

EQUIPO EDITORIAL**Dirección****Dr. Jorge Silveira**

Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

CONSEJO EDITORIAL**Dra. Sofía Barrios**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay**MBA. Ing. Mariela De Giuda**Gerente de Tecnología y Gestión, Laboratorio Tecnológico
del Uruguay (LATU), Uruguay**Dr. Andrés Dieste**Universidad de la República (UdelaR), Facultad de
Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay**Dr. Gustavo Domínguez**

Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dra. Gabriela EgurenUniversidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay**PhD. Federico Harte**Profesor adjunto de Food Science, Penn State University,
Estados Unidos**MSc. Rosa Márquez**

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo MéndezUniversidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias,
Instituto de Química Biológica, Uruguay**PhD. Laura Moya Silva**

Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez

INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel VolpeGerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio
Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay**EDICIÓN****Carla Rizzotto**Edición técnica revista INNOTEC, Centro de Información Técnica,
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay**ADMINISTRACIÓN DE OJS Y GESTIÓN DE INFORMACIÓN****Lic. Lorena Fiori**

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

IMPLEMENTACIÓN, HOSTING Y SOPORTE DE OJS

Luis Ramírez Caldas

Bibliolatino

DISEÑO Y ARMADO

Manosanta desarrollo editorial

<https://manosanta.com.uy/>

ACERCA DE INNOTEC

INNOTEC es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

Editada en Montevideo (Uruguay), bajo la modalidad de publicación continua, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

El objetivo de la revista es la divulgación y transferencia del conocimiento en las áreas de Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria. INNOTEC está dirigida a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: DOAJ, EBSCOhost Academica Premier, Latindex, Redalyc y REDIB.



Somos miembros de:

Asociación Uruguaya de Revistas Académicas AURA



La colección completa se puede consultar en línea en <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Los conceptos y opiniones vertidas en los artículos aquí publicados, así como el uso que otros puedan hacer de ellos, son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan el punto de vista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

INNOTEC - NÚMERO 26

Julio-diciembre de 2023

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724,

internos 1314 y 1350

innotec@latu.org.uy

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

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

En esta edición se incluye el artículo "Maximizando el valor nutricional: reutilización de un subproducto de la industria arroceras en alimentos saludables", basado en un e-Poster presentado en INNOVA 2023, el 11º Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, que se llevó adelante del 27 al 29 de setiembre de 2023, en el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

SUMARIO

Artículos

- e643 **Control de calidad preliminar de hierbas *in natura* comercializadas en Uruguay. Casos de estudio: manzanilla, marcela y tilo**
Preliminary quality control of *in natura* herbs in the Uruguayan market. Case studies: chamomile, marcela and linden
Rossina Figliolo, Natalia Besil, Claudia Da Luz-Graña, Gastón Martínez, Guzmán Porley, Ignacio Mígues Borghini, Verónica Cesio, Horacio Heinzen
- e646 **Maximizando el valor nutricional: reutilización de un subproducto de la industria arroceras en alimentos saludables**
Maximizing nutritional value: reuse of a by-product of the rice industry into healthy food
Milagros Mutuberría, Virginia Larrosa, Belén Giménez, Natalia Graiver
- e639 **Caracterización de la actividad proteolítica de extractos semipurificados de *Vigna unguiculata***
Characterization of the proteolytic activity of semipurified extracts from *Vigna unguiculata*
Luis Ojeda-Ojeda, Oscar Montaner, Roger Duran, Alexia Torres, Joselyn Díaz Revetti, Nirza Noguera-Machado
- e636 **Optimización del comportamiento reológico de una bebida láctea a base de lactosuero formulada con distintos hidrocoloides**
Optimization of rheological behavior of a whey-based milky drink formulated with different hydrocolloids
Lorenzo Iván Leurino Kling, Sergio Darío Rozycki, Juan Diego Cortez Latorre
- e637 **Utility of DNA barcodes in the identification of melliferous plants associated with *Sabal yapa* honey from eastern Yucatan, Mexico**
Utilidad de los códigos de barras de DNA en la identificación de plantas melíferas asociadas a la miel monofloral de *Sabal yapa* producida en el este de Yucatán, México
Kelly Cristina Durán Escalante, Juan Javier Ortiz Díaz, Juan Pablo Pinzón Esquivel, María Amanda Gálvez Mariscal
- e642 **Prospección, aislamiento y evaluación del potencial de hongos nativos acaropatogénicos en el control de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay**
Prospecting, isolation, and evaluation of the potential of native acaropathogenic fungi in the control of *Rhipicephalus microplus* in Uruguay
Alda Rodríguez Dos Santos
- e641 **Comparación interlaboratorio para medición de masa convencional en cinco laboratorios: aportes a la infraestructura de la calidad en Panamá y República Dominicana**
Interlaboratory comparison for conventional mass measurement in five laboratories: contributions to the quality infrastructure in Panama and the Dominican Republic
Saúl García Tovar, David Sing, Magalys D'Oleo, Epifanía de Rotar, Margarita Abraham, Julio Dimas, José Alejandro López

POLÍTICA EDITORIAL DEL 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 del 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 del LATU a través del correo electrónico innotec@latu.org.uy para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

CÓDIGO ÉTICO DE INNOTEC

La revista INNOTEC adhiere a los principios publicados por COPE (Committee on Publication Ethics) en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct> y promueve así la conducta ética de todos los participantes del proceso editorial: autores, revisores y equipo editorial.

Los autores se comprometen a:

- Enviar artículos originales, de su autoría y que no infrinjan derechos de propiedad intelectual y/o derecho de imagen y/o de datos personales de terceros, e inéditos, que no hayan sido presentados simultáneamente a otra publicación.
- Asegurar la veracidad de los datos presentados en su investigación.
- Asegurar la integridad de su investigación, evitando la publicación de resultados parciales.
- Consignar a los autores en base al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

Los revisores se comprometen a:

- Declarar que no existe conflictos de interés para la evaluación de un artículo.
- Realizar su evaluación respondiendo a criterios objetivos y respetando su independencia académica.
- Asegurar la confidencialidad tanto del contenido del artículo como del resultado de su evaluación.
- Preservar el anonimato en todo el proceso, apelando al editor como intermediario de cualquier comunicación con los autores.
- Respetar los tiempos acordados con los editores de la revista para la realización de su trabajo.

El equipo editorial se compromete a:

- Asegurar la honestidad y transparencia de todo el proceso editorial, desde la presentación del artículo, evaluación por pares y publicación en las condiciones pautadas.
- Seleccionar los revisores idóneos para cada trabajo.
- Garantizar la independencia de criterio de los revisores en el ejercicio de su rol.
- Asegurar el anonimato de todas las partes involucradas en el proceso de arbitraje por pares.
- Mediar en posibles conflictos de interés con el apoyo del consejo editorial.
- Velar por el cumplimiento de los plazos acordados en cada fase del proceso.
- Difundir los números publicados en las redes académicas y bases bibliográficas de su entorno local y regional.
- Controlar el cumplimiento de los requisitos por parte de los autores y la actuación acorde de los árbitros.
- Identificar casos de incumplimiento de los compromisos éticos enumerados en este código y penalizar a sus responsables con sanciones que van de la suspensión del infractor en su rol en el proceso editorial a la difusión de una rectificación pública y la remoción del artículo.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA PUBLICAR EN INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

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

Esta publicación semestral arbitrada por un comité de revisores externos recopila las investigaciones realizadas 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.

INNOTEC no cobra cargos de ningún tipo por el envío de originales ni por su procesamiento.

El tiempo estimado para los procesos de evaluación y publicación es de 18 semanas.

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, independientes y externos, 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 OJS y se distribuyen bajo la modalidad de acceso abierto. Los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 4.0 Unported. Al ingresar al sistema <https://ojs.latu.org.uy/inicio/> 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.

Los autores están autorizados a realizar una publicación simultánea en sistemas de autoarchivo o repositorios institucionales.

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 electrónico de referencia innotec@latu.org.uy.

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

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

DEFINICIONES:

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

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, es neutro e informativo.

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

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

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

Resultados. Presentación y expresión de los hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

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

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

Referencias. Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

LOS ARTÍCULOS DEBEN PRESENTAR:

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

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. Los autores deberán contar con un número de registro en ORCID, que se consigna en OJS al ingresar los autores en metadatos. Para más información sobre ORCID y su relevancia para los autores puede consultar esta página: <https://orcid.org/>.

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

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

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras e imágenes, (ver sección Estilo y formato de citas y referencias en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato.doc, de cualquier versión de Microsoft Word. Evitar las notas al pie en el desarrollo del artículo. Las denominaciones en latín deben ir en cursiva.

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

Fórmulas, figuras, tablas 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 superior 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).

ESTILO DE CITAS Y REFERENCIAS SEGÚN EL SISTEMA HARVARD

Si el texto está en inglés utilizar «and» en lugar de «y», «In:» en lugar de «En:», «[Accessed: day month year]» en lugar de «[Consulta: día mes año]» y «Available at:» en lugar de «Disponible en:»

Ejemplos usuales de citas

Registro de citas textuales

(López, 1985, p. 93)

(González y Rubio, 1990, pp. 110-111)

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

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

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

(Alonso, 1988b, p. 84)

Registro de cita ideológica o paráfrasis

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

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

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez et al., 2011)

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

Ejemplos usuales de referencias monografías (libros)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. *Título del libro en cursiva*. N° de edición.

Lugar de edición: editorial. (Serie; N°). ISBN (Este último si se posee) DOI (siempre que el libro lo posea)

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

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

Revistas como un todo

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

Boletín Económico. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979- . ISSN: 0210-3737.

Artículos de revistas

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: *Título de la publicación seriada*, Volumen (Número), páginas. DOI (siempre que el artículo lo posea).

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: *IEEE Transactions on computers*, 47(6), pp. 625-638. DOI: 10.1109/12.689643

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

Normas

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

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

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

Textos electrónicos, bases de datos y programas informáticos

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

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

Patentes

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. *Denominación del elemento patentado*. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. *Cereal flake with topical pieces*. United State Patent. 0101. D572,427.

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

Control de calidad preliminar de hierbas *in natura* comercializadas en Uruguay. Casos de estudio: manzanilla, marcela y tilo

Preliminary quality control of *in natura* herbs in the Uruguayan market. Case studies: chamomile, marcela and linden

Controle preliminar da qualidade de ervas *in natura* comercializadas no Uruguai. Casos de estudo: camomila, macela e tília

ID ROSSINA FIGLIOLO (1)(5)

ID NATALIA BESIL (5)

ID CLAUDIA DA LUZ-GRAÑA (2)(4)

ID GASTÓN MARTÍNEZ (2)

ID GUZMÁN PORLEY (3)

ID IGNACIO MIGUES BORGHINI (3)

ID VERÓNICA CESIO (3)(6)

ID HORACIO HEINZEN (3)(5)

- (1) Programa de Posgrado en Química, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- (2) Laboratorio de Botánica, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- (3) Farmacognosia y Productos Naturales, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- (4) Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas y Laboratorio de Fitotecnia. Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- (5) Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT), Departamento de Química del Litoral, CenUR Litoral Norte, Universidad de la República. Paysandú, Uruguay.
- (6) PDU Abordaje Holístico al estudio del impacto de pesticidas en alimentos y en el ambiente, CenUR Litoral Norte, Universidad de la República. Paysandú, Uruguay.

RECIBIDO: 11/10/2023 → APROBADO: 5/12/2023 ✉ heinzen@fq.edu.uy

RESUMEN

Este trabajo presenta un estudio primario de la adecuación de hierbas *in natura* expendidas en Uruguay a la reglamentación vigente del Ministerio de Salud Pública.

Se seleccionaron tres hierbas consumidas por la población: *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla), *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. (marcela) y *Tilia* spp. (tilo). Se adquirieron muestras en lugares de expendio oficiales, farmacias y droguerías, considerando distintos lotes de diferentes proveedores. Se estudió el ajuste a la rotulación, se comparó la cantidad de masa del material vegetal declarada con el contenido de la parte botánica de la planta, y de la droga vegetal, que tiene actividad farmacológica. Los resultados muestran una gran dispersión de datos y falta de cumplimiento de la regulación en muchos casos. En particular, la cantidad de droga, presencia de material extraña y, en el caso del tilo, especies que no se corresponden con la droga medicinal. Este estudio preliminar muestra la necesidad de formar profesionales especializados, tanto en el sector privado como en el regulatorio en Uruguay, con el objetivo de garantizar la eficacia y seguridad de los productos herbarios en el mercado.

Palabras clave: control de calidad, hierbas medicinales, *Matricaria chamomilla* L., *Tilia* spp., *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC.

ABSTRACT

A primary study on the adjustment of *in natura* herbs sold in Uruguay according to the current regulations of the Ministry of Public Health is presented. Three herbs usually consumed by the population were selected for this task: *Matricaria chamomilla* L. (Chamomile), *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. (Marcela) and *Tilia* spp. (Linden). The studied samples were acquired at authorized retail locations, choosing different lots from different suppliers. The label compliance for each of them was studied. The declared amount of plant material weight was compared with the content of the corresponding botanical part of the plant with reported pharmacological activity (drug). The results showed a great data dispersion and the non-compliance of the regulations in many cases. Particularly, the amount of drug in each package, the presence of foreign material, and, in the case of linden, the presence of non-medicinal *Tilia* species. This preliminary study shows the need to build specialized human resources in Uruguay, in the private and regulatory sector, aiming to ensure the efficacy and safety of these type of products in the market.

Keywords: quality control, medicinal herbs, *Matricaria chamomilla* L., *Tilia* spp., *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC.

RESUMO

É apresentado um estudo primário sobre a adaptação de ervas *in natura* às regulamentações vigentes pelo Ministério da Saúde Pública do Uruguai. Foram selecionadas três ervas consumidas pela população: *Matricaria chamomilla* L. (camomila), *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. (macela) y *Tilia* spp. (tília). As amostras foram adquiridas em pontos de venda, considerando diferentes lotes de diferentes fornecedores. Foi estudado o ajuste da rotulagem, a quantidade declarada de massa do material vegetal foi comparada com o conteúdo da parte botânica da planta, a droga vegetal, que possui atividade farmacológica. Os resultados mostram grande dispersão

de dados, presença de materiais estranhos e, no caso da tília, espécies que não são a droga vegetal. Este estudo preliminar mostra a necessidade de formar profissionais especializados tanto no setor privado como no setor regulatório no Uruguai, com o objetivo de garantir a eficácia e segurança dos produtos fitoterápicos no mercado.

Palavras-chave: controle de qualidade, ervas medicinais, *Matricaria chamomilla* L., *Tilia* spp., *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas enteras o partes de plantas para tratar heridas o dolencias se conoce como medicina herbaria (Winslow y Kroll, 1998). Durante siglos, numerosos hogares y comunidades han acudido a la medicina tradicional y complementaria. Este recurso integral para la salud, que se encuentra en la frontera entre la medicina y la ciencia, ha sentado las bases de los textos médicos clásicos (Organización Mundial de la Salud, 2023). Se estima que cuatro mil millones de personas, es decir el 80 % de la población mundial, dependen de productos medicinales a base de hierbas como fuente primaria de atención médica (Organización Mundial de la Salud, 2002). Una característica básica de las medicinas tradicionales es su fuerte y necesaria vinculación con lo cultural del ser, tanto individual como social-grupal (Aparicio Mena, 2005). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido directrices para evaluar la calidad, seguridad y eficacia de las medicinas a base de hierbas, siendo las normas que garantizan no solo la buena práctica agrícola y recolectora de plantas medicinales previo a su comercialización sino también el análisis para evaluar su calidad (Organización Mundial de la Salud, 2003).

En Uruguay, en los últimos años se ha incrementado notoriamente el consumo de plantas medicinales (Pereyra, 2021). Un informe del año 2003 revela que casi la mitad de la población de Uruguay consume hierbas medicinales (HM) (Queirós, 2010). Debido a esto, hay muchos estudios químicos y farmacológicos en estas áreas desde hace varios años (Alonso et al., 2005).

El amplio uso de HM se atribuye a su accesibilidad y asequibilidad, siendo en muchos casos la única fuente para la atención de pacientes de menores recursos o alejados de los centros de salud (Queirós, 2010). Esta práctica forma parte del acervo cultural de las diferentes sociedades y su permanencia en el tiempo permite comprender tradiciones que han permanecido hasta la actualidad. En Uruguay es más común hablar de medicina popular que de medicina tradicional, debido a que la sociedad uruguaya se forjó en base a una fusión de diferentes culturas, sin una clara identificación tradicional (Tabakián, 2016). Alonso et al. (2005) señalan que Uruguay es uno de los pocos países de economías periféricas donde prima la medicina alopática o científica sobre la medicina tradicional; incluso muchas veces el término "tradicional" es incorrectamente asociado con la medicina científica.

El Decreto 403/016 del Ministerio de Salud Pública del Uruguay (MSP) (Uruguay, 2016) es el marco regulatorio de las hierbas medicinales, especialidades vegetales y medicamentos fitoterápicos, el cual clasifica los diferentes productos a base de plantas medicinales recolectadas siguiendo las buenas prácticas de cultivo y recolección, desde las plantas hasta sus derivados, ya sea hierbas *in natura*, así como aquellas a ser

utilizadas en una especialidad fitoterápica. Se establece como único identificador de la especie medicinal el nombre científico en latín. El nombre científico permite comparar los datos de la zona con la bibliografía internacional (Kroeger y Luna, 1992) y es crítico para un adecuado control de los materiales de partida y garantizar la reproducibilidad de las propiedades farmacológicas de las especialidades a base de hierbas (Kunle et al., 2012).

También se establece la definición de los procesos de fabricación y otros relacionados, como las condiciones y requisitos específicos para su comercialización. A su vez presenta una lista de hierbas cuya comercialización como HM se encuentra prohibida. La normativa indica las farmacopeas y bases bibliográficas aceptadas para el control de calidad pertinente según el caso. Para las drogas vegetales, es necesaria la identificación botánica inequívoca, controles fisicoquímicos de inocuidad, calidad y, cuando es posible, el contenido de principios activos.

La identificación macroscópica de las drogas vegetales, cuando se encuentran enteras, se basa en la forma, el tamaño, el color, la superficie, la textura, la fractura y la apariencia de la superficie de fractura. Debido a que tales observaciones son subjetivas podrían existir adulterantes muy parecidos, por lo que es imperante realizar al mismo tiempo los análisis botánicos macro y microscópicos, así como fisicoquímicos de la muestra (Uruguay, 2018). Las farmacopeas definen botánicamente la especie medicinal, lo que es clave para identificar correctamente la droga vegetal de forma inequívoca, por lo tanto, cualquier otra especie que no esté contemplada en ella se considera una especie no medicinal o adulterante (Organización Mundial de la Salud, 1998).

En el presente trabajo se evaluó el cumplimiento de los requisitos de rotulación, contenido de material vegetal real *versus* contenido declarado, identificación botánica, contenido de droga vegetal *versus* contenido de material total y contenido de humedad de las drogas vegetales de manzanilla alemana, marcela y tilo *in natura* comercializadas en paquetes, variando proveedores y lotes, obtenidas al azar en diversos puntos de venta al público.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La selección de las hierbas a estudiar se basó en la información recabada a nivel nacional mediante encuestas realizadas durante el segundo semestre de 2020 y dirigidas a herboristerías, establecimientos comerciales (“almacén de yuyos”) y laboratorios fitoterápicos (Figliolo et al., 2021). De 35 establecimientos consultados ubicados en la capital del país, 19 aportaron información relevante para concluir (luego de un análisis de frecuencia) que la manzanilla, la marcela, la malva y el tilo eran las hierbas medicinales más consumidas por la población uruguaya hasta ese momento (Tabla 1). Es importante destacar que el relevamiento se realizó en el segundo semestre del año 2020, durante la emergencia sanitaria SARS-CoV-2 (COVID-19), limitando el acceso a un mayor volumen de información recabada. Debido a la disponibilidad de recursos es que se comienza el estudio investigativo con manzanilla alemana, marcela y tilo *in natura* comercializadas en nuestro país.

TABLA 1. Hierbas medicinales *in natura* más vendidas según relevamiento.

N°	Nombre vulgar	Nombres científicos aceptados y actualizados
1	Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i> L.
2	Marcela	<i>Achyrocline saturejoides</i> (Lam.) DC., <i>A. flaccida</i> (Weinm.) DC., <i>A. alata</i> (Kunth) DC.
3	Malva	<i>Malva sylvestris</i> L., <i>M. neglecta</i> Wallr.
4	Tilo	<i>Tilia cordata</i> Mill., <i>T. platyphyllos</i> Scop., <i>T. europaea</i> L.*

*sinónimo: *T. × vulgaris* Hayne.

El material vegetal fue adquirido en el mercado local al azar en diferentes puntos de venta, considerando la variabilidad en lotes y proveedores, tal como se especifica en la Tabla 2.

TABLA 2. Esquema de muestreo para manzanilla alemana, marcela y tilo. En cada caso, se toman 2 lotes diferentes ($m = 5$) de cada proveedor, realizando un total de 50 muestras por hierba medicinal.

Proveedor A		Proveedor B		Proveedor C		Proveedor D		Proveedor E	
Lote A1	Lote A2	Lote B1	Lote B2	Lote C1	Lote C2	Lote D1	Lote D2	Lote E1	Lote E2
A1-1	A2-1	B1-1	B2-1	C1-1	C2-1	D1-1	D2-1	E1-1	E2-1
A1-2	A2-2	B1-2	B2-2	C1-2	C2-2	D1-2	D2-2	E1-2	E2-2
A1-3	A2-3	B1-3	B2-3	C1-3	C2-3	D1-3	D2-3	E1-3	E2-3
A1-4	A2-4	B1-4	B2-4	C1-4	C2-4	D1-4	D2-4	E1-4	E2-4
A1-5	A2-5	B1-5	B2-5	C1-5	C2-5	D1-5	D2-5	E1-5	E2-5

La forma de presentación de las hierbas *in natura* varió entre 10-30 g.

Las 150 muestras adquiridas en el mercado uruguayo fueron acondicionadas individualmente en recipientes de plástico debidamente identificados manteniendo la trazabilidad, protegidos de la luz y de la humedad ambiente para garantizar su adecuada conservación.

Instrumentos y reactivos

Se utilizaron balanzas analíticas Shimadzu (Modelo AUX 220 Uni Bloc, Kyoto-Japón), y KERN & Sohn GmbH ABJ (ABJ 220-4M, Balingen-Frommern Alemania), Lupa binocular Motic (SMZ-140, China), termobalanza Shimadzu (MOC63U, Uni Bloc, Kyoto-Japón), microscopios ópticos (Labomed binocular CXL, USA; y C&A Scientific, USA), porta y cubreobjetos ESCO 100 (Eric Scientific Company, USA), y pinzas de acero inoxidable (Stainless Steel). La solución diafanizante de lactofenol se preparó según D'Ambrogio de Argüeso (1986).

Controles primarios de calidad evaluados

A continuación, se describen los controles que se les realizaron a cada una de las hierbas obtenidas.

Requisitos de rotulación

Se analizó el cumplimiento de los requisitos de rotulación de cada paquete, donde se incluyen 11 ítems para tener en cuenta en la rotulación del acondicionamiento primario de las hierbas medicinales a comercializar, según lo define el artículo 7 del Decreto 403/2016 (Uruguay, 2016):

- a. Nombre de la hierba medicinal: nombre científico seguido, entre paréntesis, del nombre común.
- b. Nombre del director técnico.
- c. Datos de la empresa (nombre de herboristería, N° de registro, dirección, teléfono).
- d. Lote y fecha de vencimiento.
- e. Condiciones de almacenamiento.
- f. Acción farmacológica de uso tradicional reconocido en nuestro país.
- g. "NO SE RECOMIENDA SU USO PROLONGADO", cuando corresponda.
- h. NO INGERIR o Uso Externo u otra advertencia, cuando corresponda.
- i. Indicar que no se ha demostrado la inocuidad de este producto para los grupos vulnerables (embarazadas, lactancia, niños, ancianos u otro grupo vulnerable si correspondiera, indicando cuál o cuáles).
- j. "Mantener alejado de los niños".
- k. Indicar cualquier otra advertencia que corresponda.

Se analizan los 10 primeros ítems, dado que el ítem k depende de cada hierba considerada.

Control de masa declarada

Se pesa el contenido del material vegetal de cada una de las presentaciones. A partir de ello, se determina el porcentaje de material vegetal real (g) respecto al valor declarado en el rotulado. Para cada proveedor se estudia el promedio de cada lote junto con su variabilidad.

Identificación botánica

La identificación botánica es un aspecto de relevancia para determinar la genuinidad del material vegetal a estudiar, por lo que se siguieron los criterios especificados en las monografías en donde se detallan los caracteres diagnósticos de cada especie. Para manzanilla alemana, se sigue la Farmacopea de Estados Unidos de América (United States Pharmacopeial Convention, 2021); para marcela, la Farmacopea Brasileira (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a) y para tilo, la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2011a). Además, para la última hierba se complementa la identificación con la Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería (Dimitri y Parodi, 1972).

Control de calidad macroscópico y microscópico

Se separaron a ojo desnudo y mediante lupa binocular las partes de las HM estudiadas, discriminándolas con la finalidad de separar la droga vegetal -de acuerdo con la definición de farmacopea según cada caso- del resto del material vegetal, así como también la materia extraña presente. El Decreto 289/018 del MSP define como materia extraña a cualquier material que no esté comprendido en la definición de droga de la monografía correspondiente. Las drogas deben estar libres de hongos, insectos y otras contaminaciones de origen animal. La monografía indica que el % m/m de materia extraña debe ser $\leq 2\%$ (Uruguay, 2018).

Control de masa de droga vegetal

Luego de realizar la separación de la droga vegetal, se pesó, para después determinar el porcentaje (%) de droga vegetal en el material vegetal total que contiene cada paquete = masa (g) de droga vegetal/masa (g) de material vegetal x 100.

Determinación del porcentaje (%) de humedad en las drogas vegetales

Se determinó la humedad utilizando una termobalanza previamente calibrada. Se pesó 1 g de droga vegetal hasta peso constante. Se utilizó este método no oficial dado el volumen de muestras a analizar y la rapidez para su determinación. El porcentaje se calculó como = (masa (g) de droga vegetal - masa (g) de droga vegetal seca)/masa (g) de material vegetal x 100.

Tratamiento de datos

A partir de los datos generados en cada uno de los puntos descritos, se hizo su tratamiento de forma gráfica en Excel (Microsoft, 2007) y la evaluación estadística por ANOVA se realizó a través del complemento Real Statistics de forma de evaluar diferencias estadísticamente significativas entre lotes y proveedores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este estudio se centra en la adecuación de las HM *in natura* en Uruguay dispensadas según las normativas vigentes del Ministerio de Salud Pública (Uruguay, 2016, Uruguay, 2018). Las hierbas seleccionadas para el trabajo fueron: manzanilla alemana (*Matricaria chamomilla* L., sinónimo: L. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert), marcela (*Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC., *A. flaccida* (Weinm.) DC., *A. alata* (Kunth) DC.) y tilo (especies aceptadas según Farmacopea Europea: *Tilia platyphyllos* Scop., *T. cordata* Mill. y *T. vulgaris* Hayne) (Council of Europe, 2011a). Las tres HM seleccionadas tienen una larga historia de uso en nuestro país. Parrillo et. al (1999) encuestaron a la población capitalina sobre el uso de hierbas medicinales y de su investigación se desprende que las 6 HM más consumidas en ese entonces eran: tilo, manzanilla, marcela, carqueja, boldo y cedrón.

El tilo y la manzanilla alemana son HM que se encuentran bien descritas en las distintas monografías oficiales internacionales. La marcela, en cambio, por ser una especie nativa del Río de la Plata (Davies, 2004) solo cuenta con una monografía oficial, aunque es una de las tres plantas medicinales más consumidas en nuestro país (Figliolo et al., 2021). Como se explicó en la sección de Materiales y Métodos, las HM fueron seleccionadas a partir de consultas realizadas en puntos de venta establecidos. Es importante aclarar que no se tomó en cuenta el material vegetal vendido en puntos callejeros (ni de la capital ni del interior del país) en esta investigación.

Con el nombre vulgar manzanilla podemos referenciar múltiples especies; dos de las más conocidas y utilizadas internacionalmente son la manzanilla alemana (*Matricaria chamomilla* L.) y la manzanilla romana (*Chamaemelum nobile* (L.) All.). *Matricaria chamomilla* L. se encuentra en la monografía de la Farmacopea de Estados Unidos de América (United States Pharmacopeial Convention, 2021), la Europea (Council of Europe, 2011), la Brasileira (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b) y la Argentina (Argentina. ANMAT, 2013), así como en otros compendios internacionales sobre HM. En el caso de la manzanilla alemana, la droga vegetal son los capítulos florales secos de *Matricaria chamomilla* L. (sinónimos: *M. recutita* L., *M. chamomilla* fo. *courrantiana* (DC.) Fiori Rauschert). El origen comercial de la droga vegetal de dicha especie expendida en Uruguay es fundamentalmente de importación, siendo el principal proveedor la República Argentina.

La marcela, también conocida como "macela do campo", es definida en la Farmacopea Brasileira con la monografía de *Achyroclines flos* (Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a), la cual define la droga vegetal como las inflorescencias secas de la especie *Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC. En la región hay una notable demanda tanto para el mercado farmacéutico como para la elaboración de productos cosméticos y bebidas amargas (Retta, 2014). En Uruguay están reportadas cuatro especies de marcela, siendo la marcela blanca (*Achyrocline saturejoides* (Lam.) DC.) y la amarilla (*A. flaccida* (Weinm.) DC.) las más utilizadas (Sequeira, 2022). Cabe destacar que en Uruguay y en la región también se encuentra *Achyrocline alata* (Kunth) DC., siendo todas estas especies conocidas y valoradas por sus propiedades colagogas y coleréticas (López et al., 1996).

El género *Tilia* L. (Malvaceae) es originario del hemisferio norte. En Uruguay, además de la variedad de tilo conocida como "*Moltkei*", producto de la hibridación de *Tilia americana* L. y de *Tilia tomentosa* Moench, se cultivan otras especies de tilos; por ejemplo, *T. cordata* Mill. y *T. platyphyllos* Scop., ambas de origen europeo (Figueredo, 2022). La Farmacopea Europea contiene la monografía de *Tiliae flos* o flor de tilo común (lime flower), la cual define a la droga vegetal como la inflorescencia seca entera o triturada de las especies: *Tilia cordata* Mill., *T. platyphyllos* Scop., *Tilia × vulgaris* Hayne, o una mezcla de estas (Council of Europe, 2011a; Agencia Europea de Medicamentos, 2012a).

Cumplimiento de los requisitos de rotulación

Al analizar el rotulado de las 150 muestras de hierbas *in natura* seleccionadas, se observa que existe un 53 % del total que cumple con ocho de los 10 ítems evaluados (Figura 1).

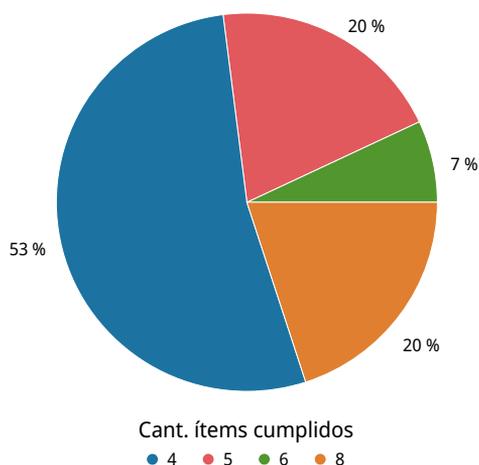


FIGURA 1. Porcentaje (%) del total de las muestras analizadas (n=150) *versus* cantidad de ítems cumplidos (4, 5, 6 y 8) según el Artículo 7 del Decreto 403/016 del MSP (Uruguay, 2016).

A su vez, es interesante destacar que, según cada ítem, en el 100 % de las 150 muestras analizadas se cumple correctamente: presencia de lote, vencimiento, datos de la empresa y nombre del director técnico.

Los ítems que se cumplen en un 20 % son: g, i, j. El ítem a, que requiere se exprese el nombre científico junto con el nombre vulgar, se cumple solamente en un 10 % de las muestras. Se observa dentro de ese porcentaje: nombres vulgares sin nombre científico (por ejemplo: marcela, manzanilla y tilo), nombre científico no actualizado como *Chamomilla recutita* L., que si bien se acepta no es el legítimo, y *Achyrocline saturejoides* (LAM) DC. Además se utiliza la nomenclatura binomial botánica de forma incorrecta, no estando el género y epíteto específico en letra cursiva y el L. de Linneo sin cursiva (Greuter y Rankin, 2018).

Si discriminamos el estudio según la hierba *in natura* y el proveedor, se observa que existe variabilidad en el cumplimiento de la normativa (Figura 2).

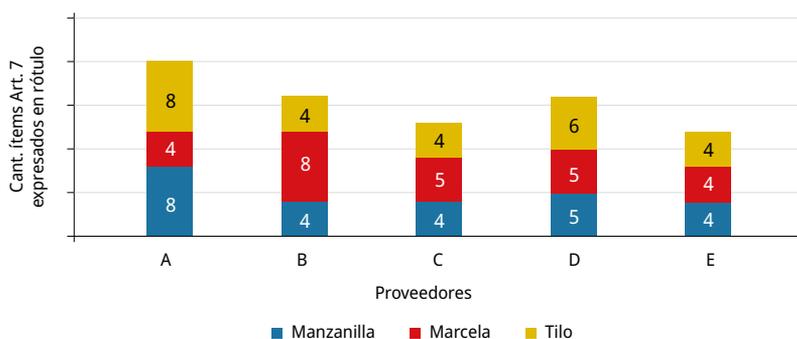


FIGURA 2. Cantidad de ítems cumplidos del Artículo 7 del Decreto 403/016 expresado en rótulo *versus* proveedores para cada hierba medicinal.

Se destaca el proveedor A sobre el resto en cuanto al cumplimiento en el rotulado para las tres hierbas en estudio. Sin embargo, en general se observa un bajo cumplimiento en el rotulado de los envases primarios comercializados.

Porcentaje de masa real *versus* masa declarada

La normativa vigente no establece la tolerancia (desviación asociada) a la masa que debe contener cada paquete. Sin embargo, es buena práctica de control de calidad que lo que se exprese en el rotulado se encuentre en el contenido, asegurando un buen control de calidad y, por ende, confianza al consumidor final. De la Figura 3 se observa que el 59 % de las muestras estudiadas presenta un porcentaje mayor e igual al 101 %. Un 32 % contiene menos de lo que declara, y a su vez tan solo el 9 % de las 150 muestras estudiadas contienen el mismo contenido que el que declaran.

