongelado (BM y H), donde se obtuvieron los siguientes resultados expresados en las Tablas 2, 3 y 4.

	MG (%)	PROTEÍNA (%)	LACTOSA (%)	SNG (%)	Sales (%)
LP H	3,56 \pm 0,66 ^a	2,69 \pm 0,08 ^a	3,90 \pm 0,11 ^a	7,36 \pm 0,20 ^a	0,68 \pm 0,01 ^a
LP BM	3,61 \pm 0,67 ^{ab}	2,70 \pm 0,08 ^a	3,91 \pm 0,12 ^a	7,38 \pm 0,18 ^a	0,68 \pm 0,01 ^a
LC H	3,64 \pm 0,68 ^{ab}	2,69 \pm 0,08 ^a	3,90 \pm 0,11 ^a	7,36 \pm 0,20 ^a	0,68 \pm 0,01 ^a
LC BM	3,65 \pm 0,57 ^a	2,69 \pm 0,08 ^a	3,89 \pm 0,13 ^a	7,36 \pm 0,11 ^a	0,67 \pm 0,11 ^a

Tabla 2. Medias porcentuales de los valores de composición. Comparación entre los diferentes tratamientos (LPH, LPBM, LCH y LCBM) (n=18).

*Medias con letra igual no muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) *MG: materia grasa, SNG: sólidos no grasos.

	pH	Acidez (°D)	Densidad (g/ml)
LP H	6,63 \pm 0,10 ^a	14,25 \pm 0,20 ^a	1,028 \pm 0,01 ^a
LP BM	6,63 \pm 0,08 ^a	14,21 \pm 0,22 ^a	1,028 \pm 0,01 ^a
LC H	6,63 \pm 0,09 ^a	14,25 \pm 0,18 ^a	1,028 \pm 0,02 ^a
LC BM	6,63 \pm 0,08 ^a	14,42 \pm 0,21 ^a	1,028 \pm 0,01 ^a

Tabla 3. Valores medios de parámetros fisicoquímicos. Comparación entre los diferentes tratamientos (LPH, LPBM, LCH y LCBM) (n=18).

* Medias con letra igual no muestran diferencia significativa ($p < 0,05$).

	RMAT (ufc/ml)	CT (ufc/ml)	ST (ufc/ml)	RCS (cel/ml)
LP H	0,62 \pm 0,89 ^a	0,13 \pm 0,80 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	6,24 \pm 0,30 ^a
LP BM	0,85 \pm 0,40 ^a	0,07 \pm 0,75 ^a	0,00 \pm 0,00 ^a	6,24 \pm 0,28 ^a
LC H	3,95 \pm 0,25 ^b	1,83 \pm 0,68 ^b	1,58 \pm 0,10 ^b	6,15 \pm 0,40 ^a
LC BM	4,22 \pm 0,28 ^b	1,86 \pm 0,70 ^b	1,38 \pm 0,10 ^b	6,18 \pm 0,29 ^a

Tabla 4. Valores medios en Log₁₀ para los parámetros microbiológicos y RCS, comparación entre los diferentes tratamientos (LPH, LPBM, LCH y LCBM) (n=18).

* Medias con letra igual no muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) * RMAT: recuento de mesófilos aerobios totales; CT: coliformes totales; ST: *Staphylococcus coagulosa* positiva; RCS: recuento de células somáticas.

En las Tablas 5, 6 y 7 se observa la variación de los parámetros estudiados durante el tiempo de congelación (t0, t1, t2 y t3) para LC y LP.

	MG %		Proteína %		Lactosa %		SNG 16%		Sales %	
	LC	LP	LC	LP	LC	LP	LC	LP	LC	LP
t0	3,77±0,68 ^b	3,79±0,60 ^b	2,74±0,08 ^b	2,76±0,07 ^c	3,94±0,01 ^a	3,96±0,01 ^b	7,43±0,20 ^a	7,49±0,20 ^b	0,68±0,01 ^a	0,69±0,01 ^a
t1	3,61±0,70 ^a	3,49±0,68 ^a	2,69±0,07 ^{ab}	2,72±0,08 ^{bc}	3,92±0,01 ^a	3,96±0,01 ^b	7,37±0,21 ^a	7,46±0,18 ^b	0,68±0,01 ^a	0,68±0,01 ^a
t2	3,59±0,66 ^a	3,50±0,75 ^a	2,67±0,08 ^a	2,64±0,08 ^a	3,87±0,01 ^a	3,83±0,01 ^a	7,33±0,19 ^a	7,23±0,17 ^a	0,67±0,01 ^a	0,67±0,01 ^a
t3	3,63±0,72 ^a	3,56±0,76 ^a	2,67±0,07 ^a	2,67±0,08 ^{ab}	3,87±0,01 ^a	3,87±0,01 ^{ab}	7,30±0,18 ^a	7,31±0,20 ^{ab}	0,67±0,01 ^a	0,67±0,01 ^a