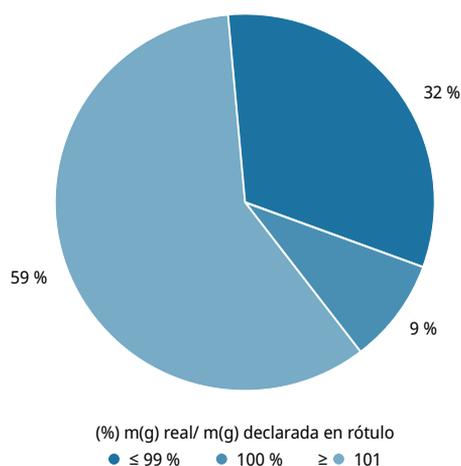


FIGURA 3. Porcentaje del total de las muestras analizadas (n = 150) *versus* porcentaje m(g) real/m(g) declarada.

La variabilidad del contenido de material vegetal real sobre lo que declara cada paquete para cada hierba *in natura* estudiada se presenta para cada una de ellas en las Figuras 4, 5 y 6 respectivamente.

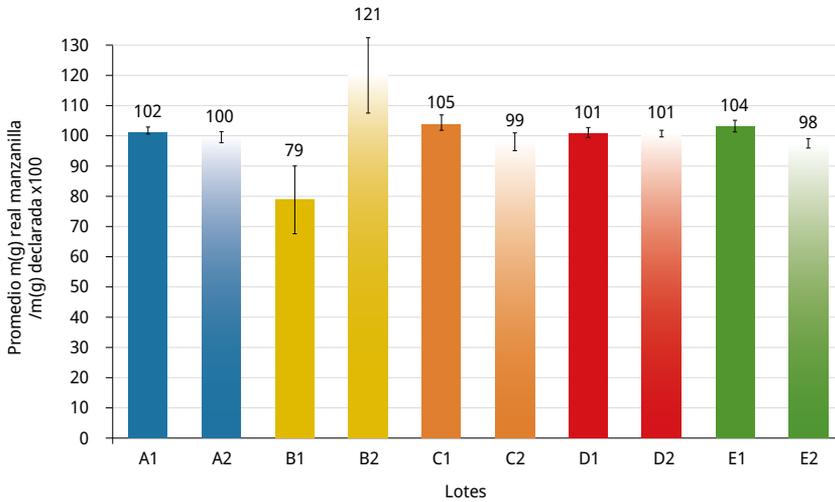


FIGURA 4. Promedio del porcentaje de masa (g) real de manzanilla alemana respecto a la masa(g) declarada *versus* lotes de proveedores.

Se destaca en la Figura 4 que, en el proveedor B, la diferencia entre medias del contenido de m(g) real/m(g) declarada en los paquetes de manzanilla alemana de los lotes analizados es estadísticamente significativa (p - value = 0,0006, α = 0,05).

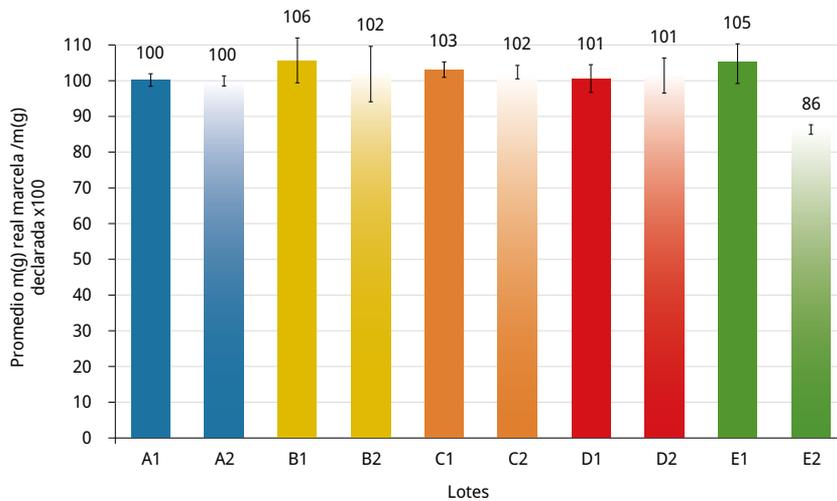


FIGURA 5. Promedio del porcentaje de masa (g) real de marcela respecto a la masa(g) declarada *versus* lotes de proveedores.

En las muestras de marcela se diferencia el proveedor E entre los lotes (p - value = 0,0007, α = 0,5), donde la variabilidad interlotes del % de m(g) real/m(g) declarada (19 %) es mayor que en el resto.

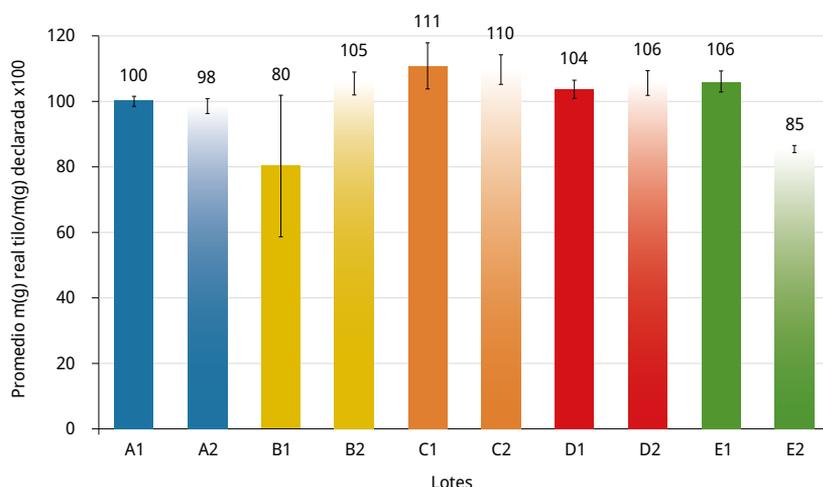


FIGURA 6. Promedio del porcentaje de masa (g) real de tilo respecto a la masa (g) declarada *versus* lotes de proveedores.

Para tilo, se observa una variabilidad entre medias (del % masa real/masa declarada) estadísticamente significativa entre el total de los lotes estudiados (p - valor = $4,8 \times 10^{-7}$, $\alpha = 0,05$). A su vez, se visibiliza en la Figura 6 una variabilidad mayor entre el % m(g) real con respecto a la masa (g) declarada para los proveedores B y E respectivamente (p - value = 0,028, p - value = $2,4 \times 10^{-5}$ $\alpha = 0,05$).

Identificación botánica

Para cada hierba en estudio se identificó la droga vegetal siguiendo las farmacopeas de referencia, como se indicó en la sección de identificación botánica en M&M. Todos los envases de manzanilla contienen *Matricaria chamomilla* L. y el género *Achyrocline* se encuentra presente en todos los de marcela. A continuación, se hará énfasis en la identificación botánica de tilo ya que es una hierba *in natura* que presenta especies no oficiales (adulterantes).

La droga vegetal en tilo (Lime flower-*Tiliae flos*) consiste en las inflorescencias enteras y secas de las especies: *Tilia cordata* Mill., *T. platyphyllos* Scop. y *T. × vulgaris* Hayne o una mezcla de estas (Council of Europe, 2011a). Las especies que no se contemplan en la monografía específica para la droga vegetal en cuestión se consideran adulterantes (y fueron representadas con un asterisco en la Tabla 3) (Organización Mundial de la Salud, 1998). La Tabla 3 resume la especie que declara el rotulado y la especie identificada para los 10 lotes de tilo analizados.

TABLA 3. Especie de tilo declarada en rótulo *versus* especie identificada botánicamente.

Nº	Lote	Especie declarada en rotulado	Especie botánica identificada	Droga oficial
1	A1	<i>Tilia tomentosa</i> Moench*	<i>Tilia cordata</i> Mill.	Si
2	A2	<i>Tilia tomentosa</i> Moench*	<i>Tilia cordata</i> Mill.	Si
3	B1	Tilo	<i>Tilia tomentosa</i> Moench*	No
4	B2	Tilo	<i>Tilia tomentosa</i> Moench*	No
5	C1	Tilo. <i>Tilia tomentosa</i> Moench*	<i>Tilia tomentosa</i> Moench*	No
6	C2	Tilo. <i>Tilia tomentosa</i> Moench*	<i>Tilia cordata</i> Mill	Si
7	D1	Tilo	<i>Tilia × moltkei</i> Späth ex C.K. Schneid*	No
8	D2	Tilo. <i>Tilia tomentosa</i> Moench*	<i>Tilia cordata</i> Mill	Si
9	E1	Tilo (<i>Tilia</i> spp.)	<i>Tilia × moltkei</i> Späth ex C.K. Schneid*	No
10	E2	Tilo (<i>Tilia</i> spp.)	<i>Tilia × moltkei</i> Späth ex C.K. Schneid*	No

Se observan diferencias en el nombre científico declarado en el rótulo *versus* el identificado botánicamente en las muestras de tilo *in natura* comercializadas en Uruguay. Según el Informe de evaluación de la Agencia Europea de Medicamentos, la especie *Tilia tomentosa* Moench (sinónimo *Tilia argentea* DC., silver linden, common silver lime) es un adulterante común de *Tilia cordata* Mill. Los análisis mediante observaciones macroscópicas y microscópicas del material vegetal permiten detectar dicha adulteración (Agencia Europea de Medicamentos, 2012b). Se observa mayor amplitud de especies de *Tilia* que aquellas que se consideran medicinales. *Tilia × moltkei* Späth ex C.K. Schneid es un híbrido entre *Tilia americana* L. y *Tilia tomentosa* Moench, (Xifreda, 1998) y no se encuentra como especie medicinal para tilo.

Es de resaltar que 10 de las 50 muestras de tilo *in natura* analizadas (proveedor A) declaran tener una especie que no contiene, y que además no se trata de la especie medicinal según la Farmacopea Europea. Sin embargo, la especie identificada en los envases fue identificada botánicamente como *Tilia cordata* Mill., siendo esta una de las especies de *Tilia* sp. consideradas medicinales por las Farmacopeas.

A su vez, solo el 10 % del total declara la especie que contiene el paquete: *Tilia tomentosa* Moench., siendo esta no medicinal. En la Figura 7 se observa que el 60 % de las muestras de tilo *in natura* evaluadas son especies no medicinales.

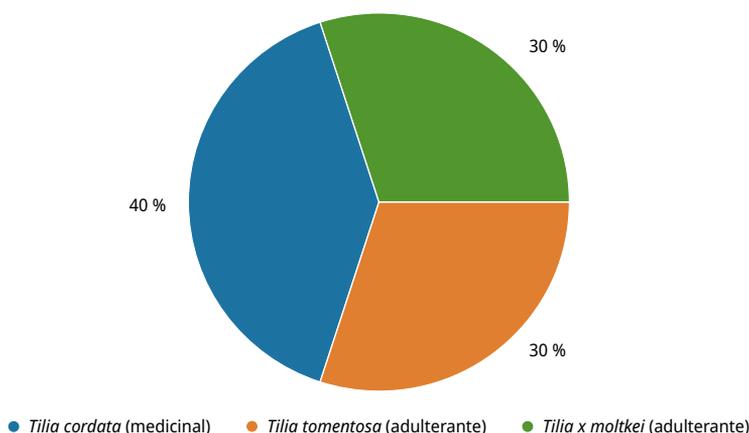


FIGURA 7. Porcentaje de especies identificadas botánicamente (*Tilia cordata* Mill., *Tilia tomentosa* Moench y *Tilia x moltkei* Späth ex C.K. Schneid) en las 50 muestras de tilo *in natura*.

En este punto se puede afirmar que las especialidades herbarias expandidas por el proveedor A en ambos lotes y por los proveedores D y C en uno de ellos corresponden con la droga aceptada en la reglamentación vigente de Uruguay, a pesar de los errores de rotulación observados.

Porcentaje de humedad del material vegetal estudiado

La humedad interfiere en la conservación de las HM ya que pueden desarrollarse hongos, los cuales no solo deterioran la droga vegetal sino también pueden ser micotoxigénicos. A su vez, controlando este parámetro se evita la transformación de sus constituyentes químicos por hidrólisis (Gutiérrez y Gonzáles, 2021). A los efectos de la solicitud del registro de cualquiera de los productos y categorías relacionados a las hierbas medicinales se debe aportar el porcentaje de humedad. Según el Decreto 289/018 (Uruguay, 2018) para la determinación de agua en drogas vegetales se emplean tres métodos: método gravimétrico, método azeotrópico y método volumétrico. El primero es técnicamente el más simple y rápido, pero no es aplicable cuando la droga contiene sustancias volátiles. Si bien el método utilizado en este estudio no es el oficial de farmacopeas, es el que se realiza dado el volumen de muestras en estudio. Se obtiene así una aproximación del contenido de agua residual en la droga. Todos los lotes se encontraron por debajo del 12 % de humedad, valor general que aconseja la OMS en su monografía sobre calidad de plantas medicinales (Organización Mundial de la Salud, 1998).

TABLA 4. Promedio del porcentaje junto con su desviación estándar (DE) de la humedad en las 150 muestras de hierba *in natura* analizadas.

Promedio del porcentaje de humedad (%) ± DE			
Lotes	Manzanilla	Marcela	Tilo
A1	10,9 ± 0,3	9,9 ± 0,6	9,4 ± 0,4
A2	10,8 ± 0,0	10,6 ± 0,8	9,2 ± 0,6
B1	10,8 ± 0,3	9,8 ± 0,8	7,8 ± 1,0
B2	11,4 ± 1,2	9,4 ± 0,9	7,2 ± 2,0
C1	11,4 ± 0,7	10,5 ± 1,0	8,5 ± 0,4
C2	10 ± 1,3	10,6 ± 0,4	8,8 ± 0,4
D1	10,7 ± 0,7	10,6 ± 0,4	9,1 ± 0,0
D2	10,5 ± 1,0	9,4 ± 1,1	7,9 ± 1,6
E1	10,9 ± 1,6	8,1 ± 3,1	8,3 ± 0,3
E2	9,8 ± 0,9	9,3 ± 1,0	8,1 ± 0,7

Sin embargo, los valores obtenidos no pueden ser comparados con las especificaciones aportadas por las monografías sobre pérdida por secado, para tilo, manzanilla y marcela, ya que no se utilizaron los métodos oficiales que se declaran en las mismas para este parámetro fisicoquímico (Council of Europe, 2011; Council of Europe, 2011a; Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019c).

Porcentaje de masa de droga vegetal versus masa de material vegetal

Los porcentajes obtenidos para cada una de las hierbas en estudio se detallan a continuación en las Figuras 8, 9 y 10.

Para *Matricaria chamomilla* L., existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias del promedio del contenido de droga vegetal con respecto a la cantidad de material vegetal entre los lotes estudiados (p - value = $8,2 \times 10^{-5}$, $\alpha = 0,05$).

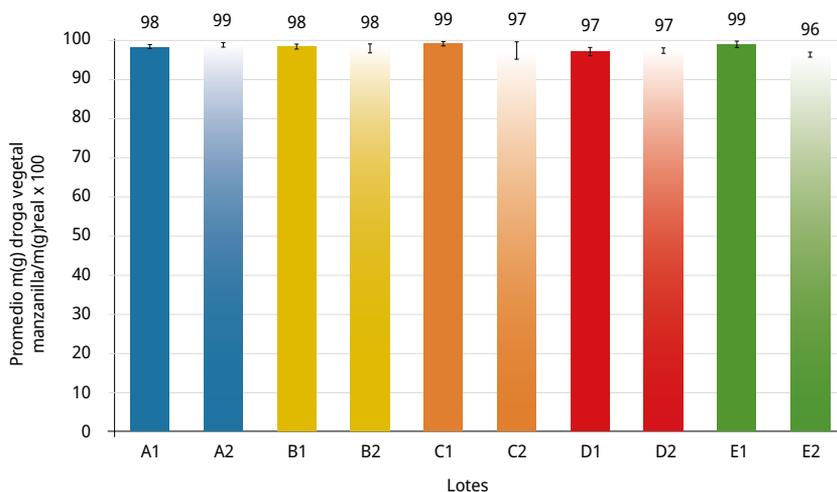


FIGURA 8. Promedio del porcentaje de droga vegetal manzanilla alemana respecto a la masa de material vegetal contenida *versus* lotes de proveedores.

Para *Achyrocline* spp., existe una mayor variabilidad del contenido de droga vegetal inter e intralotes (p - value = $5,1 \times 10^{-19}$ $\alpha = 0,05$), por lo que las medias del promedio de droga vegetal *versus* masa real del material vegetal entre los lotes no son todas iguales, y existe diferencia significativa entre ellas. Se destaca en ocho proveedores un promedio menor de 50 % de la misma. El resto se considera materia extraña, según la normativa. Por lo tanto, ningún proveedor cumple con el máximo requerido de este parámetro.

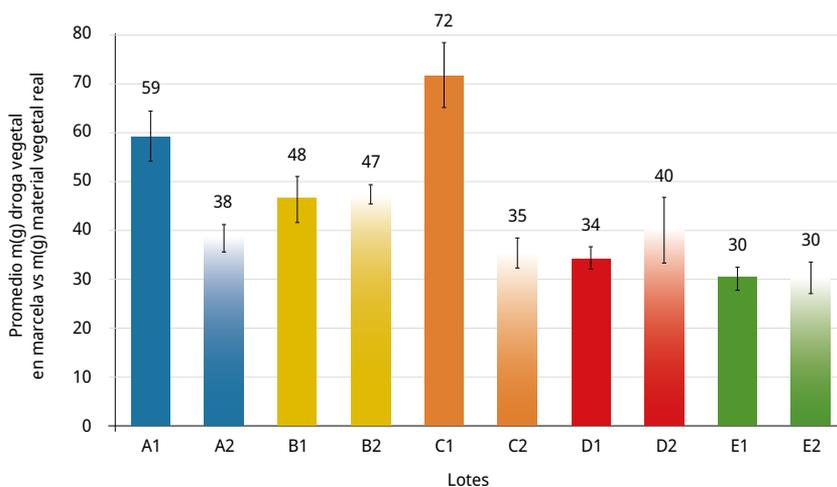


FIGURA 9. Promedio del porcentaje de droga vegetal marcela respecto a la masa de material vegetal *versus* lotes de proveedores.

En tilo, las inflorescencias en las especies medicinales son la droga vegetal. Considerando solo el porcentaje de la droga vegetal en el total de la muestra vegetal analizada por envase, se obtiene la Figura 10, la cual evidencia una diferencia significativa entre las medias de los lotes estudiados (p - value = $7,6 \times 10^{-16}$, $\alpha = 0,05$).

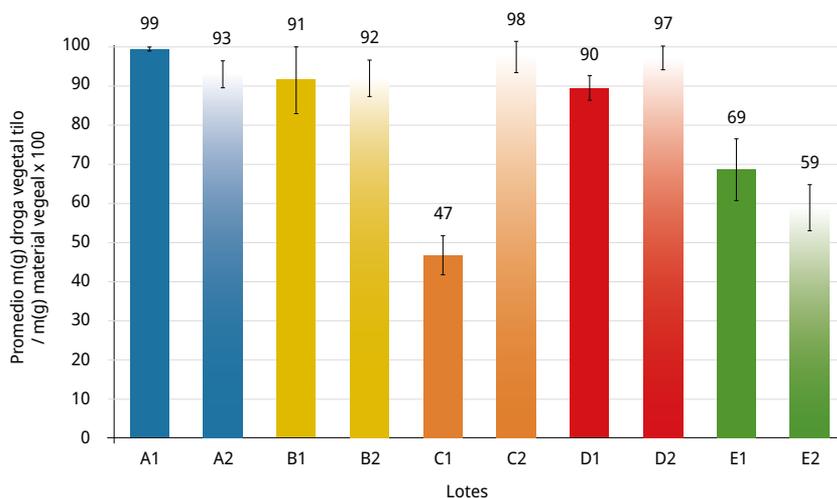


FIGURA 10. Promedio del porcentaje de inflorescencias de *Tilia* spp. (incluye especies no medicinales) respecto a la masa de material vegetal *versus* lotes de proveedores.

A los efectos de la adecuación a la reglamentación, las muestras de los proveedores B y E, así como una muestra del proveedor D y otra del C, no se consideran acordes. Por lo tanto, todas las muestras que contienen la especie medicinal *Tilia cordata* Mill., según la monografía de la Farmacopea A1, A2, C2 y D2, cumplen con lo declarado en la etiqueta con relación al contenido de droga vegetal.

Del análisis de materia extraña se obtuvo como resultado que, de 150 hierbas *in natura* estudiadas, en un 77 % de los casos no se cumple con la reglamentación del Decreto 289/018 (Uruguay, 2018). En el desglose por hierba medicinal se observó que la marcela y el tilo son las que presentan mayor cantidad de materia extraña (Figura 11).

Existen escasos reportes a nivel regional respecto al porcentaje de adulteración de hierbas medicinales. En particular, para la manzanilla, Madrigal de la Selva et al. (2019) reportan que en los mercados de Costa Rica todas las muestras analizadas contenían más de un 25 % de adulteración, siendo esta adulteración más de 1 % de materia extraña.

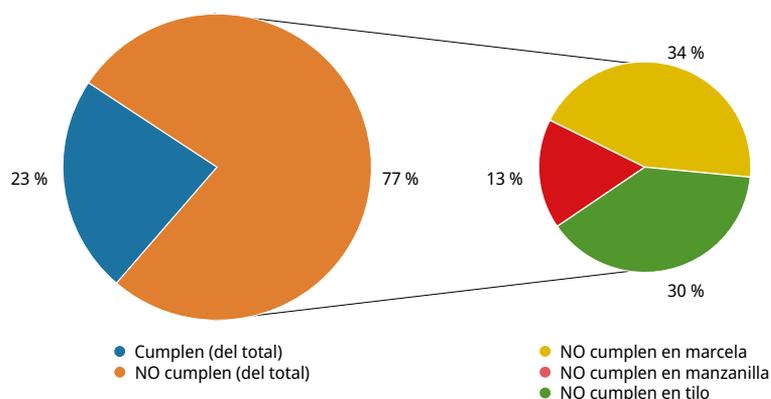


FIGURA 11. Cumplimiento % m/m materia extraña según el Decreto 289/018 (Uruguay, 2018) en las hierbas *in natura* estudiadas n = 150.

CONCLUSIONES

Esta investigación primaria, que busca la adecuación de la manzanilla alemana, la marcela y el tilo *in natura* a la reglamentación vigente del Ministerio de Salud Pública, demuestra varias carencias en el cumplimiento de los requisitos reglamentarios. De las tres hierbas medicinales en estudio, la manzanilla fue la que presentó mayor coincidencia entre lo declarado en el envase y su contenido. Por otra parte, la marcela presentó en general menor proporción de droga vegetal, además de un alto contenido de materia extraña, debido a la presencia de tallos propios de la especie que no están incluidos en la definición de la droga vegetal. El caso más crítico fue el del tilo, ya que se detectó la presencia de especies no medicinales en las muestras comercializadas.

El comercio de hierbas medicinales se encuentra en desarrollo en Uruguay y el mundo. Este crecimiento se debe sustentar sobre bases sólidas de conocimiento científico y profesional. Los resultados obtenidos muestran una clara necesidad de profundizar en la formación de profesionales capacitados en el control de calidad de HM con el fin de asegurar la confiabilidad terapéutica y calidad de los productos herbarios en el mercado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el soporte financiero mediante el proyecto FCE_1_2021_1_167588 (Resp. Horacio Heinzen). Rossina Figliolo agradece a la ANII por la beca de posgrado nacional POS_NAC_2019_1_157883. Los autores agradecen a PEDECIBA Química por su continuo soporte a lo largo de este trabajo.

REFERENCIAS

- Agencia Europea de Medicamentos, 2012a. *Assessment report on Tilia cordata Miller, Tilia platyphyllos Scop., Tilia x vulgaris Heyne or their mixtures, flos*. [En línea]. Ámsterdam: Agencia Europea de Medicamentos. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-tilia-cordata-miller-tilia-platyphyllos-scop-tilia-x-vulgaris-heyne-their_en.pdf
- Agencia Europea de Medicamentos, 2012b. *Assessment report on Tilia tomentosa Moench, flos*. [En línea]. Ámsterdam: Agencia Europea de Medicamentos. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPC_assessment_report/2012/07/WC500129844.pdf
- Alonso, Eduardo; Bassagoda, María J. y Ferreira, Fernando, 2005, *Yuyos: uso racional de las plantas medicinales*. Montevideo: Fin de Siglo. 225 p.
- Aparicio Mena, Alfonso Julio, 2005. La medicina tradicional como medicina ecocultural [En línea]. En: *Gazeta de Antropología*, 21, artículo 10. [Consulta: el 23 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.ugr.es/~pwlac/G21_10Alfonso_Aparicio_Mena.pdf

- Argentina. ANMAT, 2013. Manzanilla, flores. En: Argentina. ANMAT. *Farmacopea Argentina*. 7ma Edición. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT, INAME. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/480cjDb>
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019a. Macela. En: Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 6ta ed. Brasília: Anvisa. Vol II, pp. 352. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/plantas-medicinais.pdf>
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019b. Camomila. En: Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 6ta ed. Brasília: Anvisa. Vol II, pp. 130 [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/plantas-medicinais.pdf>
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019c. Macela. En: Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 6ta ed. Brasília: Anvisa. Vol II, pp. 355. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/plantas-medicinais.pdf>
- Council of Europe, 2011. Matricaria flower. En: Council of Europe. *European pharmacopoeia*. 7ma ed. Estrasburgo: EDQM. pp. 1178.
- Council of Europe, 2011a. Lime flower. En: Council of Europe. *European pharmacopoeia*. 7ma ed. Estrasburgo: EDQM. pp. 1168.
- Dimitri, Milan J. y Parodi, Lorenzo R., 1972. *Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería*. 3ª ed. Vol. I. Buenos Aires: ACME S.A.C.I. pp. 611-613. [Consulta: 17 de octubre 2023] Disponible en: <https://bit.ly/3v6MEKJ>
- D'Ambrogio de Argüeso, Ana, 1986, *Manual de técnicas de histología vegetal*. Buenos Aires: Hemisferio Sur S.A. ISBN 9505043600.
- Davies, Philip, 2004. La marcela: revisión de bibliografía [En línea]. En: INIA. *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas*. Cap. 13. Canelones: INIA. pp. 194-201. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3v6h93m>
- Figliolo, Rossina; Besil, Natalia; Da Luz, Claudia.; Heinzen, Horacio y Cesio, María Verónica, 2021. Relevamiento de hierbas medicinales de uso en Uruguay como etapa inicial para el estudio de su genuinidad y calidad [En línea]. En: Udelar. Facultad de Química. *Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (ENACUI)*. Montevideo, Uruguay (3-5 de noviembre de 2021). Montevideo: Facultad de Química. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.fq.edu.uy/sites/default/files/archivos/e-p%C3%B3ster%20ENACUI%207.%20Figliolo%2C%20R%20-%20Maria%20Figliolo.pdf>
- Figueredo, Eloísa, 2022. *Árboles de Montevideo interesantes por su otoñada* [En línea]. Montevideo: Escuela de Jardinería Prof. Julio Muñoz. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3TwukF0>
- Greuter, Werner y Rankin, Rosa, 2018. *Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Shenzhen), adoptado por el decimonoveno Congreso Internacional de Botánica, Shenzhen, China*. Berlín: Fundación Herbario Greuter. ISBN: 978-3-9820137-4-9
- Gutiérrez, María del Pilar y Gonzáles Davalos, Eduardo Lucio, 2021. Estudio de los parámetros de calidad de la especie vegetal *Urtica urens* L. recolectada en la provincia Ingavi del Departamento de La Paz. En: *Rev. Cs. Farm. y Bioq*, 9(2), pp.33-49. DOI: <https://doi.org/10.53287/roct1421ti19p>.

- Kroeger, Axel y Luna, Ronaldo, 1992. *Atención primaria de la salud principios y métodos*. 2ª ed. Ciudad de México: Editorial Pax México, Librería Carlos Césarman, SA. ISBN: 968-860-416-X. p.565
- Kunle, Oluyemisi Folashade; Egharevba, Henry Omoregie y Ahmadu, Peter Ochogu, 2012. Standardization of herbal medicines - A review. En: *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(3), pp. 101-112. DOI: 10.5897/ijbc11.163
- López, Paula G.; Broussalis, Adriana M.; Rodríguez, María G.; Ferraro, Graciela E. y Coussio, Jorge D., 1996. *Análisis de muestras comerciales de "Marcela" (Achyrocline satureioides)*. En: *Acta Farm. Bonaerense*, 15(4), pp. 243-249. DOI: <https://beta.acuedi.org/book/6643/pdf>
- Madrigal De la Selva, Monserrat; Mata-Monge, Andrés; González-Suarez, Sergio y Alfaro-Mora, Ransés, 2019. Adulterantes presentes en plantas medicinales de mercados municipales en Costa Rica. En: *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 48(2), pp. 385-395. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rcciquifa.v48n2.82716>
- Microsoft, 2007. *Microsoft Office Excel 2007*. Washington: Microsoft Corporation.
- Organización Mundial de la Salud, 1998. *Quality control methods for medicinal plant materials* Geneva. [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/quality-control-methods-for-medicinal-plant-materials.pdf?sfvrsn=b451e7c6_0
- Organización Mundial de la Salud, 2002. *Estrategia de medicina tradicional 2002-2005* [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EDM-TRM-2002.1>
- Organización Mundial de la Salud, 2003. *Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales* [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local%20MINS/1391.pdf>
- Organización Mundial de la Salud, 2023. *Primera cumbre mundial de la OMS sobre medicina tradicional* [En línea]. Ginebra: OMS. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/events/detail/2023/08/17/default-calendar/the-first-who-traditional-medicine-global-summit>
- Parrillo, S.; Manini-Rios, J. y Etcheverry, S., 1999. Research on the use of medicinal plants in Montevideo. En: *Acta Horticulturae*, (501), pp. 123-128. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.501.16>
- Pereyra Ceretta, Valentina, 2021. *Las mujeres rurales y el uso de plantas medicinales para el cuidado de la salud* [En línea]. Montevideo: Udelar. Facultad de Agronomía. (Tesis de Maestría). [Consulta: 23 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/48nq1zP>
- Queirós Armand Ugón, Fernando, 2010. *Producción agroecológica de plantas medicinales en Uruguay* [En línea]. [s.l.]: RAPAL-Uruguay. [Consulta: 23 de octubre 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/4844pIY>
- Retta, Daiana S., 2014. *Determinación de calidad de "marcela" Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (Asteraceae). Parámetros fitoquímicos* [En línea]. En: *Dominguezia*, 30(2), pp. 5-17. [Consulta: 9 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.dominguezia.org/volumen/articulos/3021.pdf>
- Sequeira, Alejandro, 2022. *Hierbas medicinales y aromáticas utilizadas en Uruguay*. Montevideo: Libros Gussi. pp. 142.

- Tabakián Iribernagaray, Gregorio, 2016. *Etnobotánica de plantas medicinales en el departamento de Tacuarembó, Uruguay* [En línea]. Montevideo: Udelar. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. [Consulta: 9 de octubre de 2023].
Disponible en: <https://bit.ly/3vbD3C8>
- United States Pharmacopeial Convention, 2021. Matricaria flower. En: United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. USP NF- Oficial desde 01-may-2018. Rockville: U.S. Pharmacopeial Convention, Inc.
- Uruguay. Decreto 403/016, de 19 de diciembre de 2016. *Diario Oficial* [En línea], 29 de diciembre de 2016. [Consulta: 23 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-originales/403-2016>
- Uruguay. Decreto 289/018, de 10 de septiembre de 2018. *Diario Oficial* [En línea], 19 de septiembre de 2018. [Consulta: 23 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/289-2018>
- Winslow, Lisa Corbin y Kroll, David J., 1998. Herbs as medicines. En: *Archives of Internal Medicine*, 158(20), pp. 2192-2199. DOI: 10.1001/archinte.158.20.2192
- Xifreda, Cecilia C., 1998. Publicación válida, tipificación y jerarquía notosubespecífica para *Tilia Xmoltkei* (Tiliaceae). En: *Darwiniana*, 35(1-4), pp.147-150.

Maximizando el valor nutricional: reutilización de un subproducto de la industria arrocera en alimentos saludables

Maximizing nutritional value: reuse of a by-product of the rice industry into healthy food

Maximizando o valor nutricional: reutilização de um subproduto da indústria do arroz em alimentos saudáveis

 **MILAGROS MUTUBERRIA** (1)

 **VIRGINIA LARROSA** (2)(3)

 **BELÉN GIMÉNEZ** (1)

 **NATALIA GRAIVER** (1)

- (1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CCT - Conicet, UNLP, CIC), La Plata, Argentina.
- (2) Facultad de Bromatología, Universidad Nacional de Entre Ríos, Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.
- (3) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Entre Ríos (ICTAER), Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina.

RECIBIDO: 17/10/2023 → APROBADO: 1/12/2023 ✉ belengimenez@live.com.ar

RESUMEN

En la industria cerealera se obtienen subproductos que presentan una composición química prometedora. Entre ellos se encuentra la harina derivada de la etapa del pulido del arroz, denominada salvado de arroz (SA), que contiene una variedad de nutrientes, incluyendo proteínas, fibra, ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos (antioxidantes). El objetivo de este trabajo fue determinar la composición del SA, formular galletitas con un alto valor nutricional y evaluar sus características fisicoquímicas. Al SA estabilizado se le determinó su composición química, el perfil de ácidos grasos y compuestos fenólicos. Para las formulaciones de galletitas, se utilizó un diseño central compuesto, cambiando el porcentaje de harina de salvado de arroz/harina de arroz y el porcentaje de aceite/agua adicionada. Se encontró que el SA presentó un alto porcentaje de: proteínas (14,18 g/100 g SA), fibra (29,24 g/100 g SA), lípidos (17,50 g/100 g SA) y cenizas (9,19 g/100 g SA). Se determinó mediante cromatografía gaseosa el perfil de ácidos grasos del SA, presentando una buena proporción de ácidos grasos poliinsaturados esenciales ω 9: 34,20; ω 6: 36,44;

ω_3 : 1,82 expresados en g/100 g lípidos. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de nutrientes del SA lo convierten en un ingrediente prometedor para formular matrices alimentarias. Se evaluaron diferentes propiedades fisicoquímicas de las galletitas formuladas, encontrándose valores adecuados para este tipo de producto. El estudio pretende innovar en la creación de alimentos de alta calidad nutricional y destacar la importancia de adoptar prácticas sustentables en la industria alimentaria, aprovechando los beneficios económicos y ambientales de la economía circular.

Palabras clave: salvado de arroz, fibra dietaria, antioxidantes, alimento funcional, economía circular.

ABSTRACT

In the cereal industry, a series of by-products with promising chemical compositions are obtained. Among them is the flour derived from the rice polishing stage, called rice bran (RB), which contains a variety of nutrients, including proteins, fiber, unsaturated fatty acids, and phenolic compounds (antioxidants). The main objective of this work was to determine the composition of RB, formulate cookies with high nutritional value, and evaluate their physicochemical characteristics. The stabilized RB had its chemical composition, fatty acid profile, and phenolic compounds determined. For the cookie formulations, a composite central design was used, changing the percentage of rice bran flour/rice flour and the percentage of added oil/water. It was found that RB had a high percentage of proteins (14.18 g/100 g RB), fiber (29.24 g/100 g RB), lipids (17.50 g/100 g RB), and ashes (9.19 g/100 g RB). The fatty acid profile of RB was determined by gas chromatography, showing a good proportion of essential polyunsaturated fatty acids ω_9 : 34.20; ω_6 : 36.44; ω_3 : 1.82 expressed in g/100 g lipids. The results obtained show that the nutrient content of RB makes it a promising ingredient for formulating food matrices. Different physicochemical properties of the formulated cookies were evaluated, finding suitable values for this type of product. This study aims not only to innovate in the creation of high-nutritional-quality foods but also to emphasize the importance of adopting sustainable practices in the food industry, leveraging the economic and environmental benefits of the circular economy.