Tabla 5. Valores medios porcentuales de composición. Comparación entre los diferentes tiempos de congelación (t0, t1, t2 y t3) (n=6). *Medias con letra igual no muestran diferencia significativa (p<0,05) *MG: materia grasa, SNG: sólidos no grasos.

	pH		Acidez (°D)		Densidad (g/ml)	
	LC	LP	LC	LP	LC	LP
t0	6,65±0,09 ^b	6,62±0,08 ^b	14,17±0,20 ^a	14,50±0,22 ^c	1,028±0,00 ^a	1,028±0,0 ^a
t1	6,64±0,15 ^b	6,66±0,12 ^{bc}	14,50±0,25 ^a	14,42±0,25 ^a	1,028±0,00 ^a	1,028±0,01 ^a
t2	6,70±0,10 ^c	6,71±0,10 ^c	14,25±0,12 ^a	13,92±0,19 ^a	1,028±0,00 ^a	1,028±0,0 ^a
t3	6,53±0,10 ^a	6,54±0,0 ^a	14,42±0,22 ^a	14,08±0,23 ^a	1,028±0,00 ^a	1,028±0,0 ^a

Tabla 6. Valores medios de parámetros fisicoquímicos. Comparación entre los diferentes tiempos de congelación (t0, t1, t2 y t3) (n=6). * Medias con letra igual no muestran diferencia significativa (p<0,05).

	RMAT (ufc/ml)		CT (ufc/ml)		St (ufc/ml)		RCS (cel/ml)	
	LC	LP	LC	LP	LC	LP	LC	LP
t0	4,78±0,78 ^c	0,43±0,22 ^a	3,71±0,55 ^c	0,10±0,19 ^a	1,51±0,15 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	6,33±0,30 ^b	6,24±0,28 ^a
t1	4,15±0,67 ^b	0,69±0,20 ^a	2,04±0,48 ^b	0,08±0,15 ^a	1,53±0,12 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	6,16±0,40 ^{ab}	6,32±0,32 ^a
t2	3,74±0,89 ^a	0,80±0,60 ^a	0,61±0,55 ^a	0,08±0,20 ^a	1,79±0,09 ^b	0,00±0,00 ^a	6,21±0,32 ^{ab}	6,16±0,33 ^a
t3	3,69±0,85 ^a	0,41±0,30 ^a	1,03±0,20 ^a	0,12±0,18 ^a	1,08±0,10 ^a	0,00±0,00 ^a	5,97±0,22 ^a	6,24±0,22 ^a

Tabla 7. Valor medio en Log₁₀ de los parámetros microbiológicos y de RCS. Comparación entre los diferentes tiempos de congelación (t0, t1, t2 y t3) (n=6).

*Medias con letra igual no muestran diferencia significativa (p<=0,05) * RMAT: recuento de mesófilos aerobios totales; CT: coliformes totales; ST: *Staphylococcus* coagulasa positiva; RCS: recuento de células somáticas.

	Tiempo inducción (hs)			
	t0	t1	t2	t3
LP H	31±8 ^a	32±9 ^a	45±9 ^b	45±8 ^b
LP BM	31±8 ^a	31±9 ^a	45±9 ^b	44±8 ^b
LC H	32±10 ^a	31±8 ^a	47±9 ^b	44±9 ^b
LC BM	33±10 ^a	31±11 ^a	46±7 ^b	43±8 ^b

Tabla 8. Valores de estabilidad oxidativa en los diferentes tiempos de congelación (t0, t1, t2 y t3) y en los diferentes tratamientos (LPH, LPBM, LCH y LCBM) (n=6).

* Medias con letra igual no muestran diferencia significativa (p<0,05).

Discusión

Se evaluó efecto del tratamiento térmico (pasteurización) previo a la congelación en los diferentes parámetros de calidad. El objetivo principal de la pasteurización de la leche es la destrucción de bacterias patógenas, pero también la eliminación de los microorganismos saprófitos y la inactivación de ciertas enzimas que perjudican la calidad del producto (Egito et al., 1989).

La legislación brasileña permite para leche de cabra el uso de pasteurización rápida (72-75 °C por 15-20 seg) o lenta (62-65 °C por 30 min) (MAPA, 2000). En este trabajo la eficiencia de la pasteurización en la leche de cabra fue comprobada en base a la prueba de fosfatasa alcalina, constatándose siempre su ausencia, así como por la disminución en los recuentos microbiológicos. La ausencia de fosfatasa alcalina ha sido universalmente aceptada como evidencia de una eficiente pasteurización de la leche (Farias et al., 2000). Como puede observarse en la Tabla 4, con la pasteurización de la leche cruda a 63 °C por 30 minutos se logró disminuir el recuento inicial de mesófilos aerobios totales, el recuento de coliformes totales y la detección de *Staphylococcus* coagulosa positiva. La apropiada pasteurización de la leche quedó confirmada por la disminución de más de un 99% del recuento de aerobios mesófilos. Dependiendo de la intensidad del tratamiento térmico, el calentamiento puede provocar cambios en las propiedades fisicoquímicas de la leche, pero estos normalmente son insignificantes cuando la temperatura no excede los 60 °C (Walstra, 2001). Sin embargo, la leche de cabra tiene menor estabilidad térmica que la bovina (Jenness, 1980), lo que hace que con tratamientos térmicos de la misma intensidad se originen alteraciones diferentes en las leches de ambas especies (Vilhena et al., 2008).

La lactosa está sujeta a alteraciones durante el calentamiento de la leche, principalmente reacciones de Maillard, pero éstas ocurren a temperaturas superiores a 100 °C (Walstra, 2001), lo cual explica la ausencia de este efecto sobre la lactosa durante la pasteurización.

Al comparar LCBM con LPBM y LCH con LPH se observó que en cuanto a la calidad composicional, al igual que las propiedades fisicoquímicas y recuento de células somáticas, no se encontraron diferencias luego de la congelación (Tablas 2 y 3). Desde el punto de vista microbiológico sí se hallaron diferencias entre los diferentes tratamientos térmicos (Tabla 4), por lo que se deduce que es más adecuado pasteurizar la leche previa a la congelación, dado que se obtiene un producto con una menor carga bacteriana, disminuyendo el riesgo de que se produzcan alteraciones en la composición y propiedades fisicoquímicas causadas por microorganismos (González-Rodríguez, 1995).

En relación a los diferentes tratamientos utilizados para la descongelación de la leche, no se detectaron cambios en los parámetros relacionados a la calidad composicional ni a las propiedades fisicoquímicas entre los dos métodos estudiados (Tablas 2 y 3), por lo que no habría diferencias, en relación a las características estudiadas, a la hora de decidir por uno u otro método. Vilhena et al. (2008) observaron que utilizando la parte baja de la heladera a temperaturas entre 10-12 °C lograron un tiempo cercano a las 30 horas para el total descongelado de las muestras. En nuestro trabajo se observó que por el método H (4 °C) el tiempo de descongelado era de 60 hs, mientras que con el método BM el tiempo era de 2,5 hs. Por esto se tiende a pensar que el método H no sería recomendado para la descongelación de la leche, principalmente a escala industrial, en coincidencia con Vilhena et al. (2008).

A su vez, se evaluó el efecto del tiempo de congelación sobre los parámetros de calidad de la leche caprina cruda (LC) y pasteurizada (LP), ya que diversos autores sostienen que la congelación puede tener efectos adversos en la calidad de la leche (Needs, 1992). No obstante, Benedet y Carvalho (1996) proponen que este proceso de conservación no provoca grandes modificaciones en el sabor ni en el olor de la leche, aunque sí puede ocurrir una floculación de las proteínas, perjudicando la apariencia y aceptación del producto. Al evaluar los parámetros de composición algunos autores afirman que durante la congelación de la leche se producen procesos de lipólisis que

provocarían la disminución de los valores de materia grasa (Grappin, 1987). Otros autores sugieren que la disminución de la materia grasa durante la congelación se puede deber a la ruptura enzimática de los triacilglicéridos, junto con la actividad microbiana que se da durante el tiempo de almacenamiento en congelación (González-Rodríguez, 1995). En este trabajo se observó que los valores de materia grasa disminuyeron durante el tiempo de congelado tanto en la LC como en LP. Keenan (2003) afirma que las razones de la reducción del porcentaje de la grasa láctea durante el almacenamiento en congelación no están totalmente comprendidas, aunque es posible que los cristales que se forman durante la congelación puedan destruir los glóbulos de grasa.