Keywords: rice bran, dietary fiber, antioxidants, functional food, circular economy.

RESUMO

Na indústria cerealífera, são obtidos uma série de subprodutos que apresentam uma composição química promissora. Entre eles está a farinha derivada da etapa de polimento do arroz, chamada farelo de arroz (FA), que contém uma variedade de nutrientes, incluindo proteínas, fibras, ácidos graxos insaturados e compostos fenólicos (antioxidantes). O objetivo principal deste trabalho foi determinar a composição do FA, formular biscoitos com alto valor nutricional e avaliar suas características físico-químicas. Ao FA estabilizado, foi determinada sua composição química, o perfil de ácidos graxos e compostos fenólicos. Para as formulações de biscoitos, foi utilizado um

design central composto, alterando a porcentagem de farinha de farelo de arroz/farinha de arroz e a porcentagem de óleo/água adicionada. Verificou-se que o FA apresentou uma alta porcentagem de: proteínas (14,18 g/100 g FA), fibras (29,24 g/100 g FA), lipídios (17,50 g/100 g FA) e cinzas (9,19 g/100 g FA). O perfil de ácidos graxos do FA foi determinado por cromatografia gasosa, mostrando uma boa proporção de ácidos graxos poli-insaturados essenciais ω 9: 34,20; ω 6: 36,44; ω 3: 1,82 expressos em g/100 g de lipídios. Os resultados obtidos mostram que o conteúdo de nutrientes do FA o torna um ingrediente promissor para formular matrizes alimentares. Diferentes propriedades físico-químicas dos biscoitos formulados foram avaliadas, encontrando valores adequados para esse tipo de produto. Este estudo visa não apenas inovar na criação de alimentos de alta qualidade nutricional, mas também destacar a importância da adoção de práticas sustentáveis na indústria alimentícia, aproveitando os benefícios econômicos e ambientais da economia circular.

Palavras-chave: farelo de arroz, fibra alimentar, antioxidantes, alimento funcional, economia circular.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un progresivo deterioro de la calidad alimentaria (Lazarides, 2011). El consumo de alimentos ricos en grasas saturadas y azúcares refinados ha aumentado, mientras que la ingesta de frutas y vegetales, y por ende de fibra, ha disminuido (López De Blanco y Carmona, 2005). Estas deficiencias en la alimentación son un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades tales como la diabetes, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Kovalskys et al., 2007). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de alimentos más saludables y que se puedan adaptar a la vida cotidiana.

En la actualidad, una de las tendencias más importantes en la industria de los alimentos es el aprovechamiento de materias primas que sobresalen por sus nutrientes y que provienen de cultivos promisorios (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017).

En la industria de cereales se generan diversos subproductos cuya composición química sugiere su potencial aprovechamiento en la alimentación humana. Entre ellos, el salvado de arroz (SA), una harina derivada de la pulitura del arroz que está compuesta por el germen, la capa de aleurona, restos finos de cáscara, algunos granos quebrados y la harina del endospermo que se desprende durante el proceso de pulido del arroz descascarado (Vargas y Aguirre, 2011). Es decir, el SA representa uno de los subproductos más significativos en la producción de arroz y se obtiene a través del pulido posterior al descascarillado, dando lugar al arroz blanco. El destino del SA es principalmente como alimento para animales (Vargas y Aguirre, 2011). Este salvado equivale aproximadamente entre un 8% y un 11% del peso total del grano entero (Parrado et al., 2006). El salvado de arroz contiene compuestos de muy alto valor nutricional, los cuales tienen un amplio uso en grandes sectores de la industria de alimentos funcionales. Dentro de los compuestos que forman el SA se destacan sus proteínas, ácidos grasos insaturados, fibra, vitaminas y

minerales, con efectos preventivos en enfermedades crónicas no transmisibles (Araya y Lutz, 2003).

Dentro de la fracción lipídica encontramos los tocoferoles, tocotrienoles y orizanoles, los cuales tienen acción antioxidante ya que desempeñan un papel protector frente a algunas formas de cáncer, prevención de la arteriosclerosis, reducción del colesterol plasmático y la absorción del colesterol hepático (Wilson et al., 2007; Gong y Yao, 2001). Respecto a los ácidos grasos insaturados, el ácido linolénico (ALA) es un ácido graso esencial, es decir, el organismo no lo produce; por lo tanto, hay que obtenerlo a partir de los alimentos. El ALA es un componente importante de las membranas celulares y tiene un rol crucial en el desarrollo cognitivo (Valenzuela et al., 2013). La cantidad de ácido linolénico que aporta el salvado de arroz contribuye a cubrir las recomendaciones diarias para adultos sanos (1,1 y 1,6 g para mujeres y hombres respectivamente (United States National Institute of Health, 2023).

La calidad nutricional de las proteínas de arroz supera a la del trigo y maíz (Huang et al., 2015). Con respecto a vitaminas y minerales, se destacan las vitaminas del complejo B, E y K; y entre los minerales, el potasio, hierro, fósforo, calcio, manganeso, sodio y zinc. Los beneficios de una alimentación rica en fibra están muy estudiados y se evidencia una asociación entre consumo de fibra y reducción del riesgo de mortalidad por todas las causas (Huang et al., 2015).

Hasta hace muy poco tiempo la fibra dietética ha sido considerada como un nutriente sin valor alimenticio importante; sin embargo, hoy se deduce que el consumo de fibra es un factor de primer orden en la dieta alimentaria. Como todo nutriente, debe ser ingerido en dosis lógicas, ya que una alimentación excesiva de fibra provoca malabsorción de minerales como el calcio y el cinc y esto puede provocar problemas en el aparato óseo a mediano plazo (Escudero Álvarez y González Sanchez, 2006).

Las galletitas son uno de los productos más consumidos por la sociedad. Las que se encuentran disponibles en el mercado son altamente calóricas, contienen una elevada concentración de azúcares refinados y grasas saturadas, y -en muchos casos- aditivos que pueden provocar problemas en la salud de los consumidores, como manifestaciones cutáneas (por ejemplo, urticaria) por presencia de antioxidantes y colorantes artificiales (Velázquez et al., 2019). Por eso el mercado no considera que un alimento como las galletitas pueda ser saludable y/o funcional; en este aspecto presentan mejor aceptabilidad los alimentos como el pan y las pastas. Sin embargo, existen numerosos trabajos donde se han desarrollado galletitas con diversos efectos beneficiosos sobre la salud (Constanzo et al., 2019; Patrignani y Lupano, 2016; Vargas et al., 2018).

El exceso de consumo de azúcares refinados es un factor de riesgo para diversas patologías, entre las que se encuentran: sobrepeso, obesidad, diabetes, hígado graso, alteraciones hepáticas, enfermedades cardiovasculares, caries dentales y algunos tipos de cáncer (Jiménez y Ordoñez, 2021). También está asociado a alteraciones psicológicas como la hiperactividad y el síndrome premenstrual (Cabezas et al., 2016). Por la cual, reducir la cantidad de azúcar añadida o sustituir el endulzante es de suma importancia para evitar estas enfermedades no transmisibles.

La isomaltosa es considerada un sustituto del azúcar, aporta la mitad de calorías que la sacarosa (2 kcal/g) con un dulzor similar (Sentko, Willibald-Ettle, 2012). Resulta muy interesante su aplicación en el desarrollo de alimentos para diabéticos y deportistas

por su lenta liberación de glucosa y fructosa (posee un índice glucémico bajo) (Sentko, Willibald-Ettle, 2012). Otros beneficios son su propiedad anticariogénica y su capacidad para no absorber agua hasta alcanzar valores de actividad acuosa mayores a 0,85, razón por la cual los productos provenientes de procesos que se realizan con isomaltosa no presentan pegajosidad (Sentko, Willibald-Ettle, 2012).

El objetivo principal de este estudio abarca dos dimensiones esenciales. En primer lugar, realizar la caracterización del salvado de arroz, analizando su composición química y sus propiedades fisicoquímicas. En segundo lugar, evaluar la incorporación de este subproducto en la formulación de galletitas, destacando la utilización de la isomaltosa como endulzante de bajo índice glucémico.

El mercado objetivo para las matrices alimentarias a base de salvado de arroz incluye tanto a la población general, que busca opciones de alimentos nutritivos y accesibles, como a las personas que son intolerantes al gluten o con enfermedad celíaca. Además, al tener el salvado de arroz mayor proporción de proteínas y fibra respecto a otras harinas, se apunta a un mercado que tiende a disminuir (o en algunos casos eliminar) las proteínas de origen animal y reemplazarlas por proteínas de origen vegetal.

La singularidad de esta investigación no solo radica en la estratégica utilización de un subproducto proveniente de la industria arrocera, propiciando la economía circular al conferir un nuevo propósito a este material, sino también en la introducción de la isomaltosa para potenciar las propiedades nutricionales de las galletitas resultantes. Este estudio no solo busca innovar en la elaboración de alimentos más saludables, sino también subrayar la importancia de adoptar prácticas sustentables en la industria alimentaria, capitalizando los beneficios tanto económicos como ambientales de la economía circular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Las muestras de salvado de arroz utilizadas fueron provistas por la cerealera Unión Cerealera, de la ciudad de Gualeguaychú, en la provincia de Entre Ríos, Argentina. Se estabilizaron las muestras en horno con circulación de aire a tres tiempos y temperaturas distintas: a 80 °C por 2 horas, a 70 °C por 2 horas y a 90 °C por 1 hora. Para evaluar la estabilización se utilizó el método de acidez libre AOCs Ca 5a-40 ácidos grasos libres (American Oil Chemist's Society, 2009), expresando el resultado como porcentaje de ácido oleico.

Caracterización de la materia prima

Se utilizó para todas las determinaciones el SA estabilizado a 80 °C por 2 horas.

Análisis de composición química del salvado de arroz

Se determinó el contenido de humedad, proteínas, lípidos y cenizas en la muestra de salvado de arroz. Todos los análisis se realizaron por duplicado. La humedad se determinó

mediante el método 24.002 (AOAC International, 1984a). El contenido de ceniza se determinó por el método 24.009 (AOAC International, 1984b). Para el porcentaje de proteína total se utilizó el método 24.027 de Kjeldahl (AOAC International, 1984c) y el de lípidos por el método 24.005 de Soxhlet (AOAC International, 1984d). El contenido de fibra dietaria total (TDF) se realizó mediante el método enzimático-gravimétrico 32-05.01 (American Association of Cereal Chemists, 2000), empleando el kit Total Dietary Fiber Kit Assay (Megazyme U.C., Irlanda), corrigiendo el valor por proteínas y por cenizas. La TDF es el residuo de filtrado seco menos el peso de proteína y ceniza. Los hidratos de carbono se determinaron por diferencia.

Caracterización fisicoquímica del salvado de arroz

Determinación de ácidos grasos por cromatografía gaseosa

Se extrajeron los lípidos por medio de extracción mediante el método de Soxhlet y se realizó su derivatización, para lo cual se colocó 1 mL de los lípidos extraídos con 4 mL de la mezcla ácido clorhídrico/metanol 5 % v/v. Se llevó la mezcla a baño maría por 10 minutos, se enfrió y se agregó 1 mL de agua destilada y 1 mL de hexano. Para finalizar se centrifugó por diez minutos a 3000 rpm y se filtró.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron en un equipo Agilent Technologies 7890 A equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se usó nitrógeno como gas portador. La técnica se realizó por duplicado. Condiciones de las corridas: columna capilar DB-23 (30 m de largo, 0,25 mm di x μ m 250 espesor). Temperatura inyector 250 °C, temperatura detector 280 °C. Programa de temperatura: Temperatura inicial 50 °C x 1 minuto Rampa de temperatura 1: 25 °C x minuto hasta 175 °C Rampa de temperatura 2: 4 °C x minuto desde 175 °C hasta 230 °C mantenida durante 15 minutos. Tiempo total de corrida: 34,75 minutos. Se utilizó un estándar externo marca Supelco 37 component FAME MIX, 100 mg Neat. Catalog. N° 18919-1AMP.

Determinación de acidez

A través del método soxhlet, se extrajeron los lípidos de las muestras estabilizadas a distintas temperaturas/tiempo y una muestra sin estabilizar para determinar si la estabilización de las lipasas fue exitosa. Se utilizó el método AOCS Ca 5a-40 ácidos grasos libres (American Oil Chemist's Society, 2009). Se tomaron 0,5 g de lípidos y se disolvió en una mezcla de 60 mL de alcohol etílico (96 % v/v), luego se mezcló con buzo agitador magnético en placa calefactora a temperatura y agitación constante suave. Finalmente se tituló la acidez con NaOH 0,01 N hasta viraje de fenolftaleína. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido oleico. Toda la metodología se realizó por duplicado.

Extracción de compuestos fenólicos libres y ligados

La extracción de compuestos fenólicos libres y ligados se refirió al método informado por Zhao et al. (2019). Brevemente, la muestra (0,5 g) se mezcló con 50 mL de acetona al 80 % (v/v) enfriada, luego se homogeneizó (10000 rpm, 5 min) con el baño de hielo y se repitió

dos veces. Los sobrenadantes se recogieron después de centrifugar a 3000 g durante 10 min, luego se secaron en estufa a vacío a 40 °C por 24 h. La muestra seca se disolvió con metanol al 80 % (v/v) hasta un volumen final de 10 mL, luego se almacenó a -30 °C hasta su análisis.

El residuo de la extracción de fenoles libres se hidrolizó con 40 mL de NaOH 2 mol/L a 25 °C durante 60 min con agitación, luego el pH de la solución se ajustó a 2 con HCl concentrado, seguido de extracción cinco veces con acetato de etilo. Los sobrenadantes se secaron por evaporación rotatoria a 45 °C. La muestra seca se disolvió con metanol al 80 % (v/v) hasta un volumen final de 10 mL y se almacenó a -40 °C hasta su análisis. Todo el análisis se realizó por duplicado.

Determinación del contenido de fenoles libres, ligados y totales

Basado en la descripción de Zhao et al. (2019), la muestra (0,125 mL) se mezcló con 0,5 mL de agua destilada y 0,125 mL de Folin-Ciocalteu, luego se dejó reposar por 6 min. Posteriormente, se agregaron 1,25 mL de Na₂CO₃ al 7 % y 1 mL de agua destilada, luego se incubaron en oscuridad durante 90 min después de agitar. La absorbancia se midió a 760 nm con ácido gálico como estándar. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Formulación de galletitas y caracterización fisicoquímica

En la formulación de las galletitas se emplearon las siguientes materias primas: harina de arroz, salvado de arroz (SA), huevo y aceite de maíz, y para endulzar se utilizó isomaltosa.

Para las formulaciones de galletitas, se utilizó un Diseño Central Compuesto (DCC) con 9 formulaciones y tres replicados en el centro (Tabla 1) para evaluar las mismas en función de la textura y coloración. Los valores codificados corresponden a los gramos de salvado de arroz y a los mL de aceite. Se variaron las proporciones de salvado de arroz (25-125 g), y harina de arroz para llegar a 150 g totales y aceite (5-50 mL) completando con agua (0-45 mL) hasta llegar a 50 mL totales.

TABLA 1. Proporción de materias primas según modelo central compuesto.

Valores codificados SA	Valores codificados aceite de maíz	Muestra	Salvado de arroz (g)	Aceite de maíz (mL)	Agua (mL)	Harina de arroz (g)
0	$\sqrt{2}$	G1	75,00	50,00	0,00	75,00
-1	+1	G2	39,65	43,41	6,59	110,35
1	1	G3	110,35	43,41	6,59	39,65
$-\sqrt{2}$	0	G4	25,00	27,50	22,50	125,00
0	0	G5	75,00	27,50	22,50	75,00
$\sqrt{2}$	0	G6	125,00	27,50	22,50	25,00
-1	-1	G7	39,65	11,59	38,41	110,35
1	-1	G8	110,35	11,59	38,41	39,65
0	$-\sqrt{2}$	G9	75,00	5,00	45,00	75,00

Preparación de galletitas

El huevo, el aceite, el agua y la isomaltosa se colocaron en el recipiente de una batidora y se mezclaron durante 5 min a velocidad de 757 rpm. Luego se agregaron el salvado de arroz y la harina de arroz tamizados y se mezclaron hasta obtener una masa (10 min); la masa se colocó en una bolsa de polipropileno para evitar la desecación y se la dejó reposar a temperatura ambiente por 20 min.

Las masas obtenidas se estiraron con un rodillo de cocina hasta obtener un espesor de 0,3 cm y se las dejó reposar por 15 min más. Finalmente, se cortaron en forma rectangular (2,5 x 5,0 cm) y fueron colocadas sobre placas recubiertas de aluminio. Las galletitas se cocinaron en horno eléctrico (White Westinghouse, W-CG18) a 180 °C por 30 min. Una vez cocinadas, las galletitas tuvieron un espesor promedio de 8,0 mm +/- 0,5.

Textura de galletitas: ensayo de tres puntos

Las galletitas recién preparadas se sometieron a un ensayo de 3 puntos, con texturómetro TA.XT2i. En el ensayo, la distancia entre los soportes (L) fue de 1,7 cm, la velocidad de la sonda fue de 0,5 mm/s, mientras que la velocidad en pre-ensayo y en post-ensayo fue de 5 mm/s y de 10 mm/s, respectivamente. Las galletitas fueron colocadas con la cara inferior hacia arriba. A partir del gráfico fuerza vs distancia, se pudo determinar la fuerza máxima F (N) requerida para romper la galletita (Baltsavias, 1997).

Aw de galletitas

La actividad acuosa (aw) se determinó en un equipo AQUALAB serie 3 que emplea el método de determinación de punto de rocío. En este equipo, la muestra es equilibrada con el aire presente en una cámara sellada que contiene la muestra, un espejo, un sensor

óptico, un microventilador y un termómetro infrarrojo. El ventilador interno genera una circulación de aire que reduce el tiempo de equilibrio entre la muestra y el aire de la cámara. El equilibrio se logra sin pérdida ni ganancia considerable de humedad para la muestra en virtud de que su masa es mucho mayor que la del aire y, sobre todo, que la del vapor contenido en él. El rango de medición de a_w se encuentra entre 0,03 y 1 con una resolución de $\pm 0,001$. La medición normalmente se logra en 5 minutos. El equipo exhibe los datos de actividad acuosa y temperatura de equilibrio en un visor digital.

Color de galletitas

Para la determinación de color se utilizó un Colorímetro portátil (Konica minolta CR-400), con el que se determinaron los parámetros L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB. El parámetro L^* varía en un rango del 0 (negro) al 100 (blanco) y hace referencia a la luminosidad del producto. El parámetro a^* representa la variación del color rojo (a^+) al verde (a^-), mientras que el parámetro b^* representa la variación del color amarillo (b^+) al azul (b^-).

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los distintos factores se realizó un análisis de varianza (ANOVA) monofactorial. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

Para comparar entre medias se utilizó el test de “mínimas diferencias significativas” (LSD). En todos los casos, el nivel de significación elegido fue del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a la estabilización del SA, los resultados de acidez expresados como porcentaje de ácido graso oleico fueron los siguientes: la estabilización a 70 °C por 2 horas presentó un % ácido oleico $21,0 \pm 0,3$, a 80 °C por 2 horas $20,6 \pm 0,1$, y a 90 °C por 1 hora presentó un % $20,85 \pm 0,05$, por lo que podemos concluir que la estabilización realizada a 80 °C por un tiempo de 2 horas fue la que generó menor cantidad de ácidos grasos libres. Estos resultados coinciden con los encontrados en el estudio de Pacheco et al. (2009) y con Pestana et al. (2009), en el cual encontraron un valor de 15,4 % para el salvado de arroz blanco. Por lo que se decidió utilizar para todas las determinaciones el SA estabilizado a 80 °C por 2 horas.

Caracterización del SA

Los resultados de la composición centesimal del salvado estabilizado se muestran en la Tabla 2. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Pacheco Delahaye y Peña (2006), que estudiaron el SA en Venezuela con resultados similares (proteína $13,7 \pm 0,3$ %; lípidos $17,9 \pm 0,5$ %; cenizas $8,5 \pm 0,2$ %), a excepción de la humedad que en nuestro estudio fue menor ($3,8 \pm 0,5$ % vs $8,82 \pm 0,2$ %) y de la fibra sin corregir donde nuestro valor fue mayor ($40,5 \pm 1,1$ % vs $27 \pm 0,2$ %). El contenido de fibra presente en 100 g de salvado

cubre el 100 % de la recomendación de fibra para adultos saludables, según el Instituto de Medicina de los Estados Unidos de América (entre 25 y 35 g/día) (Cho y Almeida, 2012). La fibra contenida en el salvado de arroz es mayor que la encontrada en harina integral (9 g/100 g), harina de arroz integral (4 g/100 g) y la harina de trigo sarraceno (2,8 g/100 g), como se observa en la Tabla 2. Además, el salvado de arroz contiene mayor contenido de proteína que las harinas mencionadas.

TABLA 2. Composición centesimal del salvado de arroz y comparación con otras harinas comerciales.

Nutrientes	Salvado de arroz	Harina de trigo integral (marca Brotes de traslasierra)	Harina de arroz integral (marca Abucel)	Harina de trigo sarraceno (marca Celidarina)
Proteínas	14,1 (± 0,8)	13	7,5	7,2
Lípidos	17,5 (± 0,1)	2,2	1,6	3,0
Humedad	3,8 (± 0,5)	10,2	11,3	17,7
Cenizas*	9,1 (± 0,3)	max 2,3	1,45	max de 2
Fibra sin corregir	40,5 (± 1,1)	---	---	---
Fibra corregida con cenizas y proteína	22,6 (± 0,7)	9	4	2,8
Hidrato de carbono	32,9	58	77	72

* Los valores de las cenizas de las harinas comerciales se obtuvieron del Código Alimentario Argentino (Argentina. Ministerio de Salud, 1996).

Respecto a la determinación de ácidos grasos, en la Tabla 3 se muestra la composición porcentual de ácidos grasos constituyentes del salvado de arroz determinado por cromatografía gaseosa. Estos datos están en concordancia con los encontrados por Pestana et al. (2009), donde se determinó el porcentaje de ácidos grasos del SA proveniente de diferentes tipos de arroz: arroz blanco C18:1 (36,3 %); C18:2 (30,8 %); C18:3 (3,72 %), arroz vaporizado C18:1 (36,3 %); C18:2 (32,9 %); C18:3 (3,01 %), peletizado C18:1 (37,7 %); C18:2 (33,3 %); C18:3 (2,49 %).

El ácido palmítico es el ácido graso saturado que se encuentra en mayor proporción en el SA (25,79 ± 0,15 g/100 g de lípidos, 4,5 g/100 g SA). La cantidad de ácidos grasos saturados totales en 100 g de salvado de arroz es de 4,7 g. Si bien estos ácidos en proporciones elevadas son un factor de riesgo para desarrollar obesidad y/o enfermedades cardiovasculares, el SA tiene como contraparte un elevado contenido de ácidos grasos insaturados con beneficios para la salud (72,75 g/100 g de lípidos, 12,73 g/100 g SA) (Sanhueza Catalán et al., 2015).

TABLA 3. Porcentaje de ácidos grasos (g de ácido graso/100 g de lípidos) presentes en el salvado de arroz.

Ácido graso	Carbonos: cantidad de dobles enlaces	g de ácido graso/100 g de lípidos (%)
Ácido mirístico	14:0	0,35 (± 0,09)
Ácido palmítico	16:0	25,79 (± 0,15)
Ácido esteárico	18:0	0,83 (± 0,05)
Ácido oleico	18:1 n9	34,20 (± 0,11)
Ácido linoleico	18:2 n6	36,44 (± 0,14)
Ácido linolénico	18:3 n3	1,82 (± 0,03)
Ácido araquídico	20:0	0,25 (± 0,03)
Ácido eicosenoico	20:1 n9	0,29 (± 0,02)

Respecto a los polifenoles, se encontró que el contenido de fenoles libres fue $1,08 \pm 0,08$ g GAE/100 g muestra, ligados $4,05 \pm 0,01$ g GAE/100 g muestra y totales $5,13 \pm 0,08$ g GAE/100 g muestra. Estos datos se encuentran dentro de los rangos obtenidos por Gutiérrez et al. (2008), quienes determinaron el contenido de fenoles totales en 14 malezas usadas como forraje para alimentación animal, encontrando que la maleza con mayor proporción contenía 12,5 g GAE/100g muestra y la de menor concentración fue de 2,1 g GAE/100 g muestra. Cozzano Ferreira (2017) estudió el contenido de polifenoles en SA, encontrando valores de $7,14 \pm 0,16$ g de GAE/ 100 g de extracto, similares a nuestros resultados.

En el trabajo realizado por Pincirolí et al. (2017) se determinaron fenoles en diferentes cultivares de arroz, encontrándose mayor concentración en el salvado ($7,1 - 10,3 \times 10^{-3}$ g GAE/100 g), luego en el grano integral ($9,8 - 13,7 \times 10^{-4}$ g GAE/100 g) y en menor cantidad en el grano pulido ($2,7 - 4,3 \times 10^{-4}$ g GAE/100 g). Posiblemente esto se deba a la proporción de pericarpio presente en las diferentes partes del grano o a factores genéticos y tipo de harina, así como de su procesado. En el trigo, los valores encontrados de polifenoles totales en la fracción de harina integral y salvado/semolina fueron aproximadamente 0,09 g/100 g (Sánchez Gavilán, 2016).

Los valores de polifenoles en el SA se encuentran por encima de otras fuentes vegetales, demostrando que este subproducto de la industria tiene un alto potencial como alimento funcional.

Formulación de galletitas

Se realizaron distintas formulaciones para el desarrollo de las galletitas, variando el porcentaje de salvado de arroz y harina de arroz, y la proporción de agua y aceite. Las formulaciones que contenían mayor cantidad de agua y aceite y menor cantidad de SA presentaron una masa más pegajosa, dificultando su manipulación y estiramiento. Luego

de la cocción para todas las formulaciones se obtuvieron galletitas con textura y color similares a sus homólogos integrales disponibles en el mercado.

Textura de galletitas

El ensayo de 3 puntos es una prueba de ruptura utilizada para evaluar la dureza y fracturabilidad de productos como galletitas, barras de chocolate y otros alimentos de geometría rectangular (González et al., 2015). Se evalúa la fuerza máxima necesaria para producir una fractura o quiebre total de la estructura, y los valores más altos de fuerza se correlacionan con una mayor resistencia del alimento (Rosenthal, 2010; Milde et al., 2014). Las curvas obtenidas de un análisis de 3 puntos se pueden ver en la Figura 1.

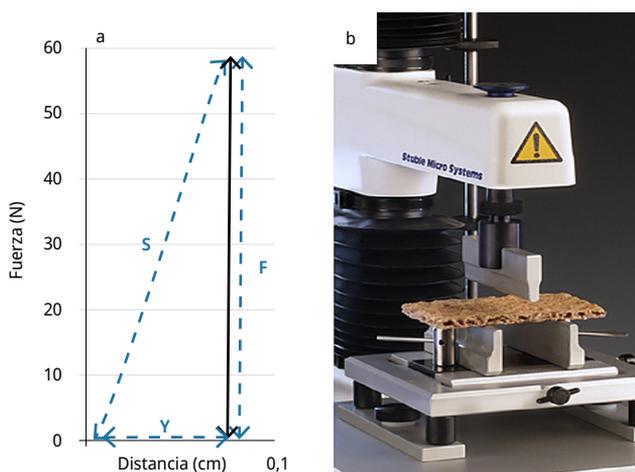


FIGURA 1. a) gráfico y b) equipo utilizado en el ensayo de 3 puntos realizado sobre una galletita.

Se encontraron diferencias significativas $p < 0,05$ entre las formulaciones y la fuerza máxima. Se observó que la fuerza máxima (dureza) es menor en las muestras G2 y G4 que contienen en su formulación menor cantidad de SA. La G7, a pesar de tener un bajo contenido de salvado, presentó una dureza mayor probablemente debido a la elevada relación agua/aceite. En general se evidenció una tendencia a aumentar con el incremento de la proporción de SA y/o agua (Figura 2).

Las características texturales de las galletitas pueden ser atribuidas al proceso de elaboración, al horneado, a los ingredientes utilizados durante su preparación y a la variación de la composición proximal, en especial de la humedad de las muestras. En la Tabla 4 se presentan los datos obtenidos de humedad y a_w de las diferentes formulaciones, las mismas también presentan una diferencia significativa $p < 0,05$ en función de las formulaciones. Se puede observar en la Tabla 4 que, como era de esperar, las formulaciones con mayor cantidad de agua presentaron valores de humedad y a_w más altos.

Diversos autores han informado que las galletitas preparadas con harinas que presentan mayor proporción de proteína resultan con una estructura más dura (Gaines et al., 1992 y Moiraghi et al., 2011), como producto de una fuerte adhesión entre las

proteínas y el almidón. Estos datos están en concordancia con los obtenidos en este ensayo, ya que las muestras que contenían mayor cantidad de SA respecto a la harina de arroz presentaron una mayor dureza, lo que puede deberse a que el salvado de arroz contiene mayor cantidad de proteínas, como puede verse en la Tabla 2.

Manley (2000) reporta que existe una fuerte relación entre la estructura y la cantidad de grasa y azúcar utilizada para preparar las galletitas. Las grasas promueven la formación de una estructura más blanda que se funde en la boca, mientras que el agregado de azúcar otorga fragilidad al producto, ya que interfiere con la red de gluten (Conforti, 2009). En este caso, las muestras G2 y G1, que presentan la menor proporción de SA y mayor proporción de aceite, son las galletitas más blandas ($F = 38 \text{ N}$ y $F = 59 \text{ N}$).

Se podría concluir entonces que el agregado de SA modifica significativamente las propiedades texturales de las galletitas, característica importante para los posibles consumidores. Sin embargo, sería necesario realizar ensayos sensoriales adicionales para evaluar la aceptabilidad de los productos desarrollados.

TABLA 4. Contenido de humedad y aw de las diferentes galletitas formuladas.

Muestra	Humedad	aw
G1	6,7 ± 1,7 A B	0,321 ± 0,001 A B
G2	7,1 ± 2,9 A B C	0,320 ± 0,002 A
G3	6,6 ± 0,2 A B	0,339 ± 0,004 A B
G4	6,0 ± 0,6 A	0,490 ± 0,001 D
G5	9,1 ± 1,7 A B C D	0,343 ± 0,002 B
G6	10,9 ± 2,7 C D E	0,443 ± 0,010 C
G7	13,0 ± 0,7 E	0,533 ± 0,001 E
G8	12,2 ± 0,3 D E	0,479 ± 0,005 D
G9	10,4 ± 2,1 B C D E	0,579 ± 0,020 F

Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes $P > 0,05$.

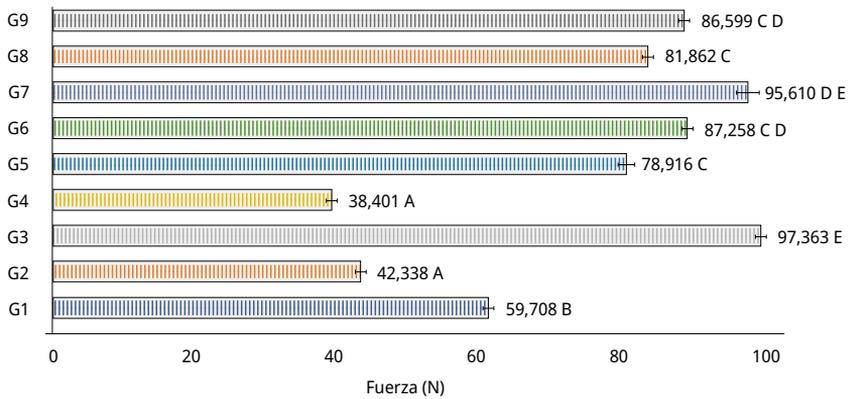


FIGURA 2. Variación de la fuerza máxima para las diferentes formulaciones. Muestras con misma letra no son significativamente diferentes $P > 0,05$.

El color es el principal factor para determinar la aceptabilidad de las galletitas por parte del consumidor (Espino Manzano et al., 2021). Se encontraron diferencias significativas $p > 0,05$ entre las formulaciones y los parámetros L^* , a^* y b^* . La Figura 3 muestra los resultados de la evaluación de color (CIE $L^*a^*b^*$ color system) en las galletitas. La luminosidad (L^*) es el parámetro más relevante, observándose que disminuye con el incremento del contenido de SA en las formulaciones, siendo la galletita G4 la de mayor luminosidad ($L^* = 61.50$, 25 g SA) y G6, la menor ($L^* = 52.02$, 125 g SA). Esta tendencia se visualiza en la Figura 4, donde las galletitas que presentaban menor SA fueron las de coloraciones más claras. Se observó una tendencia en el parámetro b^* a disminuir progresivamente al aumentar la proporción de SA. Respecto al parámetro a^* se observó una variabilidad, no encontrando una tendencia.

Los resultados obtenidos para el parámetro L^* y b^* coinciden con los expuestos por Pacheco Delahaye y Peña (2006) en su estudio sobre el efecto del salvado de arroz sobre parámetros químicos, físicos y sensoriales de arepas precocidas y congeladas. Dichos autores encontraron que a una mayor concentración de salvado de arroz la masa se vuelve más oscura, concluyendo que el salvado de arroz tiene un efecto significativo sobre la tenacidad, la humedad y el color del producto final luego del horneado.

En la Figura 4 se puede observar que el pardeamiento es más intenso. El proceso de pardeamiento se intensifica notablemente en las galletitas con mayor contenido de salvado de arroz. Esta observación podría estar relacionada con el aumento de proteínas en las galletitas que contienen más SA, lo que acelera la reacción de Maillard. Esta reacción de pardeamiento de Maillard, junto con el efecto de pardeamiento inducido por la enzima polifenol oxidasa en el caso de compuestos fenólicos, contribuye a la formación de melanoidinas, lo que a su vez conduce a un oscurecimiento del producto final.

El desarrollo del color en las galletitas también se atribuye al tono intrínseco del salvado de arroz, que es naturalmente más oscuro que la harina de arroz integral. Además, durante el proceso de horneado, la composición del SA favorece la reacción de Maillard, acentuando aún más la coloración del producto. Similares estudios de Artz et al. (1990) y Canett Romero et al. (2004) han reportado que la adición de diferentes fuentes de fibra en la formulación de galletitas produce un pardeamiento considerable en el producto terminado, siendo por ejemplo la intensidad del color mayor en las

galletitas que contenían altas cantidades de cascarilla de orujo de uva. Por lo expuesto se resume que el incremento en la proporción de SA dio lugar a galletitas más oscuras y con coloraciones más amarronadas.

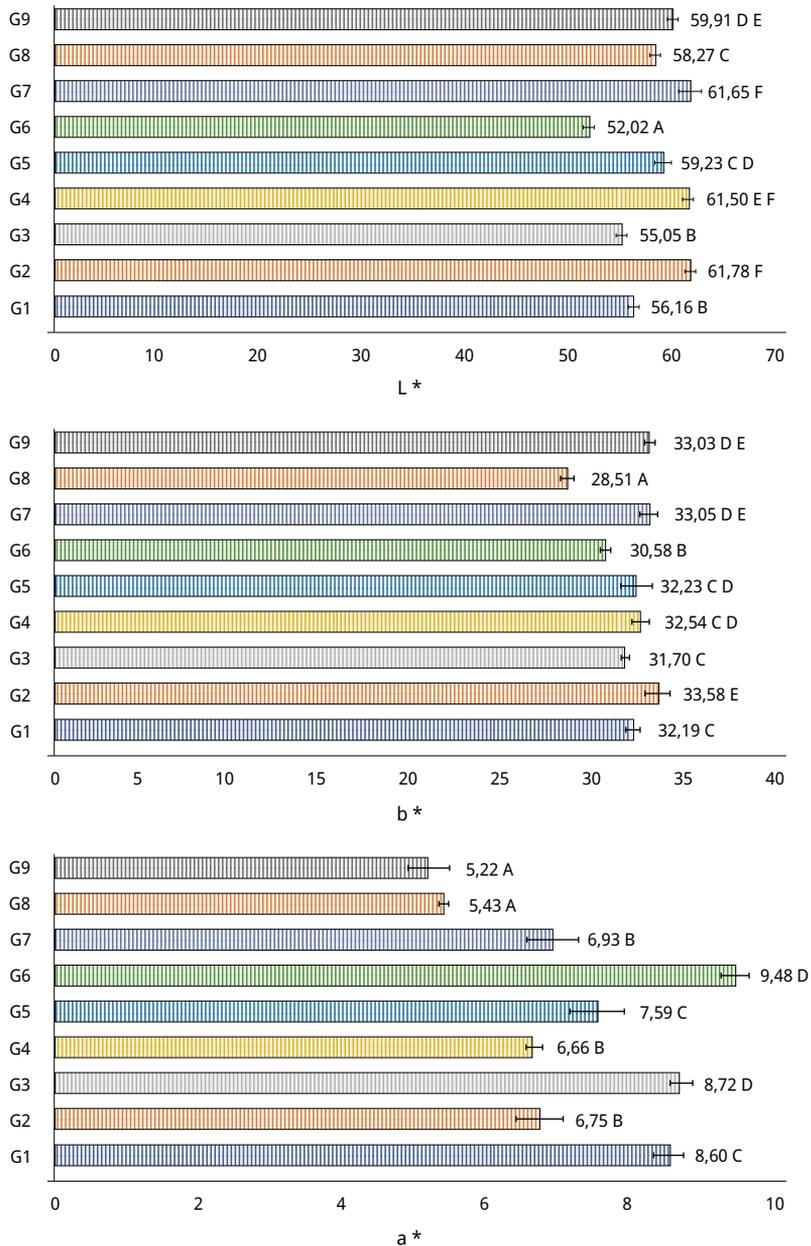


FIGURA 3. Variación de los parámetros L*, b* y a* en función de las diferentes formulaciones de galletitas. Muestras con misma letra no son significativamente diferentes P > 0,05.

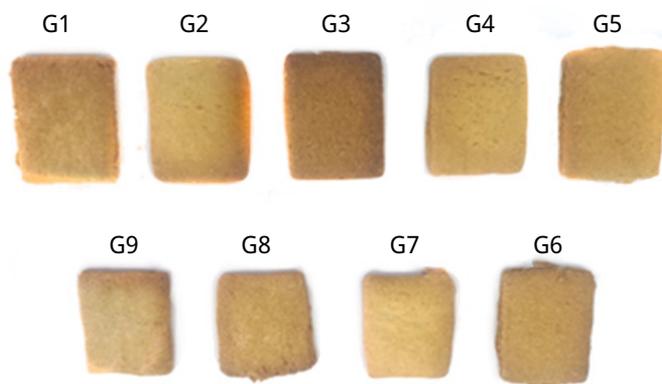


FIGURA 4. Variación del color en las diferentes formulaciones.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo una caracterización del salvado de arroz, se determinó su composición nutricional, evidenciando un alto contenido de proteínas (14,1%), lípidos (17,5%) y fibra (22,6%), lo que lo posiciona como un subproducto con un potencial nutricional valioso. Además, se identificó una proporción significativa de ácidos grasos poliinsaturados y la presencia de compuestos fenólicos, lo que contribuye a su perfil saludable. La presencia del ácido linolénico contenido en el salvado (1,82 % g/100 g lípidos, 0,32 g/100 g SA) es de importancia, ya que es un ácido graso esencial difícil de cubrir en Argentina por el bajo consumo de la población de alimentos fuentes (pescados de agua fría, nueces, semillas de chía y lino).

En la formulación de galletitas, la incorporación de salvado de arroz mostró efectos notables en las propiedades texturales y de color de los productos finales. Se observó que a mayor proporción de salvado y/o agua, las galletitas presentaron una mayor dureza, lo cual puede ser atribuido a la interacción entre las proteínas del salvado y el almidón. Además, se evidenció un oscurecimiento significativo en las galletitas con mayor contenido de salvado, fenómeno atribuido a la reacción de Maillard y la presencia de compuestos fenólicos.

A nivel industrial, los resultados de este estudio sugieren que la utilización estratégica del salvado de arroz puede no solo contribuir a la creación de alimentos más saludables, ricos en proteínas y fibra, sino también a fomentar la economía circular al darle un nuevo propósito a este subproducto de la industria arrocera. La introducción de la isomaltosa como endulzante agrega un componente innovador, resaltando el potencial de esta formulación para satisfacer las demandas de consumidores interesados en mantener una alimentación saludable.

La audiencia destinataria de las matrices alimentarias elaboradas a partir de salvado de arroz abarca tanto a la población general, en busca de alternativas nutritivas y asequibles, como a aquellos individuos que presentan intolerancia al gluten o padecen enfermedad celíaca. La elevada proporción de proteínas y fibra en el salvado de arroz la convierte en una opción atractiva para un mercado que muestra una tendencia a reducir,

o incluso eliminar, las proteínas de origen animal, optando por alternativas basadas en proteínas vegetales.

En ensayos futuros se optimizará la formulación de las galletitas, así como también se evaluará su composición química y su aceptabilidad. Además, se analizará la intención de compra y consumo de las galletitas con salvado de arroz.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la cerealera "Unión Cerealera" por el aprovisionamiento del salvado de arroz, a Mariana Angela Pennisi por la ayuda en técnica de Cromatografía Gaseosa y a María Fernanda Hamet por su cooperación con la determinación de textura.

REFERENCIAS

- American Association of Cereal Chemists, 2000. *Approved methods*. minnesota: AACC. Method 32-05.01.
- AOAC International, 1984a. *Official Methods of Analysis of AOAC Internacional*. 14a ed. Gaithersburg. Official method 24.002.
- AOAC International, 1984b. *Official Methods of Analysis of AOAC Internacional*. 14a ed. Gaithersburg. Official method 24.009.
- AOAC International, 1984c. *Official Methods of Analysis of AOAC Internacional*. 14a ed. Gaithersburg. Official method 24.027.
- AOAC International, 1984d. *Official Methods of Analysis of AOAC Internacional*. 14a ed. Gaithersburg. Official method 24.005.
- American Oil Chemist's Society, 2009. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society (AOCS)*. 4th ed. Champaign: AOCS. Official Method Ca 5a-40.
- Araya, H. y Lutz, M., 2003. Alimentos funcionales y saludables. En: *Revista Chilena de Nutrición*, 30(1), pp. 8-14. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182003000100001>
- Argentina. Ministerio de Salud, 1996. *Código alimentario Argentino*. Cap. IX. Buenos Aires: ANMAT.
- Artz, W.E.; Warren, C.C; Mohring, A.E. y Villota, R., 1990. Incorporation of corn fiber into sugar snap cookies [En línea]. En: *Cereal Chem.*, 67(3), pp. 303-305. [Consulta: 12 de octubre del 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3GUblwA>
- Baltsavias, A.; Jurgens, A. y Van Vliet, T., 1997. Factors affecting fracture properties of short-dough biscuits En: *Journal of Texture Studies*, 28(2), pp. 205-219. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1997.tb00111.x>
- Cabezas-Zabala, C. C., Hernández-Torres, B. C. y Vargas-Zárate, M., 2016. Azúcares adicionados a los alimentos: efectos en la salud y regulación mundial. Revisión de la literatura. En: *Revista de la Facultad de Medicina*, 64 (2), pp. 319-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v64n2.52143>
- Canett Romero, R.; Ledesma Osuna, A. I.; Robles Sánchez, R. M.; Morales Castro, R.; León Martínez, L. y León-Gálvez, R., 2004. Caracterización de galletitas elaboradas con cascarilla de orujo de uva [En línea]. En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1),

- pp. 93-99. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2004/1/art-14/>
- Cho, S. S. y Almeida, N., eds., 2012 *Dietary fiber and health*. Boca Raton: CRC Press. ISBN: 9780429184239. DOI: <https://doi.org/10.1201/b12156>
- Conforti, P., 2009. *Obtención y caracterización de productos de panadería con componentes regionales y de alto valor nutricional*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. (Tesis de Doctorado).
- Constanzo, M. M.; Comelli, N. A.; Conforti, P. A.; Quiroga, M. y Ponzi M. I., 2019. Elaboración de galletitas saludables usando harinas de topinambur y amaranto [En línea]. En: Asociación Argentina de Tecnólogos Alimentarios. *XXI Congreso Latinoamericano y del Caribe de Ciencia y Tecnología de Alimentos y XVII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos - CyTAL®-ALACCTA 2019*. Buenos Aires, Argentina (20 al 22 de noviembre de 2019). Buenos Aires: AATA. [Consulta: 12 de octubre del 2023]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/>
- Cozzano Ferreira, S., 2017. *Obtención y caracterización de extractos bioactivos de salvado de arroz: aplicaciones en alimentación y salud* [En línea]. Montevideo: Universidad de la República. (Tesis de Doctorado). [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/32101>
- Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C. W., 2020. *InfoStat* [En línea]. Versión 2020. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. [Consulta: 20 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- Escudero Álvarez, E. y González Sánchez, P., 2006. La fibra dietética [En línea]. En: *Nutrición Hospitalaria*, 21(Supl. 2), pp. 61-72. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500007&lng=es.
- Espino-Manzano, M.; González de los Montero-Sierra, M.J.; Hernández-Solís K. y Campos-Montiel R., 2021. Evaluación nutricional y de color de galletas libres de gluten elaboradas con maíz morado y frijol de Caxtilán de la Huasteca Hidalguense [En línea]. En: *Investigación y desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, 16, pp.16-23. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume6/6/1/3.pdf>
- Gaines, C. S.; Kassuba, A.; Finney P. L. y Donelson J. R. 1992. Instrumental measurement of cookie hardness. II: Application to product quality variables [En línea]. En: *Cereal Chemistry*, 69(2), pp. 120-125. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3NBWDxU>
- Gong, Y. y Yao, H., 2001. Purification e identificación of gamma-oryzanol from rice bran. En: *J. Chin. Cer. Oils Assoc.*, 16, pp. 30-34.
- González, J.; Gallob, R. T.; Correac, D. A. y Gallo-García, L. A., 2015. Evaluación instrumental de los parámetros de textura de galletas de limón [En línea]. En: *Revista Vector*, 10, pp.14-25. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: Vector10_3.pdf (ucaldas.edu.co).
- Gutiérrez Avella, D. M.; Ortiz García, C. y Mendoza Cisneros, A., 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal [En línea]. En: CENAM. *Simposio de Metrología*. Santiago de Querétaro, México (22 a 24 de octubre

- de 2008). Ciudad de México: CENAM. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf
- Huang, T.; Xu, M.; Lee, A.; Cho, S. y Qi, L., 2015. Consumption of whole grains and cereal fiber and total and cause-specific mortality: prospective analysis of 367, 442 individuals. En: *BMC Med*, 13(59). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0294-7>
- Jiménez, M. y Ordoñez, R., 2021. Consumo de azúcares libres y sus efectos negativos en la salud. En: *Revista Qualitas*, 22(22), pp. 073-089. DOI: <https://doi.org/10.55867/qual22.06>
- Kovalskys, I., Holway F., Ugalde, V. y De Gregorio, M. J., 2007. *Análisis sobre los factores vinculados a sobrepeso y obesidad en niños de 10 y 11 años que asisten a escuelas públicas en el área metropolitana de Buenos Aires* [En línea]. Buenos Aires: ILSI. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/41B2p8A>
- Lazarides, H. N., 2011. Hunger and obesity: Is this the best we—food scientists/engineers—can offer to the world community in the 21st century. En: *Procedia Food Science*, 1, pp. 1854-1860. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.272>
- López De Blanco, M. y Carmona, A., 2005. La transición alimentaria y nutricional: un reto en el siglo XXI [En línea]. En: *Anales Venezolanos de Nutrición*, 18(1), pp. 90-104. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522005000100017&lng=es&nrm=iso.
- Manley, D., 2000. *Technology of biscuits, crackers and cookies*. 3a ed. Cambridge: Duncan Manley. ISBN: 978-1-84569-770-9
- Milde, L. B.; Cabral, F. A. y Ramírez R., 2014. Efecto del almacenamiento congelado sobre panificado de fécula de mandioca: propiedades físicas, texturales y sensoriales. En: *Revista de Ciencia y Tecnología*, 21(1), pp. 33-39. Disponible en: <https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/627>
- Moiraghi, M.; Vanzetti, L.; Bainotti, C.; Helguera, M.; Leon, A. y Pérez, G., 2011. Relationship between soft wheat flour physicochemical composition and cookie-making performance. En: *Cereal Chemistry*, 88(2), pp. 130-136. DOI: <https://doi.org/10.1094/CCHEM-09-10-0131>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2017. *El futuro de la alimentación y la agricultura. Tendencias y desafíos* [En línea]. Roma: FAO. [Consulta: 12 de octubre 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>
- Pacheco Delahaye, E. y Peña, J., 2006. Efecto del salvado de arroz sobre parámetros químicos, físicos y sensoriales de arepas precocidas y congeladas [En línea]. En: *Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia*, 23(2), pp. 234-245. [Consulta: 12 de octubre 2023]. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-78182006000200010&script=sci_abstract
- Pacheco Delahaye, E.; Peña, J. y Jiménez, P., 2009. Efecto del salvado de arroz sobre las propiedades físico-químicas y sensoriales de panes de trigo [En línea]. En: *Revista de la Facultad de Agronomía*, 26(4), pp: 583-598. [Consulta: 12 de octubre 2023]. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-78182009000400007&script=sci_abstract
- Parrado, J.; Miramontes, E.; Jover, M.; Gutiérrez, J.; Collantes, L. y Bautista, J., 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional Food. En: *Journal of Food Chemistry*, 98(4) pp. 742-748. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.016>

- Patrignani, M. y Lupano, C. E., 2016. Incorporación de saborizantes naturales a galletitas: efecto sobre el poder antioxidante del producto final. En: Universidad Nacional de Córdoba. *VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Córdoba, Argentina (2-4 de noviembre de 2016). Córdoba: UNC. [Consulta: 12 de octubre 2023]. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/90752>
- Pestana, V. R.; Zambiasi Rui, C.; Mendonça Carla, R. B.; Bruscatto Mariângela, H. y Ramis-Ramos G., 2009. Influencia del procesado industrial sobre las características químico-físicas y contenido en lípidos y antioxidantes del salvado de arroz. En: *Grasas y Aceites*, 60(2), pp. 184-193. DOI: <https://doi.org/10.3989/gya.075108>
- Pincioli, M.; Vidal, A. A.; Quiroga, A.; Domínguez Perles, R.; Guy, A.; Durand, T.; Galano, J. M.; Aphalo, P.; Añon, M. C. y Gil Izquierdo, A., 2017. Presencia de polifenoles, fitoprostanos y fitofuranos bioactivos en cultivares de arroz tipo largo fino [En línea]. En: Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. *X Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado*. Gramado, Brasil (8-11 de agosto de 2017). Gramado: SOSBAI. [Consulta: 13 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/4axqDEX>
- Rosenthal, A., 2010. Texture profile analysis: how important are the parameters. En: *Journal of Texture Studies*, 41(5), pp. 672-684. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2010.00248.x>
- Sánchez-Gavilán, I., 2016. *Nutrientes y compuestos bioactivos del trigo: fibra y polifenoles* [En línea]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. (Tesis de Grado). [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://docta.ucm.es/entities/publication/af8c6ace-97ee-4592-9c59-507f722d6ac4>
- Sanhuesa Catalán, J.; Durán Agüero, S. y Torres García, J., 2015. Los ácidos grasos dietarios y su relación con la salud. En: *Nutrición Hospitalaria*, 32(3), pp. 1362-1375. DOI: <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.3.9276>
- Sentko, A. y Willibald Ettle, I., 2012. Isomalt. En: O'Donnell, Kay y Kearsley, Malcolm W. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. 2a ed. Cap. 11. Nueva Jersey: Wiley. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118373941.ch11>
- United States. National Institute of Health, 2023. *Omega-3 fatty acids: health professional fact sheet* [En línea]. Bethesda: NIH. [Consulta: 12 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcids-HealthProfessional/>
- Vargas, E.; Weaver Monchablon, L. y Sance, M., 2018. Galletitas saludables libres de gluten elaboradas con piel de tomate para población infantil en edad escolar. En: *Investigación, Ciencia y Universidad*, 2(3). DOI: https://repositorio.umaza.edu.ar/bitstream/handle/00261/1490/28_ResumenNyS_Vargas.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Vargas, M. E. y Aguirre, M., 2011. El salvado de arroz: procesos de estabilización y usos potenciales en la industria colombiana. Colombia: Tadeo Lozano. ISBN: 978-958-725-082-4
- Valenzuela, R.; Morales, J.; Sanhuesa, J. y Valenzuela, A., 2013. Ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso esencial a nivel cerebral. En: *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), pp. 383-390. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000400009>
- Velázquez-Sámano, G.; Collado-Chagoya, R.; Cruz-Pantoja, R. A.; Velasco-Medina, A. A. y Rosales-Guevara, J., 2019. Reacciones de hipersensibilidad a aditivos alimentarios. En: *Revista Alergia México*, 66(3), pp. 329-339. DOI: <https://www.scielo.org.mx/pdf/ram/v66n3/2448-9190-ram-66-03-329.pdf>

- Wilson, T. A.; Nicolosia, R. J.; Woolfrey, B. y Kritchevsky, D., 2007. Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. En: *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(2), pp. 105-112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.03.006>
- Zhao, C., Zhang, C., Xing, Z., Ahmad, Z., Li, J. S. y Chang, M. W., 2019. Pharmacological effects of natural Ganoderma and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, pp. 1160-1178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.076>

Caracterización de la actividad proteolítica de extractos semipurificados de *Vigna unguiculata*

Characterization of the proteolytic activity of semipurified extracts from *Vigna unguiculata*

Caracterização da atividade proteolítica de extratos semipurificados de *Vigna unguiculata*

ID LUIS OJEDA-OJEDA (1)

ID OSCAR MONTANER (1)

ID ROGER DURAN (1)

ID ALEXIA TORRES (2)

ID JOSELYN DÍAZ (3)

ID NIRZA NOGUERA-MACHADO (1)

(1) Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco Javier Triana Alonso", Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

(2) Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos, Universidad Simón Bolívar, Baruta, Venezuela.

(3) Escuela de Medicina, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela.

RECIBIDO: 1/7/2023 → APROBADO: 19/10/2023 ✉ lojeda2@uc.edu.ve

RESUMEN

Las leguminosas son alimentos fundamentales para la nutrición de los seres humanos por su contenido energético, proteico y de fibra. También pueden ser fuente de diversas enzimas de interés agroindustrial. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue diseñar una metodología para extraer proteasas a partir de semillas de frijol pico negro (*Vigna unguiculata*). Para ello, fueron sometidas a procesos de acondicionamiento previo que contemplaron fermentación, secado, disrupción, filtrado y precipitación. Como métodos de precipitación se emplearon el punto isoeléctrico y la precipitación con etanol. A los extractos obtenidos se les determinó su actividad enzimática. El extracto que exhibió los mejores niveles de actividad fue sometido a un proceso de purificación parcial a través de cromatografía. Se logró semipurificar una fracción con especies proteicas de pesos moleculares cercanos a los 30 kDa, con actividad catalítica en un intervalo de pH entre 5 y 8, siendo estable a temperaturas entre 35 y 45 °C. Estos resultados sugieren la presencia de una proteasa alcalina de bajo tamaño por el intervalo de pH en el que mostró actividad.

Se logró diseñar una metodología sencilla y factible que permite recuperar la actividad enzimática a partir de la semilla *Vigna unguiculata*.

Palabras clave: proteasas vegetales, frijol pico negro, enzimas alimentarias, extracción de proteínas.

ABSTRACT

Legumes are essential food for human nutrition, due to their energy, protein and fiber content. They can also be a source of manifold enzymes of agroindustrial interest. Therefore, the aim of this work was to design a methodology to extract proteases from cowpea seeds (*Vigna unguiculata*). For this purpose, they were subjected to pre-treatment processes, which included fermentation, drying, disruption, filtration and precipitation. As precipitation methods, isoelectric point and ethanol precipitation were used. The protease activity of the obtained extracts was determined. The extract that showed the best levels of activity underwent a partial purification process through chromatography. A fraction containing protein species with molecular weights close to 30 kDa was semi-purified, which showed catalytic activity in a pH range between 5 and 8, being stable at temperatures between 35 and 45 °C. These results suggest the presence of a small alkaline protease, due to the pH range in which it showed activity. It was possible to design a simple, feasible methodology that allows recovering enzymatic activity from the *Vigna unguiculata* bean.

Keywords: vegetal proteases, cowpea seeds, serin-proteases, food enzymes, protein extraction.

RESUMO

As leguminosas são alimentos essenciais para a nutrição humana, devido ao seu conteúdo energético, proteico e de fibra. Também podem ser fonte de diversas enzimas de interesse agroindustrial. Por isso, o objetivo deste trabalho foi desenhar uma metodologia para extrair proteases de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Para isso, elas foram submetidas a processos de pré-tratamento, que incluíram fermentação, secagem, ruptura, filtração e precipitação. Como métodos de precipitação, foram utilizados o ponto isoelétrico y a precipitação com etanol. A atividade protease dos extratos obtidos foi determinada. O extrato que apresentou os melhores níveis de atividade foi submetido a um processo de purificação parcial por cromatografia. Foi semi-purificada uma fração que continha espécies proteicas com pesos moleculares próximos a 30 kDa, que mostrou atividade catalítica em um intervalo de pH entre 5 e 8, sendo estável em temperaturas entre 35 e 45 °C. Esses resultados sugerem a presença de uma pequena protease alcalina, devido à faixa de pH em que apresentou atividade. Foi possível desenhar uma metodologia simples e viável que permite recuperar a atividade enzimática da semente de *Vigna unguiculata*.

Palavras-chave: proteasas vegetais, feijão-caupi, enzimas alimentares, extração de proteínas.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas han sido ampliamente estudiadas por su relevancia en la alimentación de gran parte de la población, debido a su alto valor proteico que ayuda a balancear la dieta en los estratos más bajos de la sociedad. Se han desarrollado numerosos estudios que confirman todo el potencial que tienen para la industria alimentaria por su contenido de almidones, fibra y proteínas (Granito et al., 2010; Pérez y Granito, 2015). El mayor contenido proteico de las semillas de leguminosas está presente en los cotiledones, donde se incluyen las enzimas encargadas de los diferentes procesos de la germinación, tales como las proteasas (Cruz de Carvalho et al., 2001).

Las enzimas proteolíticas tienen numerosos usos en la industria alimentaria (Moral et al., 2015): para desarrollar el cuerpo y el sabor en la cerveza, aumentar la textura y el volumen del pan en la panificación, generar sabores durante la maduración en la producción de quesos, e incluso para mejorar las propiedades de secado del huevo (Prados et al., 2007; Peña y Quirasco, 2014). También son usadas en la producción de hidrolizados de proteínas (Vairo-Cavalli et al., 2008).

La mayor parte de las enzimas usadas a nivel industrial son de origen microbiano (Lorenz y Eck, 2005), ya que tienen como ventaja los altos niveles de producción en corto tiempo y poco espacio. Sin embargo, los procesos de extracción y purificación suelen ser complejos y costosos. Otra fuente usada para obtener enzimas es a partir de órganos de origen animal, tal como los extractos pancreáticos o la pepsina obtenida a partir de vísceras de cerdo (Alberto et al., 2014), la cual también presenta desventajas en cuanto a los rendimientos y los requerimientos de proceso. Este hecho ha motivado el interés en fuentes de origen vegetal, que presentan ventajas tales como bajos costos de inversión en procesos de extracción y purificación, estabilidad en una amplia gama de condiciones operativas (temperatura, pH, salinidad y solventes orgánicos), alta afinidad a una amplia variedad de sustratos y posibilidad de inmovilización (Troncoso et al., 2022). Existe evidencia científica que demuestra la alta concentración de proteasas en las semillas de leguminosas (Abdala et al., 1999; Cruz de Carvalho et al., 2001).

En lo que respecta al proceso de aislamiento de la fracción proteica, diversas investigaciones han propuesto distintas metodologías factibles (Eltayeb et al., 2011; Budić et al., 2016); sin embargo, no existe un método estándar de purificación. Es por ello que se continúan desarrollando estudios en esta área, así como a nivel de los pretratamientos de las semillas para mejorar los rendimientos y propiedades nutritivas, tales como la fermentación (Çabuk et al., 2018).

En consecuencia, dado que las leguminosas son una fuente de proteínas vegetales económicas y que se producen todo el año en los países de clima tropical, se planteó como objetivo diseñar una metodología para aislar y purificar parcialmente proteasas a partir del frijol pico negro (*Vigna unguiculata*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El frijol pico negro (*Vigna unguiculata*) que se utilizó en el estudio fue adquirido en un mercado local de la ciudad de Maracay (Venezuela). Se almacenó a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

Proceso de fermentación

Se empleó el procedimiento propuesto por Granito et al. (2009) con modificaciones, la fermentación fue por 24 h a 37 °C. Cumplido el tiempo, los granos fueron secados en estufa a 40 °C hasta alcanzar un peso constante. El material seco fue conservado a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento.

Homogenización del grano

Se pesaron 100 g de la leguminosa y se homogenizaron usando una licuadora comercial en una proporción 1:3 con agua destilada, haciendo cinco ciclos de molienda de 15 segundos/1 minuto de reposo en hielo. La mezcla obtenida fue filtrada usando un embudo de tallo largo y gasa estéril, y el sobrenadante fue recolectado en un tubo de plástico tipo falcón de 50 mL estéril. El sobrenadante fue sometido a un proceso de centrifugación de 5.000 RPM/5 min a 4 °C para eliminar restos de sedimento. El homogenato se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

Métodos para aislamiento de proteasas

Con el objetivo de obtener los extractos proteicos se utilizaron dos métodos de precipitación: con etanol y por punto isoeléctrico. La precipitación se realizó con semillas sin fermentar y con semillas fermentadas a fin de comparar rendimientos (Figura 1).

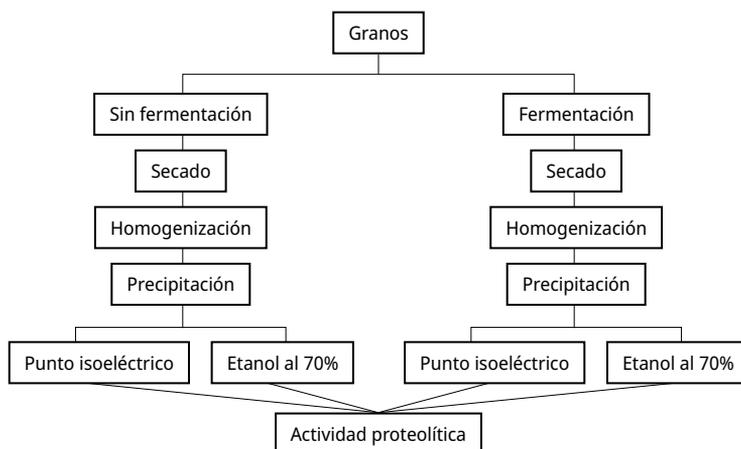


FIGURA 1. Esquema de obtención de los diferentes extractos proteicos.

Precipitación de las proteínas con etanol: se empleó la metodología propuesta por Chávez et al. (2016) con modificaciones. Una muestra de 50 mL del homogenato se precipitó con tres partes de etanol al 70 % frío (0-5 °C) y se dejó en reposo 1 h a 4 °C. Luego, fue sometida a un proceso de centrifugación 1.500 RPM en una centrifuga refrigerada (4 °C). El sedimento fue lavado con agua destilada fría y disuelto en tampón fosfato 100 mM (pH = 7).

Precipitación de las proteínas por punto isoelectrico: se empleó la metodología propuesta por Eltayeb et al. (2011) con modificaciones. Se tomaron 50 mL del homogenato y se colocaron en un *beacker*. Se dispuso en una plancha con agitación a baja velocidad y se incorporó ácido acético glacial (95 %) lentamente de manera progresiva, hasta observar la formación de un precipitado; se detuvo la adición y se dejó en reposo por 10 min. Luego, se sometió a un proceso de centrifugación por 10 min a 5.000 RPM y se separaron las dos fases mediante una decantación. El sedimento fue lavado con agua destilada fría y resuspendido en tampón fosfato 100 mM (pH = 7).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica contra caseína en los extractos proteicos se realizó siguiendo el método modificado de Kunitz (1947). Se preparó una solución de caseína al 1 % previo al ensayo. Se colocó en tubos tipos eppendorf de 1,5 mL la siguiente mezcla: 350 µL de caseína al 1 %, el volumen de la muestra, y se completó a un volumen final de 500 µL con agua destilada. La mezcla se incubó por 30 min a 37 °C y luego se detuvo la reacción añadiendo 500 µL de ácido tricloro acético (TCA) al 10 %, frío. Se centrifugó a razón de 10.000 RPM/5 minutos, y se determinó la absorbancia a 280 nm del sobrenadante.

Recuperación de la actividad proteolítica

Una vez definida la mejor metodología para recuperar la mayor actividad proteolítica, se decidió realizar un proceso de semipurificación usando una cromatografía de exclusión molecular para poder aislar las proteasas presentes en el extracto de proteínas. Para ello se usó una columna de 40 cm de longitud por 2 cm de diámetro empacada con una resina Sephadex G-25, utilizando tampón de fosfato 0,1 mM a pH 7, como eluyente. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Lowry et al. (1951) y la corrida electroforética se desarrolló usando la metodología propuesta por Ojeda et al. (2020).

Estabilidad enzimática

Para estudiar el efecto del pH sobre la actividad enzimática se emplearon soluciones tampón de fosfato 0,1 mM en un rango de pH comprendido entre 4 y 9. Para realizar la evaluación de la estabilidad térmica, se incubaron muestras de extracto crudo durante 15 minutos a 30, 40, 50, 60, 70 y 80 °C. Luego de cada tratamiento, las muestras fueron conservadas en baño de hielo hasta el momento de la determinación de la actividad (Rocha et al., 2010).

Análisis estadístico

Las absorbancias obtenidas a 280 nm en los diferentes ensayos fueron analizadas usando estadística descriptiva para determinar la media y la desviación estándar mediante el programa Excel de Microsoft Office 2016. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de proteasas

De las cuatro condiciones de extracción planteadas en el estudio, los resultados de la actividad enzimática de los extractos se reportan en la Tabla 1. Se observó que el proceso de precipitación a partir de la semilla sin fermentar con etanol fue el que logró una mayor recuperación de la actividad enzimática ($1,03 \pm 0,13$) con respecto a las otras tres condiciones.

TABLA 1. Actividad proteolítica de los extractos.

Metodología	Precipitación	Actividad proteolítica (péptidos solubles) $Abs_{280} \pm DS$
Fermentado	Etanol	$0,38 \pm 0,12$
	Punto isoeléctrico	$0,52 \pm 0,02$
Sin fermentar	Etanol	$1,03 \pm 0,13$
	Punto isoeléctrico	$0,34 \pm 0,09$

Nota: desviación estándar (DS)

Este rendimiento favorable con etanol ya ha sido reportado en la literatura, como lo demuestran los trabajos de Rocha et al. (2010), quienes aislaron una proteinasa aspártica del fruto (*Salpichroa organifolia*) usando etanol y obtuvieron excelentes resultados. Así como el trabajo de Ojeda et al. (2012), quienes utilizaron etanol para precipitar y recuperar un extracto con actividad proteolítica de un cultivo de *Lactobacillus casei*.

En lo que respecta a los bajos valores encontrados en las semillas fermentadas, debe estar asociado directamente a la actividad biológica de los microorganismos. Tal como lo explica Granito et al. (2002), durante el proceso de fermentación se reduce sustancialmente el contenido de algunos factores antinutricionales presentes en la semilla (como los inhibidores de proteasas), estimulando la actividad de las enzimas proteolíticas presentes en la semilla, lo que podría producir una disminución en la recuperación de la actividad enzimática.

En el caso de la precipitación por punto isoeléctrico en semillas sin fermentar, la baja actividad puede estar asociada a una desnaturalización irreversible provocada por la acción del agente químico empleado (ácido acético), que provocó una pérdida considerable en la actividad.

Es importante destacar que una de las ventajas del método de extracción planteado en este estudio es la generación de subproductos con valor agregado. Tal es el caso del pellet obtenido después de la homogenización, rico en carbohidratos, con un remanente de proteínas y lípidos insolubles, el cual puede ser utilizado para la producción de harinas en la industria alimentaria. O como el caso del etanol presente en el sobrenadante después de la precipitación, que puede ser sometido a un proceso de destilación para su reutilización; lo que incrementa la factibilidad y sostenibilidad de esta metodología.

Fraccionamiento del extracto proteolítico

Se procesó un volumen de 2 mL del extracto obtenido después de la precipitación con etanol y se recolectaron fracciones de 1 mL. Los resultados del proceso de purificación parcial por cromatografía se presentan en la Figura 2. El patrón de separación observado en la cromatografía muestra la mayor proporción de proteínas entre las fracciones 10 y 12, alcanzando su máxima absorbancia en la 11.