En cuanto a las proteínas, Gomes et al. (1997) y Pereira (2000) obtuvieron valores entre 2,70% y 2,62% para leche pasteurizada congelada, los cuales coinciden con los encontrados en este estudio. Los agregados de caseína pueden ocurrir en la congelación de la leche, ya que la micela de caseína está fuertemente mineralizada y su grado de hidratación es bajo, lo que le confiere menor estabilidad térmica. La congelación contribuye a disociar la β -caseína de la micela interfiriendo en la estabilidad proteica. Este efecto ocurre intensamente en la leche de cabra y es probablemente ocasionado por la ausencia de la α -S1-caseína (Leach, 1980). Asimismo, la relación calcio-fósforo de la micela es más fuerte y su hidratación es menor, lo cual le da menor estabilidad térmica (Remeuf et al., 1989). La desagregación de la caseína dentro de la micela la hace especialmente susceptible a proteólisis (Fox, 1991). En esta investigación se observa en LC una leve disminución de las proteínas en el transcurso del tiempo, y en LP se registran diferencias a partir de los 120 días en comparación con el control ($t_0 \neq t_2$ y t_3) (Tabla 5). A pesar de que no se estudió la estabilidad de la micela de caseína, se podría considerar que la disminución en los porcentajes de proteína durante la congelación podría deberse a una menor estabilidad térmica de la proteína al someterla a las temperaturas de congelación (-18 °C). En cuanto a la apariencia de la leche una vez descongelada, Pereira (2000) constató que presentaba un aspecto floculado con disminución de la apariencia general. Lo mismo observaron Gomes et al. (1997), quienes atribuyeron esas características a modificaciones físicas de las proteínas, acentuadas por el congelamiento lento después de la pasteurización. En este estudio no se realizó evaluación sensorial del producto descongelado, pero sí se pudo advertir una declinación en la apariencia general de la leche.

La lactosa, SNG y sales en LC no presentaron diferencias en los distintos tiempos de congelado (Tabla 5). En el caso de la LP, la lactosa presenta una leve disminución a los 120 días, diferencias significativas entre t_0 y t_2 . En referencia a las sales (cenizas), los valores no presentaron diferencias a lo largo de la congelación. Zhang (2006) indica en su trabajo que los sólidos totales, proteínas y porcentajes de lactosa no se vieron afectados por el tiempo de almacenamiento o la temperatura de congelación.

En la Tabla 6 se muestran los parámetros fisicoquímicos para los diferentes tiempos de congelación. El pH en la LC no presentó variación al final del tiempo de congelación. En la LP este parámetro no evidencia diferencias en los primeros 60 días, pero hay diferencia a los 180 días, cuando disminuyó el valor ($t_0 \neq t_3$). Existen controversias al respecto del efecto de la congelación sobre el pH. Así, Dalles et al. (1984) señalaron que permanece inalterado, mientras que Alichanidis et al. (1981) reportaron un aumento del mismo. Durante la congelación, las propiedades fisicoquímicas generales no suelen variar mucho, a excepción de la acidez (Gómez et al., 1998). Guimaraes (1993) y Gomes et al. (1997) indican que la congelación y el almacenamiento de la leche durante una semana y hasta 60 días no alteraba la acidez de la leche. En este trabajo los parámetros de acidez y densidad no presentaron diferencias para LC y LP durante el almacenamiento en congelación en el período de 180 días. Pereira (2000) encontró para la variable densidad valores mínimos y máximos iguales a 1,022 y 1,032, respectivamente, y como media general 1,029 en leche pasteurizada descongelada, lo cual coincide con los valores obtenidos aquí.

En cuanto a los **parámetros microbiológicos**, Benedet y Schwinden (1991) plantearon que la congelación no altera las

características microbiológicas de la leche o sus productos y que luego de la descongelación presenta cualidades semejantes a la leche original. La congelación hasta por 90 días de la leche de cabra pasteurizada no altera significativamente sus características microbiológicas. En lo relativo al recuento de mesófilos que se muestra en la Tabla 7, se observó que con el tiempo de congelación sus valores disminuyen en LC. Esta misma tendencia no se mantiene para LP, en la que se evidencia que no existe diferencia en los 180 días que duró el ensayo. Lo que se observó con el RMAT en LC coincide con Le Jaouen (1987), quien indicó que los recuentos de mesófilos disminuyen entre 50 y 100 veces tras cierto tiempo en congelación.

En lo que refiere a los coliformes totales para LC, los recuentos disminuyen, lo cual coincide con la bibliografía referente al tema. En LP los datos muestran (Tabla 7), que no existió diferencia en los recuentos durante los 180 días que se evaluó el efecto de la congelación. Juárez et al. (1987) resaltan la mayor sensibilidad al frío de las bacterias Gram negativas que de las Gram positivas, debido a las diferencias en la estructura de su pared celular. La reducción en la viabilidad de *E. coli* fue demostrada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 semanas (Pankey et al., 1987). De la misma manera se encontró una reducción en el número de *E. coli* a las 4, 8 y 16 semanas después de congelada (Schukken et al., 1989). En referencia a los estafilococos hallados en leche congelada, Sánchez et al. (2003) reportaron un aumento en el recuento de *Staphylococcus coagulasa negativa* en los diferentes días de almacenamiento a -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La localización intracelular de los estafilococos y el daño causado a las células fagocitarias en la congelación pueden ser la explicación de este fenómeno (Schukken et al., 1989). Además, y apoyando esta teoría, es conocido que el RCS y el porcentaje de neutrófilos en leche caprina son más altos en comparación con la leche bovina (Paape et al., 1997). En esta investigación no se determinaron los *Staphylococcus coagulasa negativa*, los cuales siguen una variación similar a *Staphylococcus coagulasa positiva*, con respecto al cual en el caso de la LC existió variación únicamente entre los 120 y 180 días ($t_2 \neq t_3$). Hasta los 120 días se constató una tendencia creciente en el recuento y luego de 180 días de congelado disminuyó a valores como los obtenidos inicialmente. En la LP no hubo diferencia durante el período congelación, dado que no se encontró este microorganismo en la leche sometida a tratamiento térmico.