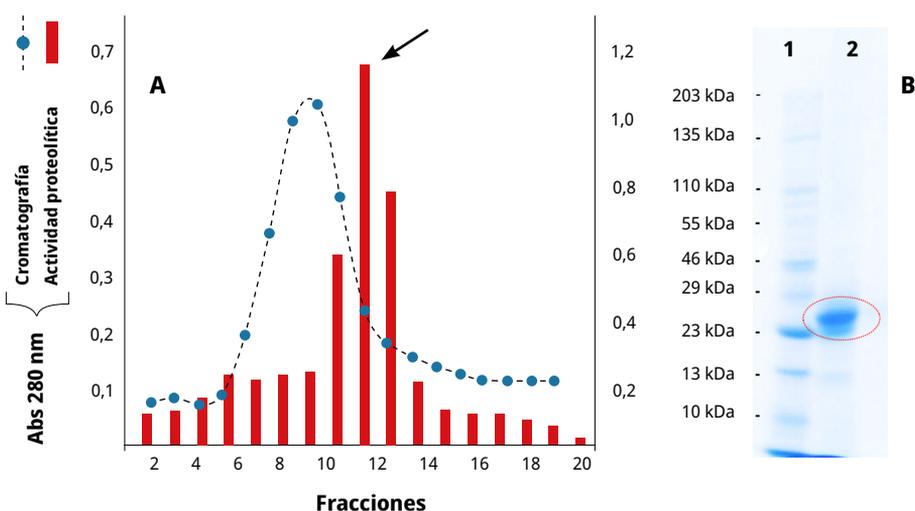


FIGURA 2. Purificación parcial de las proteasas del frijol. A) Perfil proteico y actividad proteolítica de las fracciones luego de la separación cromatográfica. B) Patrón polipeptídico de la fracción con mayor actividad proteolítica. Carril 1 marcador de peso molecular, Carril 2 corresponde a la fracción (11) con máxima actividad proteolítica.

En vista de que la resina de Sephadex G-25 separa las moléculas por su tamaño y las leguminosas poseen proteínas de diferentes pesos moleculares como las albúminas, globulinas, glutelinas y prolaminas (Perazzini et al., 2008), se esperaba obtener diferentes picos en el perfil cromatográfico. Los resultados observados pueden estar asociados con la acción de las proteasas presentes en el extracto sobre el resto de las proteínas presentes en la fracción.

En lo que respecta a la electroforesis (Figura 2B), se observan varias bandas entre el intervalo de 25 y 30 kDa. Ese bajo peso molecular es el esperado para enzimas hidrolíticas con actividad proteolítica. El resultado coincide con lo encontrado por Abdala et al. (1999),

quienes aislaron una aminopetidasa a partir del *Phaseolus vulgaris*, con un peso molecular cercano a los 30 kDa y un pH óptimo de 7; y lo hallado por Budič et al. (2016), quienes aislaron una enzima proteolítica del tipo serin proteasa a partir del *Phaseolus vulgaris* con un peso molecular de 37 kDa. Esto demuestra que el proceso de purificación diseñado fue efectivo.

Una vez que se purificó parcialmente el extracto, se procedió a determinar el efecto del pH y la temperatura sobre su actividad. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

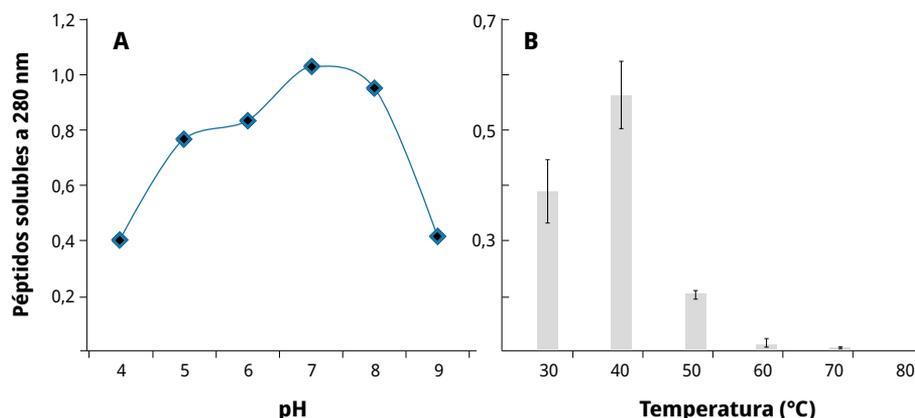


FIGURA 3. Determinación de la estabilidad de las proteasas semipurificadas en este estudio. A) Efecto del pH y B) Efecto de la temperatura.

Como se observa en la figura, el extracto mostró un amplio intervalo de actividad (entre 5 y 8), siendo el pH 7 donde presentó el máximo valor de actividad. Este resultado muestra similitud con lo reportado por Sinche (2009), quien encontró que las proteasas contenidas en el latex de *Vasconcella stipulata* tienen su máxima actividad entre 7 y 8. Sin embargo, no coincide con el mostrado por otras proteasas de origen vegetal. Graterol et al. (2007) aislaron una proteasa a partir de *Thevetia ahouai*, y presentó baja actividad hasta pH 7 y su máximo a pH 8. Por su parte, Rocha et al. (2010) aislaron una proteasa a partir de *Salpichroa origanifolia*, y tuvo su máxima actividad a pH inferiores de 5 (encontrándose el máximo a 3,5). Es conveniente mencionar que el intervalo donde las enzimas presentan su actividad va a depender de la función que cumplen en el fruto, la planta o, en este caso, la semilla.

En lo que respecta al efecto de la temperatura sobre la actividad (Figura 3B), como se utilizaron valores de temperaturas con una variación de 10 °C, es posible sugerir que las proteasas tienen una máxima estabilidad entre un intervalo de 35 y 45 °C. Este resultado difiere de los encontrados por Asif-Ullah et al. (2006), quienes aislaron una proteasa de *Cucumis trigonus* y su óptimo de temperatura fue de 70 °C. Sin embargo, el resultado obtenido en el estudio concuerda con el sugerido por Antão y Malcata (2005) para este tipo de enzimas, pues estos autores sugieren que la temperatura óptima está entre 20 y 50 °C.

Con una estabilidad térmica como la observada, es posible sugerir su incorporación en procesos industriales que no requieran temperaturas tan altas, como un suavizador de carne, que por lo general actúa a temperatura ambiente.

CONCLUSIONES

Se diseñó una metodología que permitió recuperar gran parte de la actividad proteolítica presente en el grano. Se demostró que el proceso de fermentación afecta la tasa de recuperación enzimática en comparación a la extracción hecha en granos sin fermentar. Se logró obtener un extracto parcialmente purificado con una baja presencia de contaminantes. El extracto mostró actividad entre los pH 5 y 8, siendo 7 donde presentó el máximo valor de actividad y su óptimo de temperatura fue entre 35 y 45 °C.

REFERENCIAS

- Abdala, A.; Takeda, I.; Freitas J. y Alves, K., 1999. Purification and partial characterization of *Phaseolus vulgaris* seed aminopeptidase. En: *Brazilian Journal Medicine Biology Research*, 32(12), pp. 1489-92. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1999001200006>.
- Alberto, M.; Savón, L.; del Rivero, M.A. y Farruggia, B., 2014. Digestibilidad in vitro de la proteína con crudos enzimáticos, obtenidos de residuos de matadero [En línea]. En: *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(4), pp. 353-357. [Consulta: 13 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193033033008.pdf>
- Antão, C. y Malcata, X., 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. En: *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(1), pp. 637-650. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.05.001>.
- Asif-Ullah, M.; Kim, K-S y Yu, YG., 2006. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus Roxburgui*. En: *Phytochemistry*, 67(1) pp. 870-5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.020>.
- Budič, M.; Cigić, B.; Šoštarič M.; Sabotič, J.; Meglič, V.; Kos J. y Kidrič, M., 2016. The response of aminopeptidases of *Phaseolus vulgaris* to drought depends on the developmental stage of the leaves. En: *Plant Physiology and Biochemistry*, 109(1), pp. 326-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.10.007>.
- Çabuk, B.; Nosworthy, M.G.; Stone, A.K.; Korber, D.R.; Tanaka, T.; House, J.D. y Nickerson, M.T., 2018. Effect of fermentation on the protein digestibility and levels of non-nutritive compounds of pea protein concentrate. En: *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), pp. 257-264. DOI: <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5450>
- Cruz de Carvalho, M.; D'Arcy-Lameta, A.; Roy-Macauley, H.; Gareila, M.; El Maarouf, H.; Pham-Thia, A. y Zuily-Fodil, Y., 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. En: *FEBS Letters*, 492, pp. 242-246. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02259-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02259-1)
- Chávez, A.; Acevedo, S.; Valbuena, A. y Colina, M., 2016. Extracción y caracterización de proteínas recuperadas en el proceso de producción de quitosano [En línea]. En: *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 17(2) pp. 102-109. [Consulta: 15 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://reviberpol.files.wordpress.com/2019/07/2016-chavez.pdf>
- Eltayeb, A.; Ali A.; Abou-Arab, A. y Abu-Salem, F., 2011. Chemical composition and functional properties of flour and protein isolate extracted from Bambara groundnut

- (*Vigna subterranean*) [En línea]. En: *African Journal and Food Science*, 5(2), pp. 82–90. [Consulta: 10 de mayo de 2023]. Disponible en: https://academicjournals.org/article/article1379513329_Eltayeb%20et%20al.pdf
- Granito, M.; Frías, J.; Doblado, R.; Guerra, M.; Champ, M. y Vidal-Valverde, C., 2002. Nutritional improvement of beans (*Phaseolus vulgaris*) by natural fermentation. En: *European Food Research and Technology*, 214, pp. 226–231. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0450-5>
- Granito, M.; Guinand, J.; Pérez, D. y Pérez, S., 2009. Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* procesada: un ingrediente potencial para alimentos [En línea]. En: *Interciencia*, 34(2), pp. 64-70. [Consulta: 16 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2018/01/064-c-GRANITO-7.pdf>
- Granito, M.; Valero, Y. y Zambrano, R., 2010. Desarrollo de productos horneados a base de leguminosas fermentadas y cereales destinados a la merienda escolar [En línea]. En: *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(1), pp. 85-92. [Consulta: 10 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2010/1/art-13/>
- Graterol, H.; Amaíz, L.; Torquati, T. y Contreras, L., 2007. Determinación y caracterización parcial de proteasas obtenidas del fruto *Thevetia ahouai* (L.) A.DC [En línea]. En: *FARAUTE Ciencia y Tecnología*, 2(2), pp. 16-25. [Consulta: 10 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/facyt/v2n2/2-2-2.pdf>
- Kunitz, M., 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor, II. General properties. En: *Journal Genetic and Physiology*, 30(4), pp. 291-310. DOI: <https://doi.org/10.1085/jgp.30.4.291>
- Lorenz, P. y Eck, J., 2005. Metagenomics and industrial applications. En: *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), pp. 510-516. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1161>
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. y Randall, R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent [En línea]. En: *Journal Biology and Chemistry*, 193(1), pp. 265-275. [Consulta: 10 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
- Moral, S.; Ramírez-Coutiño, L.P. y García-Gómez, M., 2015. Aspectos relevantes del uso de enzimas en la industria de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2(3), 87-102. [Consulta: 16 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2015/mayo/1000102.pdf>
- Ojeda, L.; Noguera, N.; Hurtado, D.; Iamarino, M. y Hernández, S., 2012. Obtención de un extracto proteolítico con potencial uso en la industria farmacéutica [En línea]. En: *Avances en Ciencias de la Salud*, 2(1), pp. 44-49. [Consulta: 02 de enero de 2023]. Disponible en: <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/avances/vol2n1/art07.pdf>
- Ojeda, L.; Zoghbi, N.; Noguera-Machado, N.; Lucero, L.; Meléndez, G. y Triana, J., 2020. Extracción y purificación parcial de peroxidasa de rabano (*Raphanus sativus*) [En línea]. En: *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 7(1), pp. 50-56. [Consulta: 10 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://www.reibci.org/publicados/2020/jul/3900104.pdf>
- Peña, C. y Quirasco, M., 2014. ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible [En línea]. En: *Revista Digital Universitaria*, 15(12), pp.1-13. [Consulta: 10 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/art94.pdf>

- Perazzini, R.; Leonardi, D.; Ruggeri, S.; Alesiani, D.; D'Arcangelo, G. y Canini, A., 2008. Characterization of *Phaseolus vulgaris* L. landraces cultivated in central Italy. En: *Plant Food for Human Nutrition*, 63(4), pp. 211-218. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0095-7>
- Pérez, S. y Granito, M., 2015. Formulación de emulsiones estabilizadas con concentrados proteicos de granos fermentados y sin fermentar de *Phaseolus vulgaris* [En línea]. En: *Revista de la Facultad de Agronomía del Zulia*, 32(2), pp. 261-281. [Consulta: 16 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/27183>
- Prados, F.; Pino, A. y Fernández-Salguero, J., 2007. Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 42(5), pp. 556-561. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01271.x>
- Rocha, G.; Fernández, G. y Parisi, M., 2010. Estudios de caracterización cinética y fisicoquímica de una proteinasa aspártica aislada de frutos maduros de *Salpichroa organifolia* [En línea]. En: *Información Tecnológica*, 21(2), pp.21-28. [Consulta: 10 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v21n2/art04.pdf>
- Sinche, M., 2009. *Aislamiento, purificación parcial y caracterización cinética de las proteasas presentes en el látex de los frutos de una planta del género Vasconcella* [En línea]. Quito: Escuela Politécnica Nacional. (Tesis de Grado). [Consulta: 22 de abril de 2023]. Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/1661>
- Troncoso, F.; Sánchez, D. y Ferreira M., 2022. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. En: *Chemistry Open*, 11(3), pp. 1-38. DOI: <https://doi.org/10.1002/open.202200017>
- Vairo-Cavalli, S.; Silva, S.; Cimino, C.; Malcata, X. y Priolo, N., 2008. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. En: *Food Chemistry*, 106(3), pp. 997-1003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.015>

Optimización del comportamiento reológico de una bebida láctea a base de lactosuero formulada con distintos hidrocoloides

Optimization of rheological behavior of a whey-based milky drink formulated with different hydrocolloids

Otimização do comportamento reológico de uma bebida láctea à base de soro de leite formulada com diferentes hidrocoloides

 **LORENZO IVÁN LEURINO KLING** (1)

 **JUAN DIEGO CORTEZ LATORRE** (2)

 **SERGIO DARÍO ROZYCKI** (1)

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

(2) Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay, Escuela de Ciencias Agropecuarias y Agroindustriales. Urcuquí, Ecuador.

RECIBIDO: 31/5/2023 → APROBADO: 11/9/2023 ✉ lorenzoleurino1807@gmail.com

RESUMEN

La emergente tendencia del uso de lactosuero en el desarrollo de alimentos radica en evitar la contaminación y promover la economía circular en las industrias lácteas. El objetivo de este trabajo fue optimizar una formulación de una bebida láctea acidificada no fermentada a partir de lactosuero, con propiedades reológicas similares a las de un yogur bebible marca líder del mercado argentino. Para ello, se partió de una formulación base conformada por suero reconstituido, polvos lácteos y azúcar, a la cual se le fijó un 0,142 % de estabilizantes y para su acidificación se usó ácido láctico hasta alcanzar un pH de 4,6. Se utilizó un diseño experimental de mezclas de tres factores (almidón modificado, gelatina y una combinación de gomas guar y garrofín en partes iguales) con tres niveles (concentraciones de 0,028 %, 0,057 % y 0,085 %) y un punto central. Las respuestas evaluadas fueron viscosidad aparente (entre 0 y 200 s⁻¹) y determinados parámetros de modelos reológicos (límite de fluencia, índice de comportamiento, etcétera). Asimismo, se caracterizó al yogur control registrando las variables mencionadas. Se obtuvieron modelos predictivos para cada respuesta que posibilitaron evidenciar los efectos de cada hidrocoloide en la bebida y, mediante optimización de respuestas múltiples, determinar

las concentraciones de almidón (0,028 %), gelatina (0,059 %) y gomas (0,054 %) que permiten obtener una bebida con características semejantes al yogur comercial.

Palabras clave: estabilizantes, suero, revalorización, yogur bebible, reología.

ABSTRACT

The emerging trend in the use of cheese whey in food development lies in avoiding contamination and promoting the circular economy in dairy industries. This work aimed to optimize a formulation for developing a non-fermented acidified dairy beverage from whey, with rheological properties similar to those of a leading drinkable yogurt brand in the Argentine market. For this, a base formulation with reconstituted whey, dairy powders, and sugar was prepared, to which 0.142 % stabilizers were added, and for its acidification, lactic acid was used until reaching a pH of 4.6. A mixture experimental design of three factors (modified starch, gelatin, and a combination of guar and locust bean gum in equal parts) with three levels (0.028 %, 0.057 %, and 0.085 % concentrations) and a central point were used. The responses evaluated were apparent viscosity (between 0 and 200 s⁻¹) and rheological model parameters (yield strength, behavior index, etc.). Likewise, the control yogurt was characterized by recording the same mentioned variables. Predictive models were obtained for each response and the effect of each hydrocolloid in the beverage. In turn, the concentrations of starch (0.028 %), gelatin (0.059 %), and gums (0.054 %) were determined by optimizing multiple answer, which will allow obtaining a beverage with similar characteristics to commercial yogurt.

Keywords: stabilizers, whey, revalorization, drinkable yogurt, rheology.

RESUMO

A tendência emergente no uso de soro de queijo no desenvolvimento de alimentos está em evitar a contaminação e promover a economia circular nas indústrias de laticínios. O objetivo deste trabalho foi otimizar uma formulação para o desenvolvimento de uma bebida láctea acidificada não fermentada de soro de leite, com propriedades reológicas semelhantes às de um iogurte bebível de marca líder no mercado argentino. Para isso, foi iniciada uma formulação base composta por soro de leite reconstituído, leite em pó e açúcar, ao qual foram adicionados 0,142 % de estabilizantes, e para sua acidificação foi usado ácido láctico até obter um pH de 4,6. Foi utilizado um delineamento experimental de misturas de três fatores (amido modificado, gelatina e uma combinação de gomas guar e alfarroba em partes iguais) com três níveis (concentrações de 0,028 %, 0,057 % e 0,085 %) e um ponto central. As respostas avaliadas foram a viscosidade aparente (entre 0 e 200 s⁻¹) e os parâmetros do modelo reológico (ponto de escoamento, índice de comportamento, etc.). Da mesma forma, o iogurte controle foi caracterizado pelo registro das variáveis mencionadas. Modelos preditivos foram obtidos para cada resposta que permitiram evidenciar os efeitos de cada hidrocoloide na bebida. Por sua vez, otimizando respostas múltiplas, foram determinadas as concentrações de amido (0,028 %), gelatina

(0,059 %) e gomas (0,054 %), o que permitirá obter uma bebida com características semelhantes ao iogurte comercial.

Palavras-chave: estabilizantes, soro, reavaliação, iogurte bebível, reologia.

INTRODUCCIÓN

Históricamente, el suero fue prescrito por Hipócrates para el control de ciertos problemas de salud. No obstante, con el aumento de la producción de quesos el suero se convirtió en una molestia para el productor. Por eso, una práctica común es rociarlo sobre campos o descargarlo en ríos, lagos y cauces de agua, ocasionando un elevado nivel de contaminación medioambiental (Smithers, 2008; Carvalho et al., 2013; Delmonte et al., 2022).

En las últimas décadas, frente a una estricta legislación sobre el tratamiento de efluentes, se desarrollaron varios derivados como suero en polvo, suero desmineralizado en polvo (DEMIs), concentrados de sus proteínas (WPC) y lactosa de grado alimenticio. Sin embargo, solo son rentables cuando se procesa un volumen superior a 300.000 litros por día y requieren una elevada inversión inicial, por lo que estas tecnologías no representan una solución para artesanos y pymes lácteas (Smithers, 2008; Delmonte et al., 2022).

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina (INDEC), más del 75 % de la población mundial consume productos lácteos y en Argentina este porcentaje se ha incrementado en los últimos años (FAO, s.d.; INDEC, s.d.). Entre estos, las bebidas lácteas están ganando importancia en el mercado, siendo las de mayor interés aquellas que otorgan un beneficio a la salud y tienen un enfoque sustentable (Mordor Intelligence, s.d.).

Por lo general, la viscosidad de las bebidas lácteas es superior a la de las leches fluidas, mientras que el pH suele ser más bajo, cercano al de un yogur convencional. Además, entre las etapas de elaboración, se encuentran procesos como la homogeneización, tratamientos térmicos y acidificación que permitirían obtener la calidad óptima deseada en la bebida final (Mudgil y Barak, 2019).

El Código Alimentario Argentino (CAA), en su capítulo VIII, define a las bebidas lácteas como aquel producto que posee un porcentaje mayor al 51 % de leche y/u otros derivados lácteos. Establece además un listado de ingredientes y aditivos permitidos (Argentina. Ministerio de Salud, 1996).

En ese sentido, el desarrollo de bebidas lácteas a partir de lactosuero es una adecuada estrategia de revalorización para aprovechar sus elementos funcionales y nutricionales como inmunoglobulinas, lactoferrina y lactoperoxidasa, entre otros, y disminuir la existencia de un efluente de difícil y costoso tratamiento, promoviendo una economía circular dentro de la industria láctea, que le dará un carácter altamente competitivo en el mercado (Smithers, 2008). A diferencia de las bebidas fermentadas, las cuales requieren largos tiempos de elaboración y de fermentadores de gran tamaño, es posible el uso de ácidos orgánicos como reguladores del pH. Incluso se ha evidenciado que la ingesta de ácido láctico tiene beneficios asociados al intestino y a la regulación de los macrófagos, entre muchos otros (Sun et al., 2021).

Por otro lado, el comportamiento reológico de los fluidos es la base para el diseño y control de procesos industriales, como así también un determinante en el grado de aceptación al momento de consumir alimentos fluidos. Dentro de los modelos reológicos más difundidos y utilizados se encuentran el de la ley de la potencia, el de Casson, y el de Herschel y Bulkley. A su vez, los parámetros obtenidos de dichos modelos, como el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento (n), son utilizados para el cálculo de la pérdida de carga, caudal volumétrico y velocidad de circulación para fluidos no newtonianos (Larenas, 2010).

Actualmente el uso de hidrocoloides es una práctica común para lograr características fisicoquímicas, reológicas, texturales y sensoriales deseadas, así como para reducir defectos (desprendimiento superficial de líquido, falta de consistencia, etcétera). En el caso de bebidas lácteas, los principales problemas son las variaciones en la viscosidad frente a tratamientos mecánicos y térmicos, y la sinéresis durante las etapas de almacenamiento (Hugunin et al., 2009). Por ejemplo, la gelatina se caracteriza por brindar una sensación bucal agradable (mouth-feel), de permanencia del alimento en la boca, y el almidón actúa como agente espesante, por lo que se ha estudiado su influencia en otras matrices alimenticias como quesos untables y postres lácteos, a partir de leche y lactosuero, observándose que influye significativamente sobre su consistencia y cremosidad de manera favorable (Sarbon et al., 2015; Delmonte et al., 2022). Es importante destacar que el almidón y la gelatina, además de presentar efectos positivos sobre la reología y textura del producto, tienen la ventaja de ser materias primas regionales en la Provincia de Santa Fe, Argentina.

Por otro lado, hidrocoloides como las gomas suelen utilizarse debido a que otorgan una mayor resistencia o estabilidad ante los procesos físicos como la sedimentación o desagregación mecánica, que pueden ocurrir durante el transporte y almacenamiento (Marcotte et al., 2001). La combinación de hidrocoloides permite el aprovechamiento de sus interacciones sinérgicas. Asimismo, se ha visto que el remplazo de una fracción de almidón por gomas guar y garrofín resulta en una disminución de la sinéresis y un aumento de la viscosidad, además de impartir estabilidad en el tiempo (BeMiller, 2011; Joyner y Damiano, 2015; Yousefi y Jafari, 2019; Brighenti et al., 2020).

El presente trabajo tiene como objetivo optimizar la formulación de una bebida láctea acidificada no fermentada, a partir de suero de quesería, de modo de que tenga una alta probabilidad de aceptabilidad en los potenciales consumidores. Ante la ausencia de productos de similar naturaleza que tengan una fuerte posición en el mercado argentino, se ha considerado como testigo un yogur marca líder. Para esto se han estudiado y modelado las variaciones en el comportamiento reológico (viscosidades aparentes, límite de fluencia e índices de comportamiento, consistencia y tixotrópico) como consecuencia de distintas concentraciones de almidón modificado, gelatina y una mezcla 50/50 de gomas guar y garrofín, con una posterior optimización, de manera de que las propiedades en estudio se asemejen al testigo elegido. Cabe aclarar que se respetaron los estándares y requisitos impuestos por el CAA correspondientes a la clasificación de bebidas lácteas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de una bebida láctea testigo

Se utilizó un yogur bebible de una marca reconocida y bien posicionada en el mercado argentino, del cual se evaluaron sus propiedades reológicas de acuerdo con la metodología descrita en el apartado titulado "Análisis reológico".

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de mezclas de 3 factores (hidrocoloides en estudio: gelatina, almidón modificado y una mezcla de partes iguales de gomas guar y garrofin). La suma de los tres factores se mantiene constante e igual a 0,142 %, como se indica en el diagrama ternario (Figura 1). En la totalidad del trabajo, todas las concentraciones son expresadas en peso/peso.

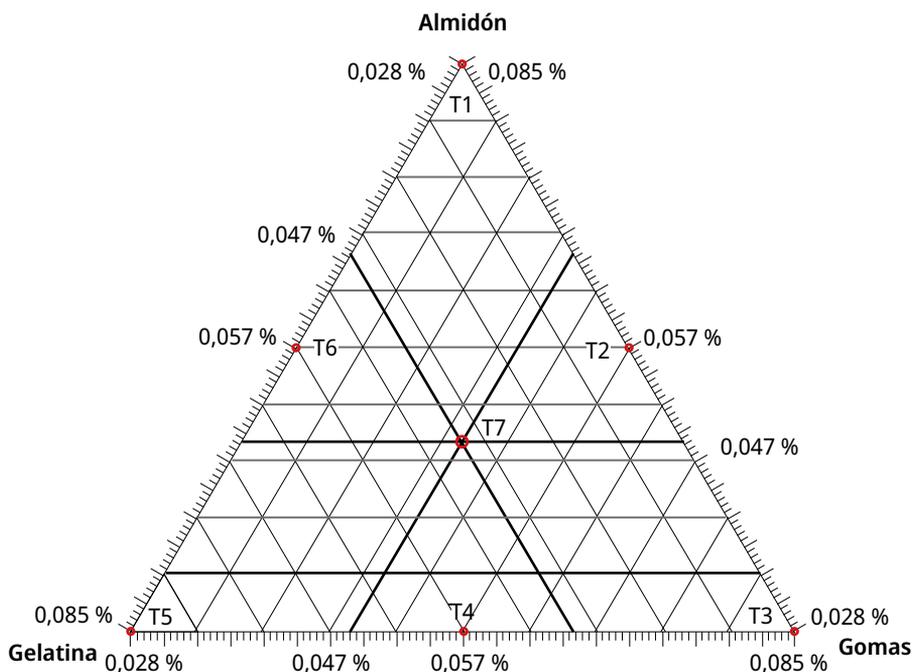


FIGURA 1. Esquema del diseño de mezcla con los 7 tratamientos posicionados según su composición de hidrocoloides.

De acuerdo con lo establecido por el CAA, se evaluaron concentraciones de los hidrocoloides establecidas en referencias bibliográficas, y a partir de ensayos previos no publicados se estableció una composición global de hidrocoloides de 0,142 %. Teniendo en cuenta esto, se llevaron a cabo 7 tratamientos y una repetición del punto central (por duplicado), según se detalla en la Tabla 1.

TABLA 1. Composición de almidón, gelatina y mezcla de gomas de los distintos tratamientos del diseño experimental.

Tratamiento	Almidón	Gelatina	Gomas
1	0,085 %	0,028 %	0,028 %
2	0,057 %	0,028 %	0,057 %
3	0,028 %	0,028 %	0,085 %
4	0,028 %	0,057 %	0,057 %
5	0,028 %	0,085 %	0,028 %
6	0,057 %	0,057 %	0,028 %
7	0,047 %	0,047 %	0,047 %

Análisis estadístico

Para cada una de las variables respuesta se utilizó un modelo matemático de segundo orden (1) en función de las 3 variables estudiadas, haciendo uso del software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc., 2009). Las variables se utilizaron de forma codificada, tomando los valores de 1, 0,5, 0,33 y 0 para las distintas posiciones en el diagrama ternario. Una vez ajustados, dichos modelos permitieron predecir y describir el comportamiento del sistema, y de las propiedades reológicas de las bebidas, dentro del rango experimental analizado.

$$y_i = a_{11}X_1 + a_{22}X_2 + a_{33}X_3 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3 \quad (1)$$

Donde: a_{11} , a_{22} , a_{33} , a_{12} , a_{13} y a_{23} son los coeficientes del modelo, y_i es la respuesta analizada y X_1 , X_2 , y X_3 son las concentraciones codificadas de almidón, gelatina y la mezcla de gomas, respectivamente.

Los coeficientes de los términos lineales (X_1 , X_2 y X_3) permiten inferir en qué manera y magnitud influyen cada uno de los estabilizantes sobre la variable en estudio, mientras que los coeficientes de términos combinados se relacionan con el efecto antagónico o sinérgico debido a la interacción de a pares.

Una vez desarrollados los modelos matemáticos para cada respuesta (y_i), se determinaron las condiciones de proceso más adecuadas, para lo cual se utilizó la metodología de optimización de respuestas múltiples (Derringer y Suich, 1980). Esta metodología permitió determinar los valores de los factores experimentales que satisfacen las características deseadas para más de una respuesta, simultáneamente.

En este trabajo se adoptaron como valores deseables los obtenidos como respuestas en los análisis de la bebida láctea testigo, el yogur bebible comercial de primera marca del mercado argentino (Tabla 9). Para usar este procedimiento primero se construyen los modelos matemáticos (polinomio de segundo orden) para cada respuesta en función de las

variables estudiadas, y luego se define una función de deseabilidad para cada respuesta. Un valor D (deseabilidad global) diferente de cero implica que todas las respuestas están simultáneamente en un rango deseable. Para un valor D cercano a 1, la combinación de los diferentes criterios es globalmente óptima (StatPoint Technologies, Inc, 2010).

Proceso de producción

La formulación base se obtuvo a partir de ensayos preliminares y balances de masa previamente realizados. Las bebidas fueron elaboradas con 84 % de suero reconstituido (a 6,5 % de ST), a partir de suero en polvo desmineralizado (DEMI 40, Lácteos La Cristina S.A.), el cual debió ser reemplazado por suero líquido proveniente del proceso de elaboración de queso al momento de escalar la producción. Además, se formularon con un 5 % de leche en polvo entera y leche en polvo descremada (Milkaut S.A., SanCor), 1 % de WPC-35 (Milkaut S.A.), 5 % de azúcar y cantidades variables de gelatina (PB Leiner), almidón modificado (Glutal S.A.) y gomas guar y garrofín (Veneto S.A.), según el diseño experimental (Tabla 1). Asimismo, la formulación base posee 200 ppm de sorbato de potasio, utilizado como agente conservante. Se reconstituyó el suero a partir del suero en polvo y agua a una temperatura de 45-50 °C, manteniendo una agitación constante hasta su completa disolución. Posteriormente se disolvieron los polvos lentamente y se incrementó progresivamente la temperatura hasta alcanzar 90 °C, manteniendo esta temperatura durante 5 minutos.

Luego se enfrió hasta 40-45 °C en baño de agua helada, añadiéndose el sorbato de potasio ($C_6H_7KO_2$) y ácido láctico hasta alcanzar un pH de $4,6 \pm 0,1$. Finalmente, se procedió al envasado y almacenamiento del producto terminado a una temperatura de 5-6 °C.

En la Tabla 2 se presenta la composición de grasas, proteínas y azúcares de las materias primas brindadas por las empresas productoras.

TABLA 2. Composición aproximada de materias primas.

Compuesto	Suero en polvo	LPD	LPE	WPC
Grasas	Máx. 1,5 %	0,0 %	26 %	2,2 %
Proteínas	Mín. 12 %	36 %	26 %	38,3 %
Carbohidratos	Mín. 75 %	50 %	36 %	48,8 %

LPD: leche en polvo descremada; LPE: leche en polvo entera; WPC: whey protein concentrate.

Análisis reológico

Las propiedades reológicas se estudiaron mediante el uso de un reómetro Thermo Scientific™ HAAKE™ MARS™ 40, con módulo de temperatura TM-PE-C y geometría de cilindros concéntricos CC25 DIN Ti. Se realizó un test de rampa continua ascendente-descendente de gradiente de deformación (GD) ($\dot{\gamma}$) entre 0 y 200 s⁻¹, a una temperatura de

5 °C. Se registró para cada valor de gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) el esfuerzo de corte (τ) y la viscosidad aparente (μ_a).

A partir del ajuste de los modelos de Casson modificado (2) y Herschel y Bulkley (3) se obtuvieron, para cada tratamiento y para el yogur testigo, el límite de fluencia (τ_0), índice de comportamiento (n), índice de consistencia (K) e índice de tixotropía (IT), este último definido como el área entre la curva ascendente y descendente del reograma (gráfica de esfuerzo de corte en función del gradiente de deformación). Además, se tomaron valores de viscosidad aparente (μ_a) a distintos gradientes de deformación (μ_{50} , μ_{100} , μ_{150} y μ_{200}), siendo la primera de ellas (μ_{50} , viscosidad de Kokini) la de mayor interés por simular las condiciones de masticación durante el consumo del producto (Elejalde y Kokini, 1992).

La importancia de obtener un comportamiento reológico a mayores gradientes de deformación similar al de los yogures, producto presente en la mayoría de las empresas lácteas, está asociada a una fácil adaptación de las operaciones industriales actualmente utilizadas, como homogeneizado, tratamientos térmicos, envasado, etcétera. De este modo, los procesos de producción podrán ponerse a punto sin necesitar un elevado capital inicial para nuevos equipos.

$$\tau^{0,5} = \tau_0^{0,5} + (\eta_p \times \dot{\gamma})^{0,5} \quad (2)$$

$$\tau = \tau_0 + (K \times \dot{\gamma})^n \quad (3)$$

Análisis fisicoquímico

Con el fin de llevar un control sobre la bebida elaborada se realizaron medidas (por duplicado) del contenido en grasas, proteína, humedad, cenizas y acidez titulable.

La determinación de grasa se realizó por una adaptación al método de análisis FIL 105:1981 para leche (Federación Internacional de Lechería, 1981), mediante un butirómetro de leche, manteniendo a baño maría a 65 °C y posterior centrifugación.

La determinación de proteína se realizó según el método 16.036 de la AOAC International (1984), que corresponde al método Kjeldhal. El mismo comprende tres etapas: digestión, destilación y titulación. Para la conversión de nitrógeno a proteína de la leche se utilizó un factor de 6,38.

Para la determinación de humedad y sólidos totales se realizó un método basado en un análisis gravimétrico según el método de análisis FIL 4A:1982 (Federación Internacional de Lechería, 1982). Se colocaron 10 g de muestra en placas de Petri, previamente taradas, en estufa a 65 °C por 12 horas y luego por intervalos de 1 h, hasta obtener pesada constante.

Del mismo modo, para la determinación del contenido de cenizas totales se procedió según el método 16.035 de la AOAC International (1984). Se colocaron 10 g de muestra en crisoles, previamente secados y tarados, en mufla a 505 °C por 2 horas. Luego de

ser pesados se colocaron nuevamente en mufla en intervalos de 1 hora, hasta obtener pesada constante.

Los ensayos para la determinación de la acidez titulable consistieron en el cálculo de °D (grados Dornic) a partir de la titulación de 10 mL de muestra con una solución Dornic (NaOH 1/9N), utilizando fenolftaleína como indicador.

La determinación de acidez se realizó por duplicado según el método 920.124 de la AOAC International (2000), utilizando solución Dornic (NaOH 1/9N), y fenolftaleína como indicador. La cantidad de muestra utilizada fue de 10 mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bebidas elaboradas presentaron una composición química promedio de 2,40 % ($\pm 0,05$ %) de grasa y 4,33 % ($\pm 0,05$ %) de proteína. Además, las medidas de humedad y cenizas fueron 77,62 % ($\pm 0,06$ %) y 1,02 % ($\pm 0,02$ %), respectivamente. A partir del valor de humedad hallado se deduce por diferencia que el porcentaje de sólidos totales de la bebida elaborada es del 22,40 % ($\pm 0,06$ %). La acidez registrada fue de 77,6 °D ($\pm 0,2$ °D) y como ya se ha mencionado, un pH de 4,60 $\pm 0,01$.

A nivel comercial, existe mucha variabilidad respecto a la composición nutricional del yogur. Dicha diversidad depende del tipo de leche usada en la elaboración, del tiempo y tipo de fermentación, o del eventual contenido de agregados (Chandan et al., 2008). A modo de referencia, se presentan valores de porcentaje de grasa y proteína para leche entera y descremada, y yogur entero y descremado (Balcázar, 2011) (Tabla 3). Se estima además la cantidad de sólidos totales, como la suma de las cantidades de grasa, proteína, carbohidratos y minerales y se muestra la composición de macronutrientes del yogur testigo. Respecto a la bebida elaborada en el presente trabajo, las cantidades de proteína se asemejan a las de un yogur descremado, siendo éste el producto puramente lácteo más proteico, con un contenido algo menor de sólidos totales. Por otro lado, se observa que los niveles de grasa se encuentran por debajo de los de la leche y yogur enteros. Estos dos aspectos resultan muy favorables considerando la creciente tendencia en el consumo de productos saludables y nutritivos, total o parcialmente descremados (Balcázar, 2011).

TABLA 3. Composición de leche y yogur (Balcázar, 2011).

Compuestos	Leche entera	Leche descremada	Yogur entero	Yogur descremado	Yogur de frutas	Bebida desarrollada	Yogur testigo
Proteínas	3,5 %	3,3 %	3,9 %	4,5 %	5,0 %	4,3 %	2,8 %
Grasa	4,25 %	0,13 %	3,4 %	1,6 %	0,25 %	2,4 %	0,6 %
Carbohidratos	4,75 %	5,1 %	4,9 %	6,5 %	18,6 %	14 %	9,5 %
Cenizas	0,42 %	0,41 %	0,49 %	0,51 %	0,58 %	1,02 %	0,32 %
Sólidos totales	12,9 %	8,9 %	12,7 %	13,1 %	24,4 %	21,7 %	13,2 %

Con respecto a los sólidos totales, resultaron ser más altos que los de las leches y yogures reportados en la bibliografía, a excepción de aquellos que son formulados con edulcorantes o frutas. La formulación de la bebida propuesta en el presente trabajo presentó una mayor cantidad de carbohidratos. Al realizar un balance de estos en la formulación base, el azúcar agregado fue del 5 %, y la lactosa presente principalmente en el suero, leche entera y descremada, aportó aproximadamente un 9 % de azúcares (Balcázar, 2011).

Dado que la tendencia es consumir productos bajos en azúcares, para futuros trabajos se presenta la posibilidad de analizar la formulación base para las bebidas lácteas y buscar reducir estos niveles de azúcares, manteniendo las características reológicas y organolépticas deseadas.

Cabe mencionar que los valores obtenidos en la caracterización fisicoquímica cumplen con lo que dicta el Código Alimentario Argentino (Argentina. Ministerio de Salud, 1996).

Efecto de la concentración de almidón, gelatina y gomas sobre la viscosidad aparente de las bebidas lácteas

Se presentan en la Tabla 4 los valores medios experimentales registrados, junto a sus desviaciones estándar, para la viscosidad aparente a velocidades de corte 50, 100, 150 y 200 s⁻¹, obtenidos a partir de las elaboraciones realizadas para cumplir con el diseño experimental planteado.

TABLA 4. Valores promedio y desviación estándar de viscosidad aparente en función de la variación de las concentraciones de almidón, gelatina y gomas guar y garrofín (codificadas).

Variables Independientes			Respuestas			
Almidón	Gelatina	Gomas	μ_{50} [Pa.s]	μ_{100} [Pa.s]	μ_{150} [Pa.s]	μ_{200} [Pa.s]
1	0	0	0,199 ± 0,005	0,111 ± 0,003	0,080 ± 0,002	0,064 ± 0,002
0,5	0	0,5	0,134 ± 0,010	0,095 ± 0,005	0,077 ± 0,003	0,065 ± 0,003
0	0	1	0,212 ± 0,001	0,149 ± 0,001	0,120 ± 0,001	0,100 ± 0,000
0	0,5	0,5	0,179 ± 0,004	0,116 ± 0,000	0,088 ± 0,000	0,072 ± 0,000
0	1	0	0,128 ± 0,003	0,086 ± 0,002	0,067 ± 0,002	0,056 ± 0,002
0,5	0,5	0	0,152 ± 0,012	0,101 ± 0,008	0,079 ± 0,006	0,067 ± 0,004
0,33	0,33	0,33	0,159 ± 0,002	0,111 ± 0,001	0,088 ± 0,001	0,073 ± 0,001

μ_{50} : Viscosidad a gradiente de deformación 50 s⁻¹; μ_{100} : Viscosidad a gradiente de deformación 100 s⁻¹; μ_{150} : Viscosidad a gradiente de deformación 150 s⁻¹; μ_{200} : Viscosidad a gradiente de deformación 200 s⁻¹.

Se presentan además los coeficientes de los modelos obtenidos para la viscosidad aparente a cada velocidad de corte (gradiente de deformación), y el análisis de varianza,

donde aparece la falta de ajuste de los modelos, error puro y R^2 . La significancia de cada uno de los términos se determinó en función a su p-valor y se excluyeron aquellos términos que resultaron no significativos (Tabla 5).

Respecto a los coeficientes obtenidos de los modelos predictivos para la viscosidad aparente, se observa que todos los estabilizantes (términos lineales) influyen de forma directa. Específicamente para un gradiente de deformación de 50 s^{-1} , es la mezcla de gomas (guar y garrofin) el factor de mayor influencia, teniendo un efecto 70 % mayor que la gelatina, seguido del almidón (50 % más que la gelatina) (Figura 2 A). En las viscosidades a mayores gradientes se evidencia que si bien la influencia de todos los estabilizantes disminuye conforme aumenta el gradiente de deformación, el efecto de las gomas mantiene cierta proporcionalidad al de la gelatina, mientras que el de almidón disminuye de forma más abrupta. Para la viscosidad aparente a gradiente de deformación de 200 s^{-1} , la influencia del almidón respecto a la gelatina es solo un 13 % mayor (Figura 2 B).

TABLA 5. Coeficientes de los modelos de segundo orden y análisis de varianza ANOVA obtenidos para la viscosidad aparente a velocidades de corte 50, 100, 150 y 200 s^{-1} .

Fuente de Variación	Coeficientes de los modelos			
	μ_{50} [Pa.s]	μ_{100} [Pa.s]	μ_{150} [Pa.s]	μ_{200} [Pa.s]
A: Almidón	0,193***	0,114***	0,079***	0,063***
B: Gelatina	0,130***	0,088***	0,066***	0,054***
C: Gomas	0,217***	0,149***	0,118***	0,098***
AB	ns	ns	0,038*	0,038*
AC	-0,266***	-0,130***	-0,078**	-0,054**
BC	ns	ns	Ns	ns
ANOVA				
Falta de ajuste	0,00057	0,00022*	0,00011*	0,00008*
Error puro	0,00026	0,00009	0,00005	0,00003
Modelo	0,0106***	0,00473***	0,00318***	0,00220***
Coef. desviación (R^2)	92,8 %	93,6 %	95,1 %	95,1 %

μ_{50} : Viscosidad a gradiente de deformación 50 s^{-1} ; μ_{100} : Viscosidad a gradiente de deformación 100 s^{-1} ; μ_{150} : Viscosidad a gradiente de deformación 150 s^{-1} ; μ_{200} : Viscosidad a gradiente de deformación 200 s^{-1} ; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ns: no significativo.

Se observa que la gelatina es el hidrocoloide de menor influencia en los valores de viscosidad, lo cual es contrario a lo informado en varios trabajos (Marcotte et al., 2001; Delmonte et al., 2022). La justificación es que en esos trabajos la concentración de gelatina agregada generalmente es 0,5 % p/p o superior, mientras que en el presente

trabajo nunca supera el valor de 0,085 % (Tabla 1), por lo cual su influencia se ve afectada enormemente por el nivel en que se agrega a la mezcla.

En cuanto a la interacción de a pares, la combinación almidón-gomas tiene efectos fuertemente antagónicos en todo el rango de gradiente analizado (término de mayor coeficiente negativo para μ_{50} , Tabla 5), con una influencia muy marcada a bajos gradientes y disminuyendo al aumentar dicho gradiente. Por otro lado, se observa que la combinación almidón-gelatina solo tiene influencia para altos gradientes sobre la viscosidad aparente, mientras que la combinación gelatina-gomas no presentó efectos significativos en todo el rango.

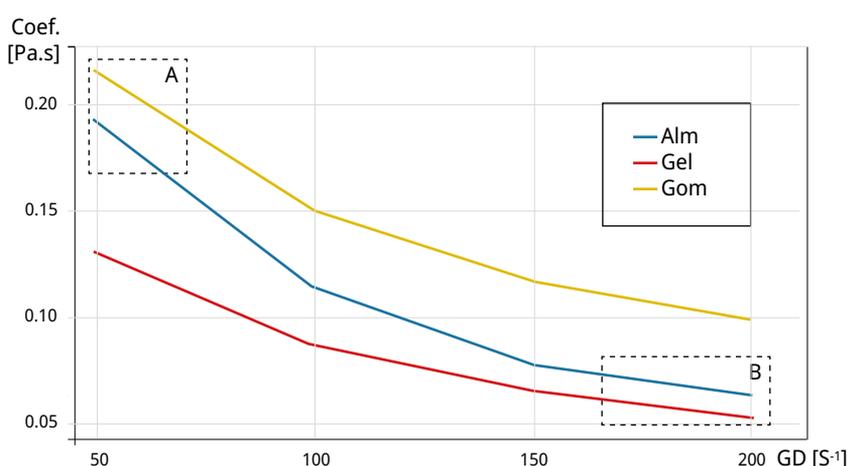


FIGURA 2. Evolución de los coeficientes correspondientes a las contribuciones individuales de cada hidrocoloide sobre la viscosidad aparente al aumentar el gradiente de deformación.

En las gráficas de superficie de respuesta (Figura 3) se observan los efectos combinados de todos los términos del modelo ajustado con las variables codificadas, para cada una de las viscosidades aparentes a distintos gradientes de deformación, donde se corrobora el comportamiento previamente descrito. En estas gráficas se hace notoria la disminución de la viscosidad a medida que aumenta el gradiente de deformación, correspondiendo la codificación máxima de almidón con una disminución del 68 %, y siendo la mayor de todas.

La importancia de incluir gomas en el perfil de hidrocoloides queda en evidencia al comparar con productos comerciales que solo poseen almidón modificado y gelatina como agentes estabilizantes. Los niveles de concentración global frecuentemente vistos en la industria, para un yogur bebible solo con estos dos hidrocoloides, suelen rondar el 1 % o superiores (Huginin et al., 2009), concentraciones totales por lo menos 7 veces mayores a las utilizadas en este producto.

El comportamiento hallado no concuerda con BeMiller (2011), quien reporta a partir del estudio de varios autores que la combinación de almidón de maíz (o trigo) con gomas garrofín y guar produjo un aumento significativo en la viscosidad. En las bebidas

elaboradas se ha encontrado que la combinación de estos hidrocoloides posee un valor mínimo resultado de un efecto antagónico sobre la viscosidad aparente.

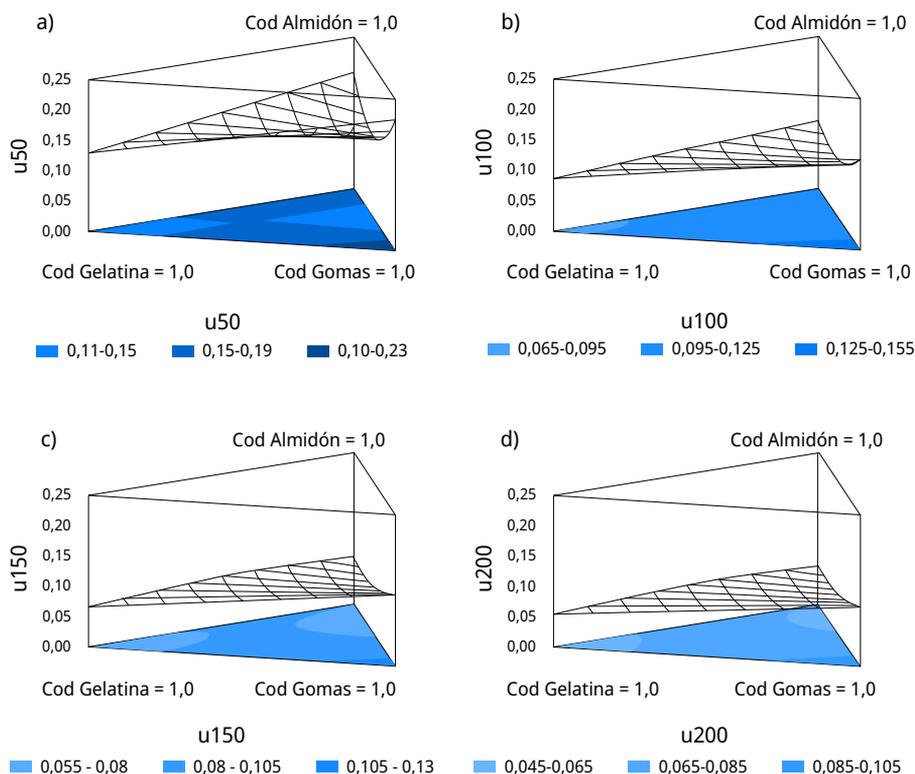


FIGURA 3. Gráficas de superficie de respuesta estimada para la viscosidad aparente de las bebidas lácteas a base de lactosuero, a diferentes gradientes de deformación a) 50 s^{-1} , b) 100 s^{-1} , c) 150 s^{-1} y d) 200 s^{-1} , en función de la concentración de almidón, gelatina y mezcla de gomas guar y garrofín codificadas.

Efecto de la concentración de almidón, gelatina y gomas sobre los parámetros reológicos de las bebidas lácteas

Se presentan en la Tabla 6 los valores medios y sus desvíos estándar para el índice de comportamiento (n), índice de consistencia (K), límite de fluencia (t_0) e índice de tixotropía (IT), obtenidos a partir de los datos experimentales de las elaboraciones realizadas, según el diseño experimental planteado.

Además, se presentan los coeficientes obtenidos de las regresiones múltiples con polinomios de segundo grado, en función de las 3 variables del diseño estadístico experimental, para el límite de fluencia, índice de consistencia, índice de comportamiento e índice de tixotropía, junto con los del análisis de varianza y los estadísticos, falta de ajuste de los modelos, error puro y R^2 (Tabla 7).

En lo que concierne al límite de fluencia, se observó que la concentración individual de todos los hidrocoloides influye directamente sobre este, en mayor medida el almidón

modificado (alrededor de 5 y 13 veces más que la gelatina y las gomas, respectivamente), aunque su efecto resulta antagónico en combinación con los otros dos hidrocoloides. Este comportamiento ocasiona que para concentraciones determinadas de gelatina y gomas exista un valor dentro del rango de concentraciones de almidón que corresponda a un mínimo en el parámetro analizado. En la gráfica de superficie de respuesta se puede visualizar el comportamiento del t_0 , el cual se incrementa principalmente a medida que aumenta la concentración de almidón (Figura 4).

TABLA 6. Valores promedio y desviación estándar límite de fluencia, índice de consistencia, índice de comportamiento e índice de tixotropía en función de las concentraciones de almidón, gelatina y gomas guar y garrofín (codificadas).

Variables Independientes			Respuestas			
Almidón	Gelatina	Gomas	t_0 [Pa]	K	n	IT [Pa.s ⁻¹]
1	0	0	0,148 ± 0,003	3,991 ± 0,107	0,220 ± 0,011	762,3 ± 20,7
0,5	0	0,5	0,008 ± 0,005	0,996 ± 0,162	0,490 ± 0,024	416,6 ± 35,9
0	0	1	0,010 ± 0,004	1,688 ± 0,068	0,471 ± 0,009	644,5 ± 1,77
0	0,5	0,5	0,026 ± 0,008	2,154 ± 0,165	0,363 ± 0,015	572,1 ± 23,0
0	1	0	0,026 ± 0,000	1,299 ± 0,028	0,408 ± 0,001	377,4 ± 5,45
0,5	0,5	0	0,028 ± 0,002	1,544 ± 0,156	0,408 ± 0,006	550,4 ± 53,1
0,33	0,33	0,33	0,008 ± 0,000	1,354 ± 0,061	0,453 ± 0,012	548,5 ± 5,02

x: promedio; sd: desvío estándar; t_0 : límite de fluencia K: Índice de consistencia; n: Índice de comportamiento; IT: Índice de tixotropía.

Como es de esperarse, todos los hidrocoloides tienen una influencia directa sobre el índice de consistencia de la bebida, en mayor medida el almidón, con una influencia 3 veces mayor que la gelatina, y 2 veces más que las gomas. El comportamiento hallado contrasta con lo obtenido por otros autores para un sistema de gelatina y goma espina corona (EC) (Pavón et al., 2014), donde se asoció una disminución del índice de consistencia de un yogur al aumento de concentración de gelatina, para valores cercanos al 0,5% p/p, considerándose que lo ocurrido se debe a un efecto antagónico con la EC.

Con respecto al índice de comportamiento, analizando la curva superior (GD ascendentes), cuando los valores son más cercanos a 1 significa que el fluido tiene un comportamiento más newtoniano (Pang et al., 2019). En el presente estudio se observó que en todo el rango experimental se obtuvieron valores de n aproximadamente entre 0,2 y 0,5, lo que denota un comportamiento de carácter muy no newtoniano (FNN), tixotrópico (Ti) y, por ende, la viscosidad resulta dependiente tanto del GD (FNN) como del tiempo de cizallamiento (Ti). Es sabido que a muy altas concentraciones de almidón en una solución acuosa se puede formar un fluido con gran carácter dilatante, es decir, que aumente su resistencia a fluir (viscosidad) al incrementar el GD. Sin embargo, el presente trabajo deja en evidencia que en el sistema y rango de concentraciones

estudiados un aumento en la concentración de almidón provoca una caída en el índice de comportamiento, generando así que la viscosidad disminuya en mayor medida al aumentar el GD.

Por otro lado, no se observaron grandes variaciones de dicho parámetro al variar fracciones de gelatina por gomas (o al revés), aunque existe cierto efecto antagónico, como puede verificarse en el signo negativo correspondiente a dicha combinación (Tabla 7), o en la superficie respuesta, donde n disminuye al analizar la interacción entre la gelatina y/o la mezcla de gomas.

TABLA 7. Coeficientes de los modelos de segundo orden (Regresión Múltiple) y Análisis de varianza ANOVA obtenidos para límite de fluencia, índice de consistencia, índice de comportamiento e índice de tixotropía.

Fuente de Variación	Coeficientes de los modelos			
	t_0 [Pa]	K	n	IT [Pa.s ¹]
A: Almidón	0,148***	3,985***	0,217***	756,6
B: Gelatina	0,029***	1,296***	0,407***	374,5
C: Gomas	0,013***	1,685***	0,470***	640,0
AB	-0,238***	-4,34***	0,405***	ns
AC	-0,285***	-7,304***	0,607***	-1053***
BC	Ns	2,702***	-0,281***	333,1*
ANOVA				
Falta de ajuste	ns	Ns	ns	ns
Error puro	0,00011	0,0869	0,00103	4696
Modelo	0,0166***	7,26***	0,0636***	151389***
Coef. desviación (R2)	98,9 %	98,8 %	93,8 %	93,7 %

t_0 : límite de fluencia K: Índice de consistencia; n: Índice de comportamiento; IT: Índice de tixotropía; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$; ns: no significativo.

No obstante, se ha evidenciado que a concentraciones mayores de gelatina el comportamiento de los yogures persiste, como lo reportado por Pavón et al. (2014) con concentraciones cercanas a 0,5 %, donde han encontrado una disminución del índice de comportamiento conforme aumenta la concentración del hidrocoloide, en un sistema binario de este y goma espina corona, alejándose del comportamiento newtoniano.

Priyanka et al. (2022) estudiaron los efectos de la goma guar sobre el yogur bajo en grasa y obtuvieron, para concentraciones de 0,5 % p/p, un índice de comportamiento de 0,575, valor cercano al obtenido en las bebidas elaboradas con niveles máximo de gomas. Considerando que la concentración de gomas de dicho tratamiento es cerca de 7 veces menor que la utilizada por Priyanka et al. (2022), se concluye que es favorable

la utilización de hidrocoloides en forma combinada para la obtención de parámetros reológicos adecuados.

Respecto a la tixotropía (IT), como se observa en las gráficas de superficie de respuesta (Figura 4 y Tabla 7), las 3 variables influyen en forma directa, por lo cual al aumentar cualquiera de ellas el producto se vuelve más tixotrópico, lo que significa que su viscosidad depende en mayor medida del tratamiento mecánico (GD) en magnitud y tiempo de aplicación. El índice de tixotropía alcanza valores máximos sobre la frontera del rango experimental cuando las concentraciones de almidón y gomas son elevadas, influyendo el almidón en mayor medida.

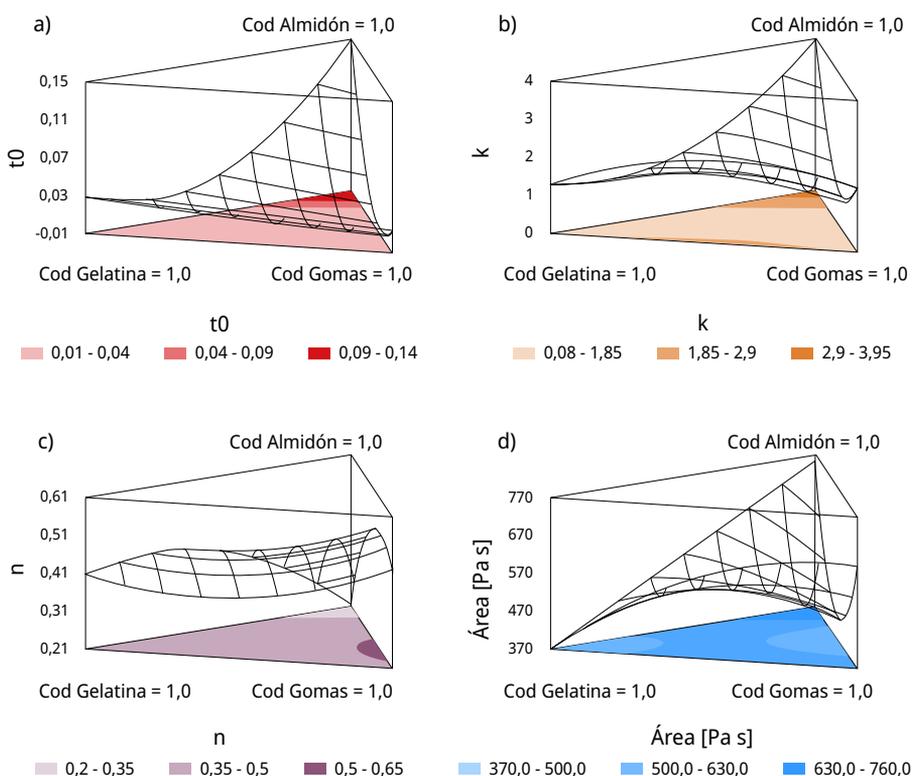


FIGURA 4. Gráfica de superficie de respuesta estimada para a) límite de fluencia, b) índice de consistencia, c) índice de comportamiento y d) índice de tixotropía de las bebidas lácteas a base de lactosuero en función de la concentración de almidón, gelatina y gomas guar y garrofín codificadas.

Como se observa en la Tabla 7, la interacción entre la concentración de gelatina y las gomas utilizadas generan un comportamiento con tendencia más tixotrópica; esto se debe a que presenta un coeficiente positivo en la respuesta en estudio. Debido a que la gelatina posee el menor coeficiente sobre el índice tixotrópico, utilizar elevados valores de este componente permite obtener los menores valores de dicho parámetro, lo cual suele

ser buscado en la industria para evitar las variaciones en el comportamiento reológico de un fluido a lo largo de los procesos industriales.

El IT disminuye a medida que la concentración de los hidrocoloides es menor debido a que generan una pseudoestructura resistente ficticia, la cual se incrementa con la concentración de hidrocoloides. Sin embargo, al ser sometida a un esfuerzo de cizalla se debilita, generando así una histéresis menor entre la curva superior e inferior cuando la cantidad de hidrocoloides se reduce (Rozycki y Seguro, 1995).

Modelos predictivos (Regresión Múltiple)

Para obtener modelos matemáticos más útiles se obtuvieron en función de las variables no codificadas (de forma porcentual) a partir del análisis estadístico con el software Statgraphics Centurion XVI (Tabla 8) (StatPoint Technologies, Inc., 2009).

Dichos modelos permitieron predecir los valores de viscosidad aparente y parámetros reológicos para una combinación de hidrocoloides que se encuentre dentro del rango estudiado de cada hidrocoloide, reemplazando directamente los valores de la fracción utilizada de cada hidrocoloide (variable).

TABLA 8. Modelos matemáticos obtenidos para los parámetros reológicos en función del código correspondiente al porcentaje de hidrocoloides utilizado.

Modelos Matemáticos	
μ_{50} [Pa.s]	$= 0,193 C_{alm} + 0,130 C_{gel} + 0,217 C_{gom} + 0 C_{alm} C_{gel} - 0,266 C_{alm} C_{gom} + 0 C_{gel} C_{gom}$
μ_{100} [Pa.s]	$= 0,114 C_{alm} + 0,088 C_{gel} + 0,149 C_{gom} + 0 C_{alm} C_{gel} - 0,130 C_{alm} C_{gom} + 0 C_{gel} C_{gom}$
μ_{150} [Pa.s]	$= 0,079 C_{alm} + 0,066 C_{gel} + 0,118 C_{gom} + 0,038 C_{alm} C_{gel} - 0,078 C_{alm} C_{gom} + 0 C_{gel} C_{gom}$
μ_{200} [Pa.s]	$= 0,063 C_{alm} + 0,054 C_{gel} + 0,098 C_{gom} + 0,038 C_{alm} C_{gel} - 0,054 C_{alm} C_{gom} + 0 C_{gel} C_{gom}$
t_0 [Pa]	$= 0,148 C_{alm} + 0,029 C_{gel} + 0,013 C_{gom} - 0,238 C_{alm} C_{gel} - 0,285 C_{alm} C_{gom} + 0 C_{gel} C_{gom}$
K	$= 3,985 C_{alm} + 1,296 C_{gel} + 1,685 C_{gom} - 4,34 C_{alm} C_{gel} - 7,304 C_{alm} C_{gom} + 2,702 C_{gel} C_{gom}$
n	$= 0,217 C_{alm} + 0,407 C_{gel} + 0,470 C_{gom} + 0,405 C_{alm} C_{gel} + 0,607 C_{alm} C_{gom} - 0,281 C_{gel} C_{gom}$
IT [Pa.s ⁻¹]	$= 756,6 C_{alm} + 374,5 C_{gel} + 640,0 C_{gom} + 0 C_{alm} C_{gel} - 1053 C_{alm} C_{gom} + 333,1 C_{gel} C_{gom}$

μ_{50} : Viscosidad a gradiente de deformación 50 s⁻¹; μ_{100} : Viscosidad a gradiente de deformación 100 s⁻¹; μ_{150} : Viscosidad a gradiente de deformación 150 s⁻¹; μ_{200} : Viscosidad a gradiente de deformación 200 s⁻¹; t_0 : límite de fluencia K: Índice de consistencia; n: Índice de comportamiento; IT: Índice de tixotropía.

Optimización

El diseño experimental planteado y la metodología de análisis estadístico de los datos experimentales aplicada (Regresión Múltiple) resultaron útiles para evaluar el comportamiento de las diferentes respuestas estudiadas en función de las variables

utilizadas. Se obtuvieron modelos matemáticos que permiten predecir y describir el comportamiento de los sistemas en el espacio tecnológico estudiado. Asimismo, se pudieron optimizar las formulaciones a través de la función de deseabilidad (D) con el fin de obtener bebidas lácteas a base de lactosuero con características similares a las de un yogur bebible de consumo masivo y de primera marca del mercado argentino (testigo).

El valor máximo de deseabilidad obtenido fue de 0,65 y las concentraciones de almidón, gelatina y mezcla de gomas requeridas para alcanzar las condiciones óptimas fueron 0,028 %, 0,059 % y 0,054 % respectivamente, es decir, los necesarios para obtener un producto con características reológicas muy similares al de una bebida láctea (yogur bebible) de marca líder en el mercado argentino.

Se presentan los parámetros predichos por los modelos obtenidos para dicha composición óptima junto a los medidos en la caracterización del yogur bebible comercial (Tabla 9).

TABLA 9. Valores óptimos predichos de viscosidad aparente, límite de fluencia, índice de consistencia, índice de comportamiento e índice de tixotropía en función de las concentraciones de almidón, gelatina y gomas guar y garrofin (codificadas).

Muestra	Respuestas							
	μ_{50} [Pa.s]	μ_{100} [Pa.s]	μ_{150} [Pa.s]	μ_{200} [Pa.s]	t_0 [Pa]	K	n	IT [Pa.s ⁻¹]
Bebida óptima experimental	0,169	0,116	0,089	0,074	0,022	2,140	0,366	577,2
Yogur bebible	0,167	0,116	0,094	0,081	0,076	1,380	0,462	306,5
Variación porcentual	1,20 %	0,00 %	5,32 %	8,64 %	71,1 %	55,1 %	20,8 %	88,3 %

μ_{50} : Viscosidad a gradiente de deformación 50 s⁻¹; μ_{100} : Viscosidad a gradiente de deformación 100 s⁻¹; μ_{150} : Viscosidad a gradiente de deformación 150 s⁻¹; μ_{200} : Viscosidad a gradiente de deformación 200 s⁻¹; t_0 : límite de fluencia; K: Índice de consistencia; n: Índice de comportamiento; IT: Índice de tixotropía.

Como se puede apreciar, el optimizado logró obtener valores muy cercanos a los deseados para la viscosidad aparente, en todo el rango de gradiente de deformación, lo mismo que para el índice de comportamiento.

El límite de fluencia, índice de consistencia e índice de tixotropía difieren en mayor medida de los parámetros del yogur comercial.

En cuanto al IT, considerando que el resultado objetivo (del yogur comercial) no se encuentra dentro del rango de los valores obtenidos en cada uno de los tratamientos, no es posible obtener valores dentro de los límites esperados. No obstante, se minimizó esta variable con el fin de obtener los valores más bajos. Se observó que para obtener una bebida con un carácter menos tixotrópico una potencial alternativa es ampliar el rango de concentración estudiado. Dicha diferencia se puede atribuir a que en los yogures convencionales, además de usar algunos hidrocoloides, la acción propia de los exopolisacáridos generados por los microorganismos inherentes al yogur pueden otorgarle esta propiedad (Baglio, 2014).

Como complemento a la presente investigación, en trabajos posteriores se realizarán estudios de análisis sensorial con un panel entrenado y de aceptabilidad con consumidores, de manera tal de tener una mayor valoración del producto obtenido. Otros potenciales factores para estudiar son la influencia sobre el comportamiento reológico ocasionados por procesos de homogeneización, variación de pH y tiempos y temperaturas de los tratamientos térmicos.

Otros aportes de alta importancia para el producto final resultarían de estudiar cómo la estabilidad microbiológica y fisicoquímica de las presentes bebidas son afectadas al variar las composiciones de los hidrocoloides, cantidad de sólidos totales y sorbato de potasio (agente estabilizante). Este último podría ajustarse de modo que la bebida cumpla con los requisitos de estabilidad requeridos para una satisfactoria comercialización.

CONCLUSIONES

- La combinación de los distintos hidrocoloides influye notoriamente sobre el comportamiento reológico, lo cual permite obtener una variedad de bebidas a partir de una misma formulación base. El aprovechamiento de los efectos sinérgicos permitió utilizar una concentración global de hidrocoloides alrededor de 8 veces menor a los encontrados en el mercado.
- La mezcla de gomas son el factor que gobierna la viscosidad del producto estudiado; al aumentar su concentración, se incrementa notoriamente la viscosidad aparente. Este factor tiene un efecto un 75 % mayor sobre la viscosidad aparente promedio que el otorgado por la gelatina.
- El almidón tiene una influencia sobre la viscosidad aparente similar al de las gomas a bajos gradientes de deformación, pero cuando aumenta pierde su influencia, asemejándose más al efecto de la gelatina. En promedio, influye un 29 % más que la gelatina sobre la viscosidad aparente. Además, es el hidrocoloide de mayor influencia sobre todos los parámetros de los modelos reológicos, actuando de forma directa para el límite de fluencia, índice de consistencia e índice de tixotropía y de forma indirecta sobre el índice de comportamiento.
- La gelatina es el hidrocoloide que menos influye sobre la viscosidad aparente y los parámetros reológicos dentro del rango experimental estudiado; no obstante, para la obtención del producto esperado se requiere del efecto combinado de todos los hidrocoloides. Para la obtención de un bajo IT, se recomiendan mayores concentraciones de gelatina.
- Se evidenció que las bebidas lácteas a base de lactosuero estudiadas son fluidos no newtonianos, debido a que exhiben una curva de esfuerzo de corte vs. gradiente de deformación no lineal ($n \neq 1$).
- La investigación realizada demostró que la elaboración de bebidas lácteas a base de lactosuero utilizando almidón modificado, gelatina y mezcla de gomas guar y garrofín como hidrocoloides resulta una alternativa viable para las micro y pequeñas industrias lácteas, principalmente queseras, ya que permite aumentar su sustentabilidad y rentabilidad a través de la revalorización del suero como materia prima, evitando el

- impacto ambiental que genera su vuelco y aprovechando los macro y micronutrientes que posee.
- El producto presenta un muy elevado valor agregado, y además de utilizarse posteriormente a la obtención de suero líquido puede elaborarse también a partir de materias primas sólidas, propuesta de muy alto interés en regiones con poco o nulo desarrollo de la industria láctea.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Litoral, proyecto CAI+D "Uso de lactosuero en el desarrollo de alimentos con alta demanda como estrategia de sustentabilidad y sostenibilidad en las pymes lácteas" (código: 21820210100042LI). Y especialmente al Instituto de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ingeniería Química y sus diferentes áreas, principalmente al área de Leche y Productos Lácteos.