En lo vinculado a las células somáticas, no se evidenció aumento en LC ni en LP en los 180 días de congeladas las muestras (Tabla 7). Los investigadores que estudiaron los factores que afectan las células somáticas en leche de cabra (Zeng et al., 1999) indican que el almacenaje de la leche caprina a temperatura de refrigeración ($5 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) por tres días no afecta el recuento, y en relación a la congelación Horner et al. (1988) exponen que tampoco se modifica. Sánchez et al. (2005) encontraron que el rango de variación para el RCS ($p < 0.001$) fue mayor con el almacenaje a temperatura de refrigeración que en la congelación. Por otro lado, en la leche LC se evidencia claramente una disminución del RCS durante los 6 meses que duró la congelación. Esto puede deberse a que durante la misma se forman cristales de hielo que lesionan las células, coincidiendo con Lawrence (1999), quien estudió la congelación en leche humana (cruda) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y halló una disminución del contenido de células de la línea blanca (macrófagos y linfocitos).

En cuanto a la estabilidad a la oxidación de la leche de cabra en los 180 días de estudio, resulta en un aumento del tiempo de inducción luego de los 4 meses, lo que significa que la leche es más estable a la oxidación tanto a los 4 como a los 6 meses (Tabla 8). En ese sentido, la congelación desde el punto de vista oxidativo de la leche no cambia hasta los 4 meses y mejora luego de este periodo. A propósito de la estabilidad oxidativa, la leche de cabra puede ser congelada cruda o pasteurizada, ya que no presenta diferencia significativa en ambos tratamientos. El descongelamiento de la leche realizado por H o BM puede ser utilizado según conveniencia del productor, ya que no se encontraron diferencias estadísticas entre ellas.

Conclusión

La congelación de la leche caprina durante 6 meses no afectó su calidad en cuanto a los parámetros estudiados, por lo que este método de conservación podría ser una alternativa en establecimientos rurales para mantener un volumen de leche caprina continuo durante todo el año.

No se encontraron diferencias entre los métodos de descongelamiento estudiados, cuya elección se define de acuerdo a la realidad de cada productor y/o industria.

Se considera de importancia continuar los estudios en referencia a los efectos de la congelación de la leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos, dado que el 70% de la leche de cabra producida en el país se destina a la elaboración de estos productos.

Reconocimientos

Proyecto aprobado y financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) UdelaR 2009.

Agradecemos al equipo del laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Leche, Dr. Álvaro González, Lic. Sheila Giacaman y Lic. Karina Cal, por el apoyo en los análisis de laboratorio.

A la Profesora Adjunta Carmen Silvia Gallo Muniz, Encargada del área de inglés de Facultad de Veterinaria de UdelaR, por la corrección en la traducción del resumen al inglés.

A Roberto Silva del Departamento de Cereales, Oleaginosos y Productos Derivados del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

A Laura Olazabal del Departamento de desarrollo de métodos analíticos del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

Referencias

- ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, A.; TZANETAKIS, N.; VAFPOULOU. Teleme cheese from deep frozen curd. En: *Journal of Dairy Sci.* 1981, 64:732-739.
- ALUR, M.; GREEZ, N. Mechanism of injury of *Escherichia coli* by freezing and thawing. En: *Biochemical Biophysical Research Communication.* 1975, 62:308-312.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY (AOCS). *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.* 5th ed. Champaign: AOCS, 2009. Official Method Cd 12b-92.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of methods for microbiological examination of food.* 4ª ed. Washington: APHA, 2001. 676 p.
- ÁVILA, T. *Problemática de la leche en México* [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 2000. [Consulta: 5 de abril de 2009]. Disponible en: <http://www.cddhcu.gob.mx/camdip/comlvii/comeco/foro3/m%E9xico.htm>
- BARBERIS, S. *Bromatología de la leche.* San Luis: Hemisferio Sur, 2002. 228 p.
- BENEDET, H.; SCHWINDEN, E. Modificações físico-químicas e microbiológicas do leite de cabra, congelado e armazenado. En: *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 1991, 25(2):1-76.
- BENEDET, H.; CARVALHO, M. Caracterização do leite de cabra no Estado de Santa Catarina, Brasil. En: *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 1996, 16(2): 116-119.
- CARDOSO, W. Contagem de microorganismos. En: CARDOSO, W. *Análise microbiológica de alimentos.* Rio de Janeiro: Merk, 1985. pp. 20-27.
- CIAPPESONI, C. *La producción caprina en Uruguay y Latinoamérica* [En línea]. [s.l.]: [s.n.], 2006. [Consulta: 28 de setiembre de 2010]. Disponible en: <http://www.caphispana.com/mundo/uruguay/uruguay.htm>
- DALLES, T.; KALATZOPOULOS, G.; KAEHAGIAS, C. Freezing preservation of soft cheeses with and without mold form goat's and sheep's milk. Thermal processing and quality of foods. En: *Elsevier Applied Science Publishers.* 1984, 91:740-744.
- DE LA FUENTE, M.; REQUENA, T.; JUAREZ, M. Salt balance in ewe's and goat's milk during storage at chilling and freezing