A las industrias Lácteos La Cristina S.A., Milkaut S.A., Sancor CUL, Tregar S.R.L, PB Leiner, Glutal S.A., Heladerías Veneto S.A., Nutralia S.R.L., Simes S.A., La Raiz S.A., Chr-Hansen, Grupo Saporiti, Sacco S.R.L. y Tate & Lyle S.A., por proveer las materias primas necesarias para la formulación de las bebidas lácteas y otros productos a base de lactosuero.

REFERENCIAS

- AOAC International, 1984. *Official Methods of Analysis*. 14aed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 16.036.
- AOAC International, 2000. *Official Methods of Analysis*, 17aed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 920.124.
- Argentina. Ministerio de Salud, 1996. *Código alimentario argentino*. Cap. VIII. Buenos Aires: ANMAT.
- Baglio, E., 2014. *Chemistry and technology of yoghurt fermentation*. Berlín: Springer.
- Balcázar, M.E.V., 2011. *Elaboración y aplicación gastronómica del yogur*. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- BeMiller, J.N., 2011. Pasting, paste, and gel properties of starch-hydrocolloid combinations. En: *Carbohydrate Polymers*, 86, pp. 386-423. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.064>
- Brighenti, M.; Govindasamy-Lucey, S.; Jaeggi, J.J.; Johnson, M.E. y Lucey, J.A., 2020. Behavior of stabilizers in acidified solutions and their effect on the textural, rheological, and sensory properties of cream cheese. En: *Journal of Dairy Science*, 103, pp. 2065-2076. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17487>
- Carvalho, F.; Prazeres, A.R. y Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. En: *Science of The Total Environment*, 445-446, pp. 385-396. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>
- Chandan, R.C.; White, C.H.; Kilara, A. y Hui, Y.H., 2008. *Manufacturing yogurt and fermented milks*. New Jersey: John Wiley & Sons.

- Delmonte, A.; Cortez-Latorre, J.D. y Rozycki, S.D., 2022. Whey revalorization through the development of spreadable cheeses. En: *ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M*, 2(1), pp. 228–244. DOI: <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11197>
- Derringer, G. y Suich, R., 1980. Simultaneous optimization of several response variables. En: *Journal of Quality Technology*, 12, pp. 214–219. DOI: <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
- Elejalde, C.C. y Kokini, J.L., 1992. The psychophysics of pouring, spreading and in-mouth viscosity. En: *Journal of Texture Studies*, 23(3), pp. 315–336. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1992.tb00528.x>
- FAO, s.d. *Leche y productos lácteos* [En línea]. Roma: FAO. [Consulta: 24 de julio de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/dairy-production-products/products/es/>
- Federación Internacional de Lechería, 1981. FIL 105: *Leche: determinación de contenido graso*. Bruselas: FIL.
- Federación Internacional de Lechería, 1982. FIL 4a: *Quesos y quesos procesados: determinación del contenido de sólidos totales*. Bruselas: FIL.
- Hugunin, A.; Lucey, J.A. y Verdes, S.K., 2009. *US whey ingredients in yogurt and yogurt beverages*. Washington: US Dairy Export Council.
- INDEC, s.d. *Producción agropecuaria* [En línea]. Buenos Aires: INDEC.[Consulta: 25 de Julio de 2022]. Disponible en: <https://www.indec.gob.ar/indec/web/Nivel4-Tema-3-8-89>
- Joyner, H.S. y Damiano, H., 2015. Influence of various hydrocolloids on cottage cheese cream dressing stability. En: *International Dairy Journal*, 51, pp. 24–33. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.06.007>
- Larenas, M., 2010. *Modelos en reología y aplicaciones a fluidos* [En línea]. Santiago: Universidad de Chile. [Consulta: 13 de Julio de 2022]. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/103837>
- Marcotte, M.; Taherian Hoshahili, A.R. y Ramaswamy, H.S., 2001. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. En: *Food Research International*, 34, pp. 695–703. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00091-6)
- Mordor Intelligence, s.d. *Mercado de Bebidas a Base de Lácteos: crecimiento, tendencias, impacto de covid-19 y pronósticos (2023-2028)* [En línea]. Hyderabad: Mordor Intelligence. [Consulta: 17 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/dairy-based-beverages-market>
- Mudgil, D. y Barak, S., 2019. Dairy-based functional beverages. En: Grumezescu, A.M. y Holban, A.M., eds. *Milk-based beverages*. Sawston: Woodhead Publishing. pp. 67–93. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815504-2.00003-7>
- Pang, B.; Wang, S.; Chen, W.; Hassan, M. y Lu, H., 2019. Effects of flow behavior index and consistency coefficient on hydrodynamics of power-law fluids and particles in fluidized beds. En: *Powder Technology*, 366, pp. 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2020.01.061>
- Pavón, Y.L.; Lazzaroni, S.M.; Sabbag, N.G. y Rozycki, S.D., 2014. Simultaneous effects of gelatin and espina corona gum on rheological, physical and sensory properties of cholesterol-reduced probiotic yoghurts. En: *International Journal of Food Science and Technology*, 49(10), pp. 2245–2251. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12538>

- Priyanka, R.M.; Sarma, M. y Mukesh, K., 2022. Non-enzymatically hydrolyzed guar gum and orange peel fibre together stabilize the low-fat, set-type yogurt: A techno-functional study. En: *Food Hydrocolloids*, 122, 107100. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107100>
- Rozycki, S.D. y Seguro, E.F., 1995. Yogur: cuantificación e influencia de los parámetros reológicos. En: *Revista Argentina de Lactología*, 7, pp. 39–56.
- StatPoint Technologies, Inc., 2009. *STATGRAPHICS Centurion XVI*. [En línea]. Vers. 16.2.04. The Plains: StatPoint Technologies, Inc. [Consulta: 10 de Abril de 2022]. Disponible: <https://www.statgraphics.com/download-statgraphics-centurion-xvi>
- StatPoint Technologies, Inc, 2010. *STATGRAPHICS® Centurion XVI User Manual*. Estados Unidos. [Consulta: 25 de julio de 2022]. Disponible: <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2015/03/Centurion-XVI-Manual-Principal.pdf>
- Sarboon, N.M.; Badii, F. y Howell, N.K., 2015. The effect of chicken skin gelatin and whey protein interactions on rheological and thermal properties. En: *Food Hydrocolloids*, 45, pp. 83–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.008>
- Smithers, G.W., 2008. Whey and whey proteins - From 'gutter-to-gold.' En: *International Dairy Journal*, 18, pp. 695–704. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.008>
- Sun, S.; Xu, X.; Liang, L.; Wang, X.; Bai, X., Zhu, L. y Zhao, J., 2021. Lactic acid-producing probiotic *Saccharomyces cerevisiae* attenuates ulcerative colitis via suppressing macrophage pyroptosis and modulating gut microbiota. En: *Frontiers in Immunology*, 12, 777665. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.777665>
- Yousefi, M. y Jafari, S.M., 2019. Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. En: *Trends in Food Science & Technology*, 88, pp. 468–483. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.015>

Utility of DNA barcodes in the identification of melliferous plants associated with *Sabal yapa* honey from eastern Yucatan, Mexico

Utilidad de los códigos de barras de DNA en la identificación de plantas melíferas asociadas a la miel monofloral de *Sabal yapa* producida en el este de Yucatán, México

Utilidade dos códigos de barras de DNA na identificação de plantas melíferas associadas ao mel de *Sabal yapa* do leste de Yucatán, México

 KELLY CRISTINA DURÁN ESCALANTE (1)

 JUAN JAVIER ORTIZ-DÍAZ (1)

 JUAN PABLO PINZÓN ESQUIVEL (1)

 MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL (2)

(1) Departamento de Botánica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, México.

(2) Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

RECIBIDO: 22/6/2023 → APROBADO: 18/8/2023 ✉ duranes_kelly@hotmail.com

ABSTRACT

Melliferous plants are natural source of nectar and pollen for honeybees and their pollen grains are present in honey. The melissopalynological study of *Sabal yapa* honey produced in Yucatan has shown that eighteen species contribute importantly to its honey composition. We use melliferous plants associated with *Sabal yapa* honey to test the potential of three barcodes (*rbcl*, ITS2, and *trnH-psbA*) in species identification to confirm the botanical origin and authentication of honey. Secondly, we test the success rates of amplification and sequencing of each barcode. A total of 38 sequences were generated: 10 for *rbcl*, 13 for ITS2 and 15 for *trnH-psbA*. The success rate in PCR amplification was 94.73 % for *trnH-psbA* and 84.21 % for ITS2, while for *rbcl* was 52.63 %. Regarding sequencing success, 100 % of the products were amplified with *rbcl*. For *trnH-psbA* and ITS2, the sequencing success was 88.9 % and 87.5 %, respectively. ITS2 produced a species identification efficiency of 46.15 %, followed by *rbcl* (30 %). For *trnH-psbA*, the rate of species identification was 13.33 %. The sequences generated in this work will allow the construction of a reliable library of barcodes of melliferous plants, and with forward

increasing will be possible to have a solid base for metabarcoding studies in the honey of the Yucatan Peninsula.

Keywords: honey, *rbcl*, ITS2, *trnH-psbA*.

RESUMEN

Las plantas melíferas son fuente natural de néctar y polen para las abejas, por lo que sus granos de polen están presentes en la composición de la miel. El estudio melisopolinológico de la miel de *Sabal yapa* producida en Yucatán mostró que 18 especies contribuyen de manera importante en la composición de la miel. En este estudio utilizamos plantas melíferas asociadas a la miel de *Sabal yapa* para evaluar el potencial de tres códigos de barras (*rbcl*, ITS2 y *trnH-psbA*) en la identificación de especies para confirmar el origen botánico y la autenticidad de la miel. También evaluamos el éxito de amplificación y secuenciación de cada código de barras. En total se generaron 38 secuencias: 10 para *rbcl*, 13 para ITS2 y 15 para *trnH-psbA*. El éxito de amplificación para los marcadores fue: *trnH-psbA* (94.73 %), ITS2 (84.21 %) y *rbcl* (52.63 %). El éxito de secuenciación para los marcadores fue: *rbcl* (100 %), *trnH-psbA* (88.9 %) e ITS2 (87.5 %). La eficiencia en la identificación de especies para ITS2 y *rbcl* fue de 46.15 % y 30 %, respectivamente. La eficiencia de *trnH-psbA* para identificar especies fue de 13.33 %. Las secuencias generadas en este trabajo permitirán la construcción de una biblioteca de códigos de barras de plantas melíferas confiable y en la medida que se enriquezca, se podrá tener una base sólida para estudios de metabarcoding en la miel de la Península de Yucatán.

Palabras clave: miel, *rbcl*, ITS2, *trnH-psbA*.

RESUMO

As plantas melíferas são fonte natural de néctar e pólen para as abelhas, e seus grãos de pólen estão presentes na composição do mel. O estudo melisopolinológico do mel de *Sabal yapa* produzida em Yucatan mostrou que 18 espécies contribuem de forma importante para a composição do mel. Usamos plantas melíferas associadas ao mel de *Sabal yapa* para testar o potencial de três códigos de barras (*rbcl*, ITS2 e *trnH-psbA*) na identificação de espécies para confirmar a origem botânica e a autenticação do mel. Em segundo lugar, testamos as taxas de sucesso de amplificação e sequenciamento de cada código de barras. Foi gerado um total de 38 sequências: 10 para *rbcl*, 13 para ITS2 e 15 para *trnH-psbA*. O sucesso da amplificação por PCR foi: *trnH-psbA* (94,73 %), ITS2 (84,21 %), *rbcl* (52,63 %). Com relação ao sucesso do sequenciamento, 100 % dos productos foram amplificados com *rbcl* (100 %). Para *trnH-psbA* e ITS2, o sucesso do sequenciamento foi de 88,9 % e 87,5 %, respectivamente. O ITS2 produziu uma eficiência de identificação de espécies de 46,15 % seguido por *rbcl* (30 %). A eficiência do *trnH-psbA* para identificar as espécies foi de 13,33 %. As sequências geradas neste trabalho permitirá construir uma biblioteca confiável de códigos de barras de plantas melíferas e, com o aumento futuro, será possível ter uma base sólida para estudos de metabarcoding no mel da Península de Yucatán.

Palavras-chave: mel, *rbcl*, ITS2, *trnH-psbA*.

INTRODUCTION

DNA barcodes are small, standardized DNA fragments (500 to 800 base pairs bp) that are amplified and sequenced to identify organisms (Taberlet et al., 2012). This tool has helped to understand biological diversity and is currently applied to solve questions of systematics and phylogeny; as well as in the identification of parasites and vectors, the creation of forest and animal inventories, the detection of trafficking of endangered species, and the authentication of pharmaceutical and food products such as honey (Ajmal et al., 2014; Ferreira de Lima et al., 2018). Therefore, selecting universal DNA fragments as barcodes is a critical step for their implementation (Saravanan et al., 2019).

The Consortium for the Barcoding of Life (CBOL) has proposed *rbcl* as a core barcode in plants and several markers such as *trnH-psbA* or ITS2 as complementary barcodes to increase the species-level discrimination (Hollingsworth et al., 2009; Manivanan et al., 2018). The utility of these markers to corroborate honey authenticity has been evaluated by several authors (Bruni et al., 2015; Hawkins et al., 2015; Laha et al., 2017; Manivanan et al., 2018; Murthy et al., 2019; Prosser and Hebert 2017; Saravanan et al., 2019).

In tropical regions, where organism diversity is high and sampling difficult, barcode generation and implementation may be limited (Parmentier et al., 2013; Ferreira de Lima et al., 2018; Jones et al., 2021) as barcodes require reference sequences available on platforms such as GenBank or BOLD Systems for comparison and species identification (Hollingsworth et al., 2009; Jones et al., 2021). In Mexico, the generation of barcodes for melliferous plants is scarce (Hernández-Pineda, 2016). Only about 10,745 species including plants and animals have barcodes (103,190 records), of which 24.83 % correspond to vascular plants and 17 % to eudicotyledons (BOLD Systems, 2023a). Constructing reference libraries with reference sequences of well-verified specimens will allow correct identification by barcoding and more efficient analysis (Jones et al., 2021). For that reason, utilizing specimens available in herbaria is a key element in constructing solid databases (de Vere et al., 2012).

In the international markets where monofloral honey has a high value due to its organoleptic characteristics (Murthy et al., 2019) and honey may be subject to fraudulent practices (Prosser and Hebert 2017; Soares et al., 2017), DNA barcodes emerge as an innovative technique to authenticate honey and to determine its botanical origin (Soares et al., 2017). Since the Yucatan Peninsula is the most productive beekeeping region in Mexico (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2020) with 22 documented monofloral honey (Villanueva-Gutiérrez et al., 2009; Alfaro-Bates et al., 2010) and around 80 % the honey produced in this region is exported mainly to European countries (Cruz-Zamudio, 2017), the generation of DNA barcodes for melliferous plants of Yucatan is a critical step to identify potential barcodes to authenticate honey. We selected 18 species of plants associated with *Sabal yapa* monofloral honey to evaluate the success rates of amplification, sequencing, and identification of three barcodes (*rbcl*, ITS2, and *trnH-psbA*) and identify potential barcodes in melliferous plants.

MATERIALS AND METHODS

Selection of samples

Eighteen species were selected according to the melissopalynological analysis of *Sabal yapa* honey from Tizimin, Yucatan (Durán-Escalante et al., 2023) (Table 1). Seven of these species were the major contributors of pollen to *Sabal yapa* honey and are also the major plant contributors to honey production in the Yucatan Peninsula (Alfaro-Bates et al., 2010). Four species provided pollen categorized as minor or important minor pollen, and seven species are part of the group that we consider can help to give certainty to the pollen grains that could only be identified by palynology at the botanical family level (i.e., Malvaceae, Asteraceae) in *Sabal yapa* honey. The plants were gathered around the apiaries of a local beekeeper where this honey is harvested. Lately, the dried specimens were identified by expert taxonomists and deposited in the herbarium of the Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). The specimens are available online in the portal of the Red de Herbarios del Noroeste de México (2023).

TABLE 1. List of species and vouchers used for DNA barcode generation and Process ID generated in BOLD Systems platform for studied species.

Family	Species	Voucher	Process ID
Arecaceae	<i>Sabal yapa</i> C. Wright ex Becc.*	UADY23569	UADY013-22
Asteraceae	<i>Bidens squarrosa</i> Kunth	UADY23544	UADY002-22
	<i>Lasianthaea fruticosa</i> (L.) K.M. Becker	UADY23549	UADY008-22
	<i>Otopappus guatemalensis</i> (Urb.) R.L. Hartm. & Stuessy	UADY23552	UADY010-22
	<i>Synedrella nodiflora</i> (L.) Gaertn.	UADY23515	UADY014-22
	<i>Trixis inula</i> Crantz.*	UADY23535	UADY016-22
	<i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Spreng.*	UADY23495	UADY017-22
Burseraceae	<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg. *	UADY23641	UADY003-22
Convolvulaceae	<i>Jacquemontia pentanthos</i> (Jacq.) G.Don.	UADY23499	UADY007-22
Euphorbiaceae	<i>Cnidocolus aconitifolius</i> (Mill.) I.M. Johnst.	UADY23650	UADY005-22
Fabaceae	<i>Erythrostemon yucatanensis</i> (Greenm.) Gagnon & G.P. Lewis	UADY23563	UADY004-22
	<i>Mimosa bahamensis</i> Benth.	UADY23516	UADY009-22
	<i>Piscidia piscipula</i> (L.) Sarg.*	UADY23585	UADY012-22
Malvaceae	<i>Bakeridesia gaumeri</i> (Standl.) D.M.Bates	UADY23476	UADY018-23
	<i>Bastardia viscosa</i> (L.) Kunth	UADY23528	UADY001-22
	<i>Hampea trilobata</i> Standl.	UADY23774	UADY006-22
Nyctaginaceae	<i>Pisonia aculeata</i> L.	UADY23596	UADY011-22
Sapindaceae	<i>Thouinia paucidentata</i> Radlk.*	UADY23637	UADY015-22

*Main species that contribute to honey production in Yucatan.

DNA isolation and Polymerase Chain Reaction (PCR)

Total genomic DNA extraction was performed from 20 mg of leaf tissue (freshly taken and transferred to the laboratory in a bag with silica gel at room temperature) using the DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. Yields and quality of DNA were verified by agarose gel electrophoresis (0.75 %) and spectrophotometer (Jenway 737501 Genova Nano Micro-spectrophotometer, United Kingdom). DNA barcodes were amplified by PCR using universal primers for *rbcl* (Kress and Erickson, 2007; Fazekas et al., 2008), ITS2 (Chiou et al., 2007) and *trnH-psbA* (Sang et al., 1997; Tate and Simpson, 2003). The primer sequences (5' to 3') were *rbcl*_{La_F} (ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC) and *rbcl*_{Lajf634} (GAA ACG GTC TCT CAA ACG CAT); ITS-2 F (ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT) and ITS2 R (GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT); *trnH-psbA* F (GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C) and *trnH-psbA* R (CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC).

All PCR reactions were performed on a MultiGene TC020-24 thermal cycler (Labnet International, China) using a reaction mixture of a total volume of 25 or 50 ml containing 12.5 or 25 ml of GoTaq® Green Master Mix 2X, 1.5 ml forward and reverse primer each (10 mM), 0.5 ml of BSA (0.04 %), and template DNA (< 250 ng). The reaction volume was topped up to 25 or 50 ml using nuclease - free water. The PCR conditions for amplification of *rbcl* were initial denaturation at 94 °C 4 min, followed by 35 cycles of 94 °C 30 s, 53 °C 30 s, and 72 °C 60 s; extension at 72 °C 10 min, and hold 4 °C. The PCR conditions for amplification of ITS2 were initial denaturation at 94 °C 3 min, followed by 35 cycles of 95 °C 30 s, 48 °C 30 s, and 72 °C 30 s; extension at 72 °C 7 min, and hold 4 °C. Finally, the PCR conditions for amplification of *trnH-psbA* were initial denaturation at 95 °C 2 min and 30 s, followed by 35 cycles at 95 °C 30 s, 49 °C 30 s, 64 °C 60 s; extension at 72 °C 7 min, and hold 4 °C. PCR products were visualized on 0.75 % agarose gels stained with SYBR Safe DNA under ultraviolet light. Amplified products were sent to Macrogen (Seoul, South Korea) for purifying and DNA sequencing using the same primers as in the amplification.

DNA sequence editing, nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and dendrogram construction

The assembly of the sequences was performed in Sequencher 4.1.4 (Genes Codes Corporation, 2002) removing low-quality segments at two ends of the sequences by manual editing. Efficiencies of the three markers for species identification were evaluated using the nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), which employs a local alignment and searches for segments with the highest score (McGinnis and Madden, 2004; Newell et al., 2013) in the NCBI platform (National Center for Biotechnology Information, 2023). The default database selected is Nucleotide Collection (nr/nt), and highly similar sequences (megablast) as program selection. The query sequence was considered correctly assigned when a) the percentage of similarity corresponded to ≥ 99 % with the reference sequences in the database and b) the analyzed sequence matched the species name. When the percentage of identity was < 99 %, the identification was considered incomplete because of the absence of specific sequences in the GenBank (Aghayeva et al., 2021).

The sequences edited were aligned in MEGA 11 (Tamura et al., 2021) with MUSCLE (Edgar, 2004) for multiple alignment including sequences available on the GenBank platform for the genus or species (downloaded on September 22, 2022). A phenetic dendrogram was elaborated for each marker with the multiple alignment matrix to corroborate visually the BLAST results obtained. This strategy uses a global alignment where the alignment strain along the length of both sequences (Ignacimuthu, 2005) and allows the recognition of clusters of very similar sequences due to their high level of similarity (Peña, 2011). Trees were constructed by Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987). The marker was considered an efficient barcode for species identification when the query sequence clustered into a group with the same species or genus sequences. Analyses were conducted in MEGA 11 (Tamura et al., 2021) using the Maximum Composite Likelihood method (Tamura et al., 2004) and a Bootstrap test (1000 replicates) (Felsenstein, 1985). Finally, all information related to the specimens (sequences, taxonomic description, voucher number assigned by the herbarium, collection date, and georeferencing) was uploaded to GenBank and BOLD Systems v4 platforms (BOLD Systems, 2023b) as part of the project "UADY DNA Barcoding of melliferous plants in the Yucatan Peninsula (Tizimin)".

RESULTS

The universality of primer sequences

DNA extracted from leaf tissue samples was amplified for the three target regions using a single pair of universal primers for each locus. A total of 38 sequences were obtained: 10 for *rbcl*, 13 for ITS2, and 15 for *trnH-psbA*. The *rbcl* fragment showed an amplification success rate of 55.55 %, ITS2 83.33 % and *trnH-psbA* 94.44 %. Of the nine botanical families studied, *rbcl* and ITS2 amplified for all except Convolvulaceae. The *trnH-psbA* fragment amplified for all families and species except for *Bakeridesia gaumeri* (AB12), a member of the Malvaceae family.

Regarding DNA sequencing, the success rate of sequencing was 100 % for *rbcl*, followed by *trnH-psbA* (88.9 %) and ITS2 (87.5 %). In all cases, amplification products of the expected size were obtained. The average length of the *rbcl* sequences was 631 bases, ITS2 of 473 bases, and *trnH-psbA* of 509 bases. The latter fragment exhibited a variation in the length of the sequences between species. Although *Sabal yapa* and *Cnidocolus aconitifolius* amplified for ITS2, overlapping peaks were found in sequencing results and could not be used for further analysis. The same occurred with *Mimosa bahamensis* with the *trnH-psbA* fragment, where the electropherograms were unclear.

Identification efficiency

The *rbcl*, ITS2 and *trnH-psbA* markers are suitable for plant identification but at different levels. Using the BLAST method to identify species with given samples, the success of species identification with ITS2 was 46.15 %, followed by *rbcl* (30 %) and *trnH-psbA* (13.33 %). From 10 *rbcl* sequences, three could be assigned to the species level, three to

the genus level, and four to the family level (Table 2). Six out of the 13 ITS2 sequences could be correctly assigned to the species level, five at the genus level, and two at the family level (Table 3). Finally, from the 15 *trnH-psbA* sequences, only two could be correctly assigned to the species level. Of the rest, eight were assigned to the genus level and five to the family level (Table 4).

TABLE 2. BLAST results for the *rbcl* region in plant samples collected in this study.

Species	Code	Species match	ID (%)	E-value
<i>Bastardia viscosa</i>	AB13	<i>Abutilon hulseanum</i>	99.84	0.0
		<i>Abutilon eremitopetalum</i>	99.83	0.0
<i>Bursera simaruba</i>	BU10	<i>Bursera simaruba</i>	99.82	0.0
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	CHA16	<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	99.68	0.0
		<i>Manihot carthagenensis</i>	99.20	0.0
<i>Erythrostemon yucatanensis</i>	CYU16	<i>Erythrostemon hughesii</i>	100	0.0
		<i>Cenostigma pyramidale</i>	99.52	0.0
<i>Hampea trilobata</i>	HAM7	<i>Hampea appendiculata</i>	99.82	0.0
		<i>Gossypium raimondii</i>	99.04	0.0
		<i>Gossypium schwendimanii</i>	99.04	0.0
<i>Pisonia aculeata</i>	PIS8	<i>Pisonia aculeata</i>	99.20	0.0
		<i>Guapira noxia</i>	99.20	0.0
<i>Sabal yapa</i>	SA1A	<i>Acoelorrhaphe wrightii</i>	100	0.0
<i>Synedrella nodiflora</i>	SYN30	<i>Synedrella nodiflora</i>	100	0.0
<i>Thouinia paucidentata</i>	THD5	<i>Thouinia portoricensis</i>	99.67	0.0
<i>Viguiera dentata</i>	VD2	<i>Iostephane heterophylla</i>	99.36	0.0
		<i>Aldama excelsa</i>	99.20	0.0

TABLE 3. BLAST results for the ITS2 region in plant samples collected in this study.

Species	Code	Species match	ID (%)	E-value
<i>Bakeridesia gaumeri</i>	AB12	<i>Bakeridesia gaumeri</i>	100	6e-166
		<i>Bakeridesia gloriosa</i>	99.15	9e-179
<i>Bastardia viscosa</i>	AB13	<i>Abutilon abutiloides</i>	94.71	3e-153
		<i>Abutilon theophrasti</i>	93.86	0.0
<i>Bidens squarrosa</i>	BSQ31	<i>Bidens squarrosa</i>	99.39	7e-165
		<i>Bidens boquetiensis</i>	99.36	7e-156
<i>Bursera simaruba</i>	BU10	<i>Bursera simaruba</i>	99.13	4e-173
<i>Hampea trilobata</i>	HAM7	<i>Hampea trilobata</i>	98.01	1e-173
<i>Lasianthaea fruticosa</i>	LASF28	<i>Lasianthaea helianthoides</i>	98.80	6e-166
<i>Otopappus guatemalensis</i>	OTP29	<i>Wollastonia biflora</i>	92.83	0.0
<i>Pisonia aculeata</i>	PIS8	<i>Pisonia aculeata</i>	99.72	2e-180
<i>Piscidia piscipula</i>	PISC4	<i>Piscidia piscipula</i>	99.70	2e-170
<i>Synedrella nodiflora</i>	SYN30	<i>Synedrella nodiflora</i>	99.13	3e-173
<i>Thouinia paucidentata</i>	THD5	<i>Thouinia paucidentata</i>	99.12	4e-172
<i>Trixis inula</i>	TRI1	<i>Trixis californica</i>	98.55	2e-169
		<i>Trixis cacalioides</i>	98.21	1e-162
		<i>Trixis inula</i>	98.20	4e-162
<i>Viguiera dentata</i>	VD2	<i>Viguiera dentata</i>	98.38	9e-149

TABLE 4. BLAST results for the *trnH-psbA* region in plant samples collected in this study.

Species	Code	Species match	ID (%)	E-value
<i>Bastardia viscosa</i>	AB13	<i>Hibiscus micranthus</i>	97.87	1e-59
		<i>Hibiscus meyeri</i>	97.87	1e-59
		<i>Abutilon auritum</i>	97.37	2e-63
<i>Bursera simaruba</i>	BU10	<i>Bursera simaruba</i>	98.71	0.0
		<i>Bursera longipes</i>	98.28	0.0
		<i>Bursera krusei</i>	98.28	0.0
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	CHA16	<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	100	0.0
		<i>Cnidoscolus megacanthus</i>	100	0.0
<i>Erythrostemon yucatanensis</i>	CYU16	<i>Erythrostemon hughesii</i>	96.52	0.0
<i>Hampea trilobata</i>	HAM7	<i>Hampea appendiculata</i>	98.18	0.0
<i>Jacquemontia pentanthos</i>	JPE17	<i>Jacquemontia cayensis</i>	100	3e-64
		<i>Jacquemontia verticillata</i>	100	2e-61
		<i>Jacquemontia havanensis</i>	100	5e-57
		<i>Jacquemontia nipensis</i>	100	5e-57
		<i>Jacquemontia curtisii</i>	100	4e-53
<i>Lasianthaea fruticosa</i>	LASF28	<i>Jacquemontia reclinata</i>	100	4e-53
		<i>Jacquemontia pentanthos</i>	99.78	0.0
		<i>Lasianthaea macrocephala</i>	99.63	2e-135
<i>Otopappus guatemalensis</i>	OTP29	<i>Baltimora recta</i>	97.83	2e-154
<i>Pisonia aculeata</i>	PIS8	<i>Pisonia aculeata</i>	98.30	0.0
<i>Piscidia piscipula</i>	PISC4	<i>Connarus paniculatus</i>	96.60	3e-88
<i>Sabal yapa</i>	SA1A	<i>Acoelorrhaphe wrightii</i>	98.87	0.0
<i>Synedrella nodiflora</i>	SYN30	<i>Synedrella nodiflora</i>	100.00	0.0
<i>Thouinia paucidentata</i>	THD5	<i>Thouinia brachybotrya</i>	98.63	0.0
		<i>Thouinia portoricensis</i>	95.49	2e-164
<i>Trixis inula</i>	TRI1	<i>Trixis inula</i>	99.78	0.0
<i>Viguiera dentata</i>	VD2	<i>Iostephane heterophylla</i>	96.42	0.0

When distance methods were used for species identification, Neighbor-Joining trees showed our sequences cluster correctly with GenBank sequences for the same species or genus (in a few cases with the same family members). The *rbcl* sequences were correctly grouped by genus except for *Bastardia viscosa*, which was grouped with other Malvaceae

species because it does not have reference sequences in GenBank (Figure 1). The tree size for ITS2 is larger than for the other two markers due to the availability of reference sequences for the organisms studied (Figure 2). Although the species identification efficiency of *trnH-psbA* using BLAST was low, species formed well-defined groups in trees. Since *Otoppapus guatemalensis* has no reference sequences for *trnH-psbA* in GenBank, the sequence clustered with other species of Asteraceae but on a different branch within the tree (Figure 3).

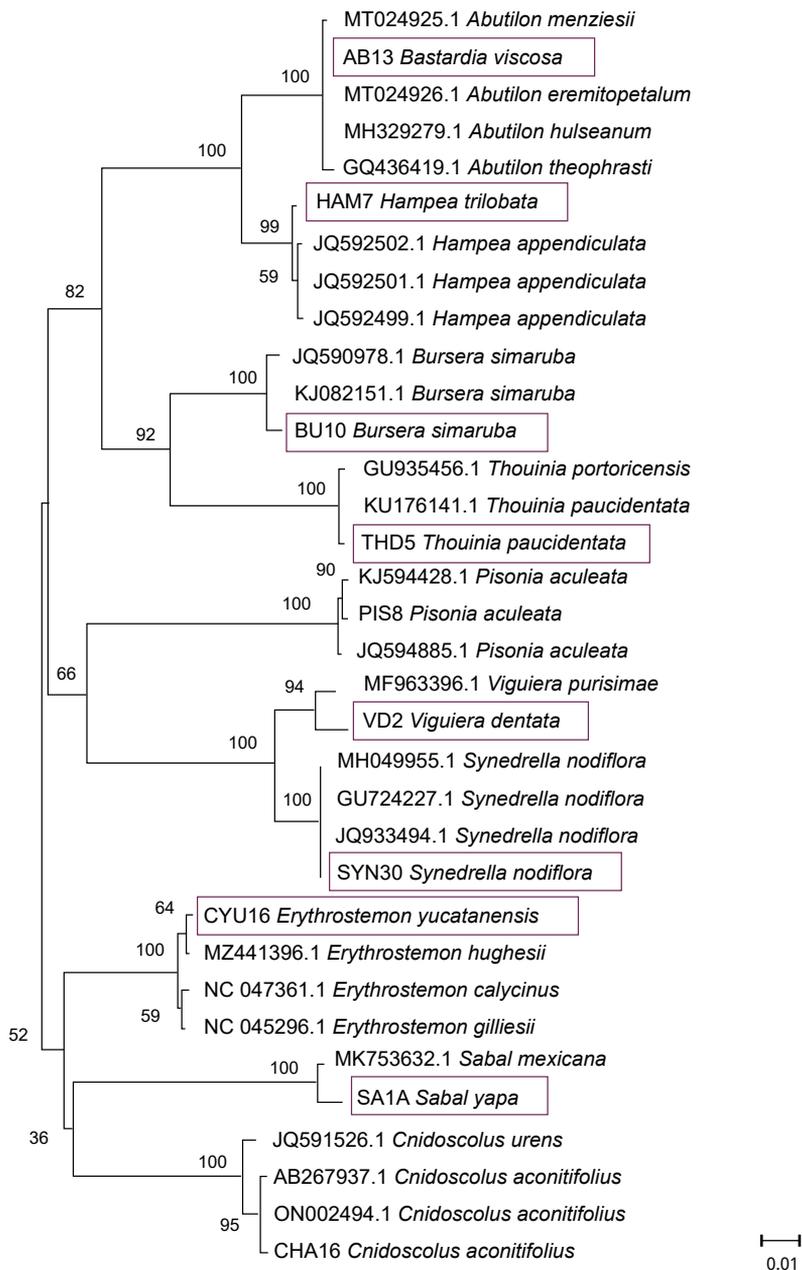


FIGURE 1. Neighbor-Joining (NJ) tree, based on *rbcL* sequences. Above the branches, the Bootstrap value is shown. The blue rectangles indicate the location of our samples in the corresponding clusters. Matrix variability was 23.01 %.