- temperatures. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45(1):82-88.
- EGITO, A. Avaliação da pasteurização lenta do leite de cabra no controle de coliformes totais. En: *Boletim de Pesquisa do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos*. 1989, 12:12.
 - FARIAS, J.; GARCIA, A.; TOVAR, A. Eficacia de la pasteurización de la leche de cabra en una miniplanta procesadora de queso. En: *Revista científica, FCV-LUZ*. 2000, 10(2):119-123.
 - FONTECHA, J.; BELLANATO, J.; JUAREZ, M. Infrared and raman spectroscopic study of casein in cheese: effects of freezing and frozen storage. En: *Journal of Dairy Science*. 1993, 76:3303-3309.
 - FOX, P.; LAW, J. Enzymology of cheese ripening. En: *Food Biotechnology*. 1991, 5(3):239-262.
 - GOMES, M.; BONASSI, I.; ROÇA, R. Características químicas, microbiológicas e sensoriais de leite de cabra congelado. En: *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 1997, 17:111-114.
 - GÓMEZ, M.; BONSÁI, A.; ROCA, O. Chemical, microbiological and sensorial characteristics of frozen goat milk. En: *Ciência e Tecnologia de alimentos*. 1998, 17(2):111-114.
 - GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.; GONZALO, C.; SAN PRIMITIVO, F.; CARMENES, P. Relationship between somatic cell count and intramammary infection of the half under in dairy cows. En: *Journal of Dairy Sci*. 1995, 78: 2753-2759.
 - GRAPPIN, R. Application of indirect instrumental methods to the measurement of fat and protein content of goat and ewe milk. En: *International Dairy Federation Bulletin*. 1987, 208:41-43.
 - GUIMÁRAES, M. *Avaliação da estabilidade físico-química de leite caprino congelado durante a estocagem comercial*. Belo Horizonte: Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. (Tesis de Maestría).
 - HAENLEIN, G. *Milk and meat products*. [En línea]. [s.l.]: [s.n.], [2002]. [Consulta: 24 de octubre de 2010]. Disponible en: <http://goatconnection.com/articles/publish/article73.shtml>
 - HORNER, S.; FOX, L. Comparison of somatic cell counting procedures for goat milk. En: *Journal of Dairy Science*. 1988, 65:275-280.
 - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (Belgium). FIL 148A: *Milk enumeration of somatic cells*. Brussels: IDF, 1995.
 - INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION (Switzerland). ISO 14156/FIL 172: *Milk and milk products. Extraction methods for lipids and liposoluble compounds*. Geneve: ISO, 2001.
 - JUAREZ, M.; GOICOECHEA, A. Refrigeración y congelación de la leche y productos lácteos. En: *Alimentación Equipos y Tecnología*. 1987, 8(4):133-137.
 - KEENAN, T.; MATHER, I. Milk fat globule membrane. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2003, 3:1568-1576.
 - LAWRENCE, R. A. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. En: *Acta Paediatric*. 1999, 88:14-18.
 - LEACH, K. Trends in dairy goats. En: *Journal Dairy Science*. 1980, 63:1600-1604.
 - LE JAUOEN, J. La conservation du caillé. En: ECK, A. *Le Fromage. Technique et documentation*. Paris: Lavoisier, 1987. p. 41-53.
 - MESHREF, A.; AL-ROWAILY. effect of heating treatments, processing methods and refrigerated storage of milk and some dairy products on lipids oxidation. En: *Pakistan Journal of Nutrition*. 2008, 7(1):118-125.
 - MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. BRASIL. *Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. Instrução normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000* [En línea]. [Consulta: 26 de julio de 2009]. Disponible en: <http://www.agais.com/normas/leite/leitecabra.htm>
 - MGAP. *Manual para habilitación y refrendación de establecimientos productores de leche y queserías artesanales* [En línea]. Montevideo: MGAP, 2011. [Consultado el 22 de mayo de 2012]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DSA/D_ControlLacteos.htm
 - NEEDS, E. Effects of long-term deep-freeze storage on the condition of the fat in raw sheep's milk. En: *Journal Dairy Science*. 1992, 59:49-55.
 - PAAPE, M.; CAPUCO, A. Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. En: *Journal Animal Science*. 1997, 75:556-565.
 - PANKEY, J.; WADSWORTH, J.; METHA, K.; MURDOUGH, P. Effects of storage on viability of mastitis pathogens. En: *Journal Dairy Science*. 1987, 70 (suppl.1):132.
 - PEREIRA, V. *Avaliação da qualidade microbiológica e características físico-químicas do leite de cabra pasteurizado, congelado, comercializado na região Centro-Oeste do Estado de São Paulo*. San Pablo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2000.
 - PINTO, M.; VEGA, S.; LEON, S. *Métodos de análisis de la leche y derivados*. Valdivia: Ediciones Universidad Austral de Chile, 1998. 489 p.
 - REMEUF, F.; LENOIR, T.; DUBY, C. Étude des relations entre les caractéristiques physicochimiques des laits de chèvre et leur aptitude à la coagulation par la présure. En: *Lait*. 1989, 69:499-518.
 - SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; JIMÉNEZ, J.; LUENGO, C.; CORRALES, J.; FERNÁNDEZ, C. Effect of freezing goat milk samples on recovery of intramammary bacterial pathogens. En: *Veterinary Microbiology*. 2003, 94:71-77.
 - SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J.; MORALES, C.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. En: *Journal Dairy Science*. 2005, 88:3095-3100.
 - SCHUKKEN, Y.; SMIT, J.; GROMMERS, F.; VANDEGEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriological culturing of mastitis milk samples. En: *Journal Dairy Science*. 1989, 72:1900-1906.
 - SILVA, P.; PEREIRA, D.; OLIVEIRA, L.; COSTA JUNIOR, L. *Físico-Química do leite e derivados*. Minas Gerais: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda. Juiz de Fora, 1997.
 - VILHENA, P.; RESENDE DE SOUZA, M.; FREIRE, C.; FERREIRA, J. Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-embalagem e ao congelamento. En: *Ciencia Rural*. 2008, 38(5):1424-1430.
 - VELASCO, J.; ANDERSEN, M.L.; SKIBSTED, L.H. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. En: *Food Chemistry*. 2004, 85:623-632.
 - WALSTRA, P. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Madrid: Acribia, 2001. ISBN: 842000961X.
 - ZENG, S.; ESCOBAR, E.; HART, S.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell count in goat milk. En: *Small Ruminant Reserch*. 1999, 31:103-107.
 - ZHANG, R.; MUSTAFA, A.; NG-KWAI-HANG, K.; ZHAO X. Effects of freezing on composition and fatty acid profiles of sheep milk and cheese. En: *Small Ruminant Research*. 2006, 64:203-210.