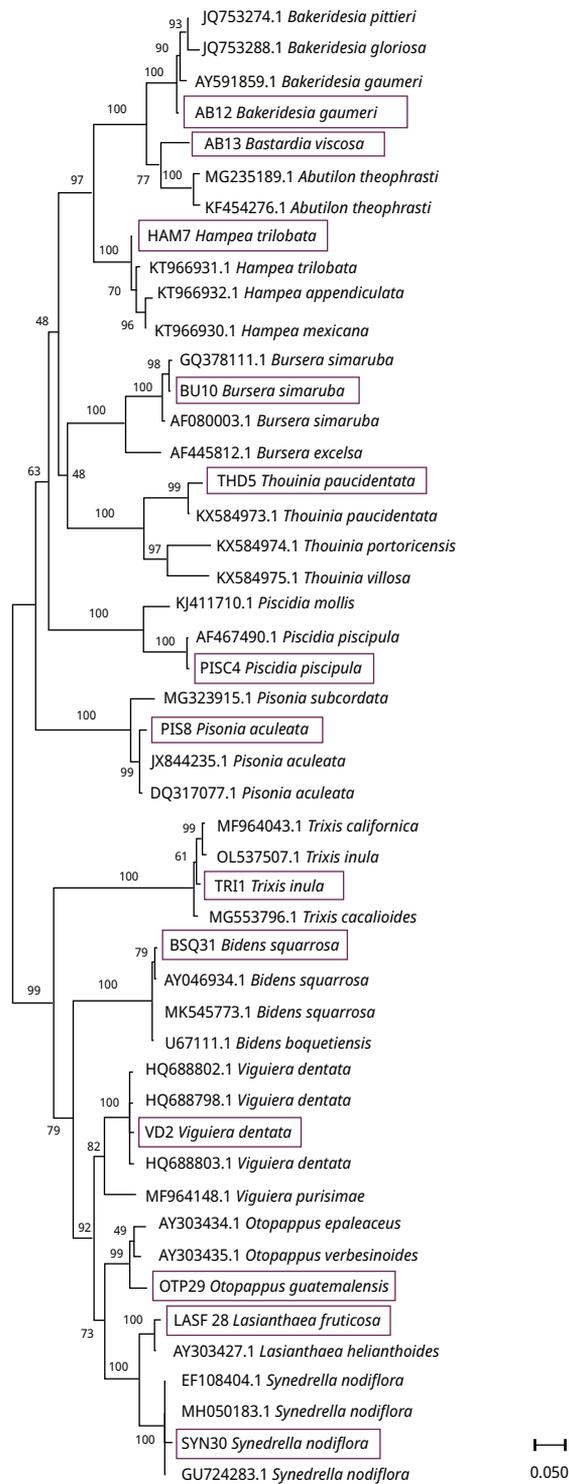


FIGURE 2. Neighbor-Joining (NJ) tree, based on ITS2 sequences. Above the branches, the Bootstrap value is shown. The blue rectangles indicate the location of our samples in the corresponding clusters. Matrix variability was 64.91 %.

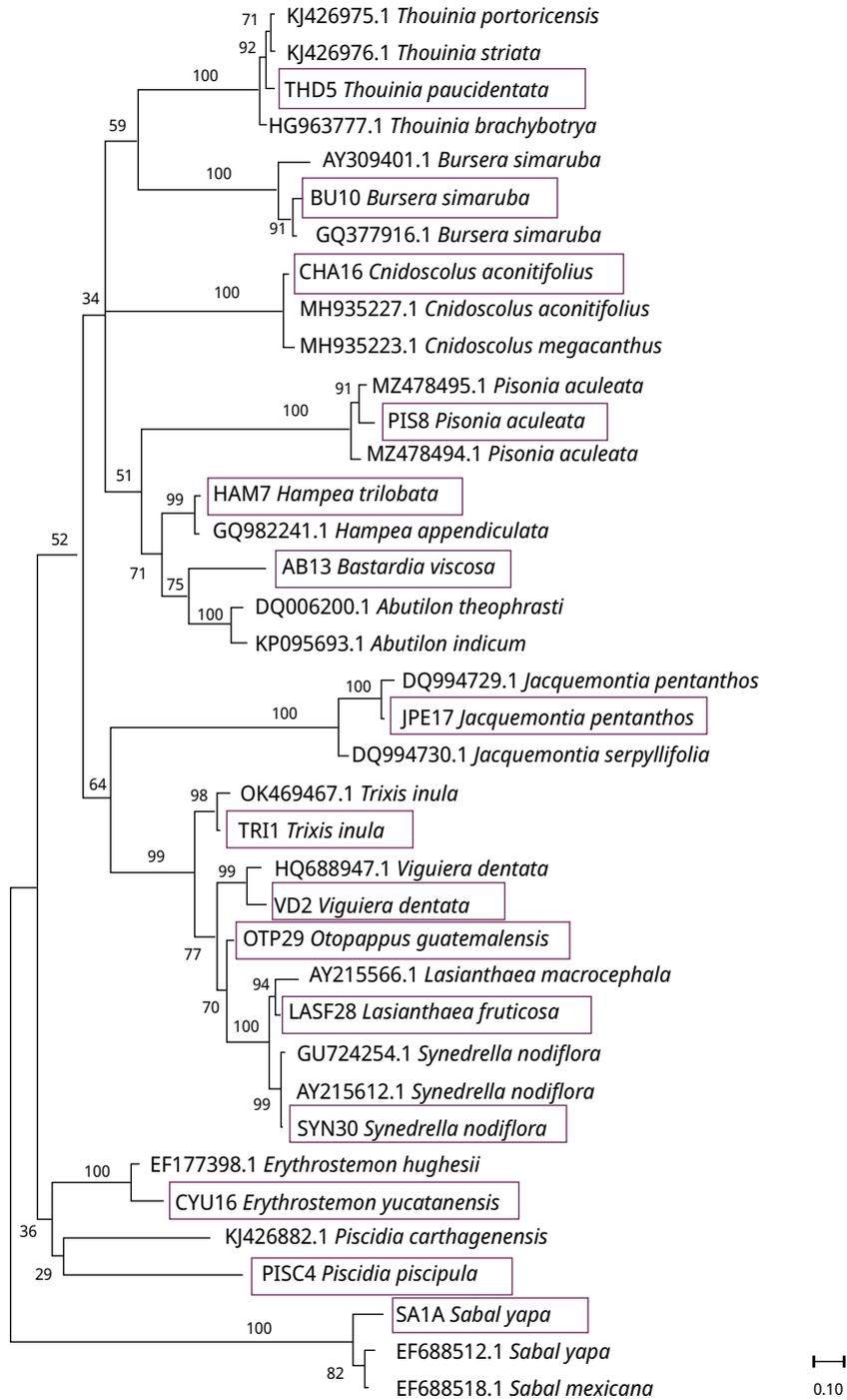


FIGURE 3. Neighbor-Joining (NJ) tree, based on *trnH-psbA* sequences. Above the branches, the Bootstrap value is shown. The blue rectangles indicate the location of our samples in the corresponding clusters. Matrix variability was 75 %.

DISCUSSION

Differences between amplification and sequencing success were observed between the three regions using a single pair of universal primers. Four plant species belonging to the Asteraceae family (*Bidens squarrosa*, *Lasianthaea fruticosa*, *Otopappus guatemalensis*, and *Trixis inula*) did not amplify using the universal *rbcl* (*rbcl*La-F/ *rbcl*Laif634) primers. This has also been observed in other Asteraceae species using *rbcl*La/*rbcl*La R and *rbcl*1F/*rbcl*-724R primers (Bafeel et al. 2011) probably due to a primer mismatch at the 3' end of the primer sequence (Bru et al., 2008). For this reason, the combination of several reverse primers is required to amplify successfully in different groups of plants (de Vere et al., 2012). In contrast to *rbcl*, amplification rates for ITS2 and *trnH-psbA* were higher and agree with those obtained by several authors where ITS2 amplifies between 84.39 % and 93.8 % (Gong et al., 2018; Chen et al., 2010, Gao et al., 2010) and *trnH-psbA* 72.2 % and 92.8 % (Chen et al., 2010; Gao et al., 2010; Kang et al., 2017).

Hollingsworth et al. (2009) have reported obtaining high-quality bidirectional *rbcl* sequences like those we got in our study (100 %). In some species, secondary metabolites can interfere with the DNA extraction causing PCR amplification and sequencing failures (Bafeel et al., 2011; Kang et al., 2017). That was probably the case for *Mimosa bahamensis* (*trnH-psbA*), *Cnidocolus aconitifolius* (ITS2), and *Sabal yapa* (ITS2), where purity indicators A260/280 and A260/230 were lower than 1.8.

The discriminatory capacity of each marker relies on nucleotide substitution rates and the availability of sequences in public databases (Aghayeva et al., 2021; Jones et al., 2021). On one hand, it is essential for a marker to exhibit species-level differentiation at sequence level, to discriminate biological entities effectively (Casiraghi et al., 2010). Moreover, the presence or absence of sequences from specific interest groups in the reference databases can significantly impact the efficiency of barcodes (Rey Bentos and Capdevielle Sosa, 2020; Taberlet et al., 2007). Therefore, the likelihood of accurately assigning a query sequence also depends on the completeness of sequences available for the target taxa in public databases (BOLD Systems, 2023c).

The *rbcl* marker has a conservative rate of nucleotide substitution, which makes this marker very useful for plant identification at the genus or family level (Martínez, 1997). Despite its limited ability to identify closely related species (Bruni et al., 2015; Saravanan et al., 2019), it is chosen as a core barcode to maintain a certain degree of compatibility with the genetic repositories as established by the CBOL (Galimberti et al., 2014) and has many reference sequences for many species. The internal transcribed spacer 2 (ITS2) is a highly variable region (Newmaster et al., 2013; Duan et al., 2019), suitable for genera and species identification because, in general, the spacers evolve faster than coding regions (Poczai and Hyvönen, 2010). This barcode has many sequences in public databases and is the locus more used in pollen DNA barcoding studies (Bell et al., 2016, Milla et al., 2022). In this study, ITS2 had the highest species identification efficiency (46.15 %) and it is consistent with the obtained from other authors in diverse barcoding plant identification projects (Chen et al., 2010; Gao et al., 2010; Liu et al., 2019; Newmaster et al., 2013).

Some authors have highlighted that *trnH-psbA* can correctly identify plants at the genus level (between 90 % and 98 %) better than *rbcl* (Loera-Sánchez et al., 2020; Parmentier et al., 2013) as we observed in our study, where *trnH-psbA* correctly assigned

eight sequences at the genus level against three *rbcl* sequences. At the species level, *trnH-psbA* by itself (Parmentier et al., 2013; Loera-Sánchez et al., 2020) or as a complement to ITS2 (Liu et al., 2019; Pang et al., 2012) or *rbcl* (Galimberti et al., 2014; Parmentier et al., 2013) shows high efficiency in the identification of plants but in our case, we observed the opposite. For example, *trnH-psbA* could not differentiate correctly between *Cnidioscolus aconitifolius* and *C. megacanthus* and *Jacquemontia pentanthos* vs. other six species. Second, we obtained only 13.33 % correct assignment to species level with this marker. This is partly because 16 of the 18 species, have few or no reference sequences for this region in public databases to allow comparison. The scarce availability of this region in the databases is associated with problems obtaining bidirectional sequences due to high mononucleotide repeats (Bruni et al., 2015; Hollingsworth et al., 2009). Despite its limitations for species identification in our study, it seems to be a suitable genus-level marker used as DNA barcode to characterize honey from a limited geographic area with well-known flora (Bruni et al., 2015) such as *Sabal yapa* honey produced in Tizimin, Mexico.

BLAST and dendrograms are different strategies to explore and evaluate the usefulness of barcodes for species identification (Bolson et al., 2015). In a heuristic search, BLAST attempts to find the best overall results after comparing a query sequence with an entire public nucleotide database (McGinnis and Madden, 2004). Nevertheless, BLAST has a bias for hits that contain smaller or no gaps over hits with long gaps, so alignments can fail to identify species correctly (Dereeper et al., 2010). BLAST analyses with ITS2 failed for example to correctly assign *Trixis inula* with its reference sequence (98.20 %) and showed a high percentage of similarity with *T. californica* (98.55 %) and *T. calicoides* (98.21 %) but in the dendrograms, the query sequence clustered correctly with the reference species, demonstrating that distance methods are adequate for corroborating BLAST results.

Lastly, we underscore the significance of producing accurately identified plant barcodes, supported by herbarium vouchers for validation purposes. In this study, we identified a reference sequence labeled in GenBank as Asteraceae sp. (Accession HG964019.1), which exhibited a 100 % match with the query sequence TRI1 (*Trixis inula*) for *trnH-psbA* region.

CONCLUSIONS

In this work, we generated barcodes for the most important melliferous plants associated with *Sabal yapa* honey production of Eastern Yucatan with well-verified specimens. None of the three markers evaluated could independently identify all the studied species successfully. Nonetheless, the results from this preliminary study suggest that the ITS2 marker demonstrated favorable amplification and sequencing rates using a single primer pair, leading to more accurate species identification. This increased accuracy is attributed, in part, to the availability of reference sequences in GenBank. This first approach suggests the potential of ITS2 as a candidate barcode for honey flora. Furthermore, we recommend continued efforts in generating the *trnH-psbA* barcode for melliferous species to assess its utility as a honey barcode in the Yucatan Peninsula. Additionally, it is valuable to use other commercially significant monofloral honey as models to replicate this study, broadening the coverage of melliferous species. Generating reference sequences from well-verified

specimens will provide a comprehensive representation of these species in public databases, and these sequences can be employed with utmost confidence for future analyses (e.g., metabarcoding, food authentication) specifically targeting the species of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Javier Cuxim for allowing us to collect specimens in his apiaries, Alexander Suárez-Mariño for his help during the field collections, and finally Geovani Palma Pech for processing specimens.

First author Kelly Durán Escalante was granted scholarship number 2020-000013-01 NACF-00460 by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) to pursue her doctoral studies.

REFERENCES

- Aghayeva, P.; Cozzolino, S.; Cafasso, D.; Ali-zade, V.; Fineschi, S. and Aghayeva, D., 2021. DNA barcoding of native Caucasus herbal plants: potentials and limitations in complex groups and implications for phylogeographic patterns. In: *Biodiversity Data Journal*, 9, e61333. DOI: <https://doi.org/10.3897/BDJ.9.e61333>
- Alfaro-Bates, R.; González Acereto, J.; Ortiz Díaz, J.; Viera Castro, F.; Burgos Pérez, A.; Martínez Hernández, E. and Ramírez Arriaga, E., 2010. *Caracterización palinológica de las mieles de la Península de Yucatán*. Mérida, México: UADY-CONABIO. ISBN: 978-607-7573-42-5.
- Ajmal, A.M.; Gyulai, G.; Hidvégi, N.; Kerti, B.; al Hemaïd, F.M.A.; Pandey, A.K. and Lee, J., 2014. The changing epitome of species identification – DNA barcoding. In: *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(3), pp. 204-231. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.03.003>
- Bafeel, S.O.; Arif, I.A.; Bakir, M.A.; Khan, H.A.; Al Farhan, A.H.; Al Homaidan, A.A.; Ahamed, A. and Thomas, J., 2011. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (*matK*) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (*rbcL*) for barcoding of some arid plants. In: *Plant Omics Journal*, 4(4), pp.195-198.
- Bell, K.L.; de Vere, N.; Keller, A.; Richardson, R.T.; Gous, A.; Burgess, K.S. and Brosi, B.J., 2016. Pollen DNA barcoding: current applications and future prospects. In: *Genome* 59(9), pp.629-640. DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0200>
- Barcode of Life Data Systems, BOLD Systems, 2023a. *Barcode of Life Data Systems v4* [Online]. Ontario: BOLD Systems. [Accessed: May 22 of 2023]. Available at: <https://www.boldsystems.org/index.php>
- Barcode of Life Data System v4, BOLD Systems, 2023b. *UADY DNA Barcoding of melliferous plants in the Yucatan Peninsula (Tizimin)* [Online]. Ontario: BOLD Systems. [Accessed: June 22 of 2023]. Available at: <https://www.boldsystems.org/>
- Barcode of Life Data Systems, BOLD Systems, 2023c. *Barcode of life data systems handbook. A web-based bioinformatics platform supporting the DNA barcoding of animal, plant, and fungal*

- species* [Online]. Ontario: BOLD Systems. [Accessed: May 22 of 2023]. Available at: http://www.boldsystems.org/libhtml_v3/static/BOLD4_Handbook_FinalVersion_Feb2023.pdf
- Bolson, M.; Smidt, Ed.; Brotto, M.L. and Silva-Pereira, V., 2015. ITS and *trnH-psbA* as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests. In: *PLOS ONE*, 10(12), e0143049. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049>
- Bru, D.; Laurent, F.M. and Philippot, L., 2008. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16s rRNA gene as an example. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), pp. 1660-1663. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02403-07>
- Bruni, I.; Galimberti, A.; Caridi, L.; Scaccabarozzi, D.; de Mattia, F.; Casiraghi, M. and Labra, M., 2015. A DNA barcoding approach to identify plant species in multiflower honey. In: *Food Chemistry*, 170, pp. 308-315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.060>
- Casiraghi, M.; Labra, M.; Ferrri, E.; Galimberti, A. and De Mattia, F., 2010. DNA barcoding: a six-question tour to improve user's awareness about the method. In: *Briefing in Bioinformatics*, 2(4), pp. 440-453. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbq003>
- Chen, S.L.; Yao, H.; Han, J.P.; Chang, L.; Song, J.Y.; Shi, L.; Zhu, Y.; Ma, X.; Gao, T.; Pang, X.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.; Jia, X.C.; Lin, Y. and Leon, C., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. In: *PLOS ONE*, 5, e8613. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008613>
- Chiou, S.J.; Yen, J.H.; Fang, C.L.; Chen, H.L. and Lin, T.Y., 2007. Authentication of medicinal herbs using PCR-amplified ITS2 with specific primers. In: *Planta Medica*, 73 (13), pp.1421-1426. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-990227>
- Cruz-Zamudio, A., 2017. *Producción de miel convencional y orgánica en la Península de Yucatán*. Sherbrooke: El Colegio de la Frontera Sur – Université de Sherbrooke. (Tesis de Maestría).
- de Vere, N.; Rich, T.C.G.; Ford, C.R.; Trinder, S.A.; Long, C.; Moore, C.W.; Satterthwaite, D.; Davies, H.; Allainguillaume, J.; Ronca, S.; Tatarinova, T.; Garbett, H.; Walker, K. and Wilkinson, M.J., 2012. DNA Barcoding the Native Flowering Plants and Conifers of Wales. In: *PLOS ONE*, 7(6), e37945. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037945>
- Dereeper, A.; Audic, S.; Claverie, J.M. and Blanc, G., 2010. LAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. In: *BMC Evolutionary Biology*, 10(8). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>
- Duan, H.; Wang, W.; Zeng, Y.; Guo, M. and Zhou, Y., 2019. The screening and identification of DNA barcodes sequences for *Rehmannia*. In: *Scientific Reports*, 9, 17295. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53752-8>
- Durán-Escalante, K.; Ortiz-Díaz, J.J.; Pinzón-Esquivel, J.P.; Gálvez-Mariscal, M.A. and Alfaro-Bates, R.G., 2023. Palynological characterization of palm honey (*Sabal yapa* C. Wright ex Becc.) of Yucatan, Mexico. In: *Grana* 62(2), pp. 133-145. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2023.2178264>
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp. 1792-1797. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fazekas, A.J.; Burgess, K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. and Barrett, S.C., 2008. Multiple multilocus DNA

- barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. In: *PLOS ONE*, 3(7), e2802. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002802>
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. In: *Evolution*, 39(4), pp. 783-791. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
- Ferreira de Lima, R.A.; de Oliveira, A.A.; Dalla-Colleta, G.; Bevilacqua-Flores, T.; Gayoso-Coelho, R.L., et al., 2018. Can plant DNA barcoding be implemented in species-rich tropical regions? A perspective from São Paulo State, Brazil. In: *Genetics and Molecular Biology*, 41(3), pp. 661-670. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0282>
- Galimberti, A.; De Mattia, F.; Bruni, I.; Scaccabarozzi, A.; Sandionigi, A.; Barbuto, M.; Casiraghi, M. and Labra, M., 2014. A DNA barcoding approach to characterize pollen collected by honeybees. In: *PLOS ONE*, 9(10), e109363. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109363>
- Gao, T.; Yao, H.; Song, J.Y.; Zhu, Y.J.; Liu, C. and Chen, S.L., 2010. Evaluating the feasibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. In: *BMC Evolutionary Biology*, 10, 324. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-324>
- Genes Codes Corporation, 2002. *Sequencher*. Vers. 4.1.4. Ann Arbor: Genes Codes Corporation.
- Gong, L.; Qiu X.H.; Huang, J.; Xu, W.; Bai, J.Q.; Zhang, J.; Su, H.; Xu, C.M. and Huang, Z.H., 2018. Constructing a DNA barcode reference library for the southern herbs in China: a resource for authentication of southern Chinese medicine. In: *PLOS ONE*, 13(7), e0201240. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201240>
- Hawkins, J.; de Vere, N.; Griffith, A.; Ford, C.R.; Allainguillaume, J.; Hegarty, M.J.; Baillie, L. and Adams-Groom, B., 2015. Using DNA metabarcoding to identify the floral composition of honey: a new tool for investigating honey bee foraging preferences. In: *PLOS ONE*, 10(8), e0134735. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134735>
- Hernández-Pineda, J.A., 2016. *Códigos de barras biológicos en la identificación de plantas de importancia melífera*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. (Tesis de Maestría).
- Hollingsworth, P.M.; Forrest, L.L.; Spouge, J.L.; Hajibabaei, M.; Ratnasingham, S.; van der Bank, M.; Chase, M.W.; Cowan, R.S.; Erickson, D.L.; Fazekas, A.J.; Graham, S.W.; James, K.E.; Kim, K.J.; Kress, W.J.; Schneider, H.; van AlphenStahl, J.; Barrett, S.C.H.; van den Berg, C.; Bogarin, D. ...and Little, D.P., 2009. A DNA barcode for land plants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), pp. 12794-12797. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Ignacimuthu, S., 2005. *Basic bioinformatics*. Harrow: Alpha Science International. ISBN: 1842652311.
- Jones, L.; Twyford, A.D.; Ford, C.R.; Rich, T.C.G.; Davies, H.; Forrest, L.L.; Hart, M.L.; McHaffie, H.; Brown, M.R.; Hollingsworth, P.M. and Vere, N., 2021. Barcode UK: A complete DNA barcoding resource for the flowering plants and conifers of the United Kingdom. In: *Molecular Ecology Resources*, 21(6), pp. 2050-2062. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13388>
- Kang, Y.; Deng, Z.; Zang, R. and Long, W., 2017. DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. In: *Scientific Reports*, 7, 12564. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13057-0>

- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. In: *PLOS ONE*, 2(6), e508. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Laha, R.C.; de Mandal, S.; Ralte, L.; Ralte, L.; Kumar, N.S.; Gurusubramanian, G.; Satishkumar, R.; Mugasimangalam, R. and Kuravadi, N.A., 2017. Meta-barcoding in combination with palynological inference is a potent diagnostic marker for honey floral composition. In: *AMB Express*, 7, 132. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0429-7>
- Liu, M.; Li, X.W.; Liao, B.S.; Luo, L. and Ren, Y.Y., 2019. Species identification of poisonous medicinal plant using DNA barcoding. In: *Chinese Journal of Natural Medicines*, 17(8), pp. 0585-0590. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(19\)30060-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(19)30060-3)
- Loera-Sánchez, M.; Studer, B. and Kölliker, R., 2020. DNA barcode *trnHpsbA* is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. In: *BMC Research Notes*, 13(35). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4897-5>
- Manivanan, P.; Rajagopalan, S.M. and Subbarayalu, M.S., 2018. Studies on authentication of true source of honey using pollen DNA barcoding. In: *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), pp. 255–261.
- Martínez, M., 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. In: *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, pp. 123-136. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1525>
- McGinnis, S. and Madden, T.L., 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. In: *Nucleic Acids Research*, 32(Suppl. 2). DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh435>
- Milla, L.; Schmidt-Lebuhn, A.; Bovill, J. and Encinas-Viso, F., 2022. Monitoring of honey bee floral resources with pollen DNA metabarcoding as a complementary tool to vegetation surveys. In: *Ecological Solutions and Evidence*, 3, e12120. DOI: <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12120>
- Murthy, M.; Khandayataray, P.; Ralte, L.; Laha, R. and Samal, D., 2019. Identification of plant species in multiflower honey by ribulose-bisphosphate carboxylase gene (*rbcl*) coding region as barcode marker, Mizoram, Northeast India: An Indo- Burma hotspot region. In: *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(3), pp.1475-1483.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI, 2023. *Basic Local Alignment Search Tool* [Online]. Maryland: NCBI. [Accessed: June 22 of 2023]. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Newell, P.D.; Fricker, A.D.; Roco, C.A.; Chandrangsu, P. and Merkel, S.M., 2013. A small-group activity introducing the use and interpretation of BLAST. In: *Journal of Microbiology & Biology Education*, 14(2), pp. 238-243. DOI: <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i2.637>
- Newmaster, S.G.; Grguric, M.; Shanmughanandhan, D. Ramalingam, S. and Ragupathy, S., 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. In: *BMC Medicine*, 11, 222. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-222>
- Pang, X.; Liu, C.; Shi, L.; Liu, R.; Liang, D.; Li, H.; Cherny, S.S. and Chen, S., 2012. Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes:

- a meta-analysis. In: *PLOS ONE*, 7(11), e48833. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Parmentier, I.; Duminiel, J.; Kuzmina, M.; Philippe, M.; Thomas, DW.; Kenfack, D.; Chuyong, G.B.; Cruaud, C. and Hardy, O.J., 2013. How effective are DNA barcodes in the identification of African rainforest trees? In: *PLOS ONE*, 8(4), e54921. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054921>
- Peña, C., 2011. Métodos de inferencia filogenética. In: *Revista Peruana de Biología*, 18(2), pp. 265-267. DOI: <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>
- Poccai, P. and Hyvönen, J., 2010. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. In: *Molecular Biology Reports*, 37(4), pp. 1897-1912. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9630-3>
- Prosser, S.W.J. and Hebert, P.D.N., 2017. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. In: *Food Chemistry*, 214, pp.183-191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.077>
- Red de Herbarios del Noroeste de México, 2023. *Colección Herbario Alfredo Barrera Marín (UADY-UADY)* [Online]. México: Red de Herbarios del Noroeste de México. [Accessed: June 22 of 2023]. Available at: <https://herbanwmex.net/portal/index.php>
- Rey Bentos, F. and Capdevielle Sosa, F.M., 2020. Aplicación del código de barras de ADN (DNA barcoding) para la identificación de especies vegetales de interés industrial. In: *INNOTEC*, 20, pp.117-138. DOI: <https://doi.org/10.26461/20.06>
- Saitou, N. and Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406-425. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sang, T.; Crawford, D.J. and Stuessy, T.F., 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). In: *American Journal of Botany*, 84, 84(8), pp.1120-1136. DOI: <https://doi.org/10.2307/2446155>
- Saravanan, M.; Mohanapriya, G.; Laha, R. and Sathishkumar, R., 2019. DNA barcoding detects floral origin of Indian honey samples. In: *Genome*, 62(5), pp. 341-348. DOI: <https://doi.org/10.1139/gen-2018-0058>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera., 2023. Producción estatal de miel durante el año 2020 en México [Online]. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. [Accessed: June 12 of 2023] Available at: http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp
- Soares, S.; Amaral, J.S.; Oliveira, M.B.P.P. and Mafra, I., 2017. A Comprehensive review on the main honey authentication issues: production and origin. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), pp. 1072-1100. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12278>
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Gielly, L. Miquel, C.; Valentini, A.; Vermet, T.; Corthier, G.; Brochmann, C. and Willerslev, E., 2007. Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. In: *Nucleic Acids Research*, 35(3), e14. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl938>
- Taberlet, P.; Coissac, E.; Pompanon, F.; Brochmann, C. and Willerslev, E., 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. In: *Molecular Ecology*, 21(8), pp. 2045-2050. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>

- Tamura, K.; Nei, M. and Kumar, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(30), pp. 11030-11035. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Tamura, K.; Stecher, G. and Kumar, S., 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. In: *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), pp.3022-3027. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tate, J.A. and Simpson, B.B., 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. In: *Systematic Botany*, 28(4), pp. 723-737. DOI: <https://doi.org/10.1043/02-64.1>
- Villanueva-Gutiérrez, R.; Moguel-Ordóñez, Y.; Echazarreta-González, C.M. and Arana-López, G., 2009. Monofloral honeys in the Yucatán Peninsula, Mexico. In: *Grana*, 48(3), pp. 214-223. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173130902929203>

Prospección, aislamiento y evaluación del potencial de hongos nativos acaropatogénicos en el control de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay

Prospecting, isolation, and evaluation of the potential of native acaropathogenic fungi in the control of *Rhipicephalus microplus* in Uruguay

Prospecção, isolamento e avaliação do potencial de fungos acaropatogênicos nativos no controle de *Rhipicephalus microplus* no Uruguai

 ALDA RODRÍGUEZ DOS SANTOS (1)

(1) Batoví Instituto Orgánico (BIO Uruguay), Tacuarembó, Uruguay.

RECIBIDO: 13/9/2023 → APROBADO: 7/12/2023  aldardos@gmail.com

RESUMEN

En gran parte del territorio uruguayo las infestaciones de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus*, constituyen el mayor problema de ectoparásitos, provocando pérdidas directas e indirectas, entre ellos muertes por la transmisión de *Babesia* sp. y *Anaplasma* sp., baja productividad, presencia de trazas químicas en la carne, leche y derivados, así como también resistencia cruzada a la limitada oferta de moléculas acaricidas. Por tal motivo, el desarrollo de herramientas biológicas que recompongan la biodiversidad afectada e inicien un proceso de regeneración del campo natural, ecosistema principal involucrado en la producción ganadera, resultará en múltiples ventajas. En 33 sitios diferentes de Uruguay se colectaron muestras de suelo con el objetivo de prospectar hongos acaropatogénicos, obteniendo un total de 16 aislamientos. Los estudios *in vitro* permitieron la selección de 3 cepas, correspondientes a las especies de *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius* y *Beauveria bassiana*, las cuales mostraron diferencias en la patogenicidad sobre distintas fases evolutivas de *R. microplus*. Si bien es importante realizar nuevos ensayos de campo para determinar el potencial real, el presente trabajo arroja información promisoriosa sobre el efecto de la disminución de *R. microplus* a partir de la tercera aplicación de una mezcla de cepas (*Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) tanto en concentraciones de 10^7 como de 10^8 con/mL.

Palabras clave: *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana*, control biológico, microorganismos nativos.

ABSTRACT

In a large part of the Uruguayan territory, infestations of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, constitute the greatest ectoparasite problem, causing direct and indirect losses, including deaths due to the transmission of *Babesias* sp., and *Anaplasma* sp., low productivity, presence of chemical traces in meat, milk, and derivatives, as well as cross resistance to the limited supply of acaricidal molecules. For this reason, the development of biological tools that rebuild the affected biodiversity, reduce chemical pressure, and initiate a process of regeneration of the natural countryside, the main ecosystem involved in livestock production, will result in multiple advantages. In 33 different sites in Uruguay, soil samples were collected with the objective of prospecting for acaropathogenic fungi, obtaining a total of 16 isolates. The *in vitro* studies allowed the selection of three strains, corresponding to the species of *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius*, and *Beauveria bassiana*, which showed differences in pathogenicity over different evolutionary phases of *R. microplus*. Although it is important to carry out new field trials to determine the real potential, the present work provides promising information on the effect of the reduction of *R. microplus* from the third application of a mixture of strains (*Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana*, and *Metarhizium anisopliae*) both in concentrations of 10^7 and 10^8 con/mL.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana*.
Biological control, native microorganisms.

RESUMO

Em grande parte do território uruguaio, as infestações do carrapato bovino, *Rhipicephalus microplus*, constituem o maior problema ectoparasitário, causando perdas diretas e indiretas, incluindo mortes por transmissão de *Babesias* sp. e *Anaplasma* sp., baixa produtividade, presença de vestígios químicos em carnes, leite e derivados, bem como resistência cruzada à oferta limitada de moléculas acaricidas. Por esta razão, o desenvolvimento de ferramentas biológicas que reconstruam a biodiversidade afectada, reduzam a pressão química e iniciem um processo de regeneração da paisagem natural, principal ecossistema envolvido na produção pecuária, resultará em múltiplas vantagens. Em 33 locais diferentes no Uruguai foram coletadas amostras de solo com o objetivo de prospecção de fungos patogênicos para ácaros, obtendo-se um total de 16 isolados. Os estudos *in vitro* permitiram a seleção de três cepas, correspondentes às espécies de *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius* e *Beauveria bassiana*, que apresentaram diferenças na patogenicidade ao longo das diferentes fases evolutivas de *R. microplus*. Embora seja importante a realização de novos ensaios de campo para determinar o real potencial, o presente trabalho fornece informações promissoras sobre o efeito da redução de *R. microplus* a partir da terceira aplicação de uma mistura de cepas (*Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae*) ambas nas concentrações de 10^7 e 10^8 con/mL.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*, *Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana*, controle biológico, microorganismos nativos.

INTRODUCCIÓN

En gran parte del territorio uruguayo, las infestaciones de la garrapata del ganado, *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), constituyen el mayor problema de ectoparásitos debido a la aptitud ecológica favorable a su desarrollo (Solari et al., 2013). Las pérdidas que superan los 45 millones de dólares al año son directas e indirectas (Cuore y Solari, 2022), entre ellas muertes de vacunos por la transmisión de *Babesia* sp. y *Anaplasma* sp., baja productividad, presencia de trazas químicas en la carne, leche y derivados (Ojeda Chi et al., 2011), resistencia cruzada a la limitada oferta de moléculas acaricidas (Cuore y Solari, 2014). También se deben considerar los efectos tóxicos que producen estas moléculas. La ivermectina causa un daño notable e imperceptible a la salud humana y a la biodiversidad, disminuyendo poblaciones de escarabajos estercoleros que son fundamentales en el proceso de reciclado de la materia orgánica y control de otras plagas como la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* (L) (Aparicio-Medina et al., 2011; Souza, 2021). El fipronil a bajas concentraciones también es tóxico para especies no destino, incluyendo las abejas y numerosos macroinvertebrados acuáticos y terrestres (Gómez-Beltrán et al., 2023).

En el panorama global, la agricultura y ganadería enfrentan desafíos como los suelos degradados, la pérdida de la biodiversidad, el cambio climático y la creciente demanda de alimentos inocuos y nutritivos. La FAO plantea que la agricultura tradicional debe realizar una transición agroecológica hacia una agricultura sostenible, donde se garantice la seguridad alimentaria mundial, y se satisfagan las necesidades de las generaciones presentes y futuras con una gestión sostenible de la tierra, el agua y los recursos naturales (FAO