ÍNDICE DE AUTORES

Barrios, Sofía; 39
Bellini, María Inés; 23
Bentancor, Lorena; 52
Borges, Alejandra; 52, 60
Cadenazzi, Mónica; 30
Cagno, Matías; 5
Cárdenas, Patricia; 5
Cardeza, Luciana; 39
Cardoso, Andrea; 5
Carro, Silvana; 52, 60
Constantino, Pablo; 13
Cousillas, Georgina; 60
Crosa, María José; 30
Cruz, Daniel; 52
Curia, Ana; 30
Curutchet, Ana; 30
Da Cunha, Jonathan; 23
Davyt, Danilo; 23
Dotta, Gabriela; 30
Edney, Michael J.; 44
Escobar, Daniela; 52, 60
Escudero, Jorge; 30
Fernández-Scavino, Ana; 23
Ferreyra, Verónica; 30
Fros, Carolina; 60
Gámbaro, Adriana; 39
Gatto, Francisco; 5
Gómez Guerrero, Blanca; 44
González, Silvana; 52, 60
Grille, Lucía; 52, 60
Lazzarini, Florencia; 60
Maidana, Fabianna; 30
Panuncio, Alicia; 39
Pinelli, Laura; 23
Quintero, Mariana; 39
Solé, María Laura; 39
Souto, Laura; 30

ÍNDICE TEMÁTICO

A

Absorbancia; 45, 46, 47, 48, 49, 51
Acidez; 32, 52, 53, 54, 57, 60, 61, 62, 64
Ácido cianúrico; 24, 26
Ácidos grasos; 30, 31, 32, 34, 35, 37, 39, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 61
Ácidos grasos libres; 30, 31, 32, 35, 61
Actividad endo-proteolítica; 44
Actividad ureásica; 30, 32, 33
Actividad ureásica en soja, 31, 33
Aguas; 23 - 29
Aminoácidos; 44, 57
Aspartic endopeptidasas; 45
Atrazina; 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
Avena; 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37

B

Bacterias; 24, 25, 26, 27, 28, 53, 56, 60, 61, 64, 65
Biodegradación; 23, 25, 27
Biorremediación; 23, 24, 28

C

Calibración; 15, 19, 20, 46, 48, 50, 51
Calidad; 15, 16, 24, 31, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 64, 65
Cebada; 44, 45, 46, 50, 51
Células somáticas; 52, 53, 54, 56, 60, 62, 63, 64, 65
Cisteín endopeptidasas; 45
Coliformes; 52, 54, 56, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66
Coliformes termotolerantes; 61
Congelación; 60, 61, 62, 63, 64, 65
Conservación; 58, 60, 61, 64, 65
Contracción; 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12

D

Degradación lipídica; 31, 32, 34, 35, 36, 39
Delphi; 13, 14, 15, 22
Densidad; 5, 12, 13, 18, 19, 20, 52, 54, 57, 60, 62, 64
Desetilhidroxiatrazina; 24, 26
Desisopropilhidroxiatrazina; 24, 26
Desorción; 5, 7, 11, 27, 28

E

Endoesperma; 44, 45
Endopeptidasas; 44, 45
Enzimas; 28, 31, 43, 44, 45, 48, 49, 51, 53, 64
Eucalipto colorado (Eucalyptus Tereticornis Smith); 5
Evaluación sensorial; 31, 32, 39, 40, 41, 42, 64
Exopeptidasas; 44, 45
Extracción enzimática; 45, 46
Extrusión; 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37

F

Fibra; 6, 30, 31, 32, 42, 56

Forestales; 5 - 12

G

Granulometría; 31, 32, 33
Gum; 5, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22

H

Hamburguesas; 39, 40, 41, 42
Harina; 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37
Hidrólisis; 30, 32, 34, 44, 45, 53
Hidroxiatrazina; 24, 26
Hinchamiento; 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
Humedad; 5, 7, 8, 9, 10, 11, 19, 30, 31, 32, 34, 35, 37, 40, 42

I

Incertidumbre; 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22
Isoterma; 5, 11, 12
Isoterma higroscópica; 5, 8, 11

L

Lactosa; 52, 53, 54, 56, 60, 62, 64
Leche caprina; 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 60, 61, 64, 65
Leche cruda; 53, 56, 58, 60, 61, 64
Leche pasteurizada; 60, 61, 64, 65

M

Madera; 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12
Magnitud; 14, 15, 16, 19, 20, 22, 57
Malta; 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51
Materia grasa; 31, 32, 33, 37, 54, 56, 57, 60, 62, 64,
Merluza; 39, 40, 42
Mesófilos aerobios; 52, 53, 54, 60, 62, 63, 64
Metabolitos; 23, 24, 25, 26
Metaloproteinas; 45
Método isocrático; 23, 24, 25, 28
Metrología; 13 - 22
Microorganismos; 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 56, 61, 64, 65
Minerales; 25, 30, 56
Monte Carlo; 13, 14, 16, 18, 20, 22

N

Nitrógeno amínico; 44, 46, 51

O

Oxidación; 30, 31, 32, 35, 36, 60, 61, 62, 65

P

Péptidos; 44, 45

Pescado; 39, 40, 42, 43

Peso; 5, 6, 7, 8, 11, 20, 30, 32, 40, 44, 53

pH; 23, 24, 25, 26, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54, 57, 60,
62, 64

Plantas potabilizadoras; 23, 24, 25, 28

Proteínas; 31, 40, 42, 44, 45, 53, 56, 60, 61, 64

Q

Queso; 40, 52, 53, 60, 61, 65, 66

S

Saanen; 52, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61

Salvado; 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37

Serín endoproteasas; 45

Software; 13, 21, 22, 41

Soja; 23, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 37

Sorción; 7, 11

Sorgo; 30, 31, 32, 33, 35, 36

Staphylococcus coagulasa positiva; 52, 54, 56, 60, 61, 62, 63, 64, 65

Sustrato azocaseína; 46, 47, 48, 51

Sustrato azogelatina; 45, 47, 51

T

Tecnología alimentaria; 30 - 66

Textura; 30, 37, 39, 40, 41, 42

Tolerancia; 17, 18, 19, 20, 21, 22

Transglutaminasa microbiana; 39, 40, 42

U

Uruguay; 3, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 23, 25, 28, 30, 39, 42, 44, 52, 53, 54, 56,
57, 60, 61, 62, 65

V

Vitaminas; 25, 30, 31

INNOTEC

REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY



ISO 9001:2008
NRO. 15367



ISO 9001:2008
NRO. 15367



LATU, Centro de Información Técnica
Avda. Italia 8201, entrepiso, Montevideo - Uruguay
Tel. +(598) 2601 3724 Int. 1360
ditec@latu.org.uy
<http://www.latu.org.uy>
<http://ojs.latu.org.uy>
<http://chein.blogspot.com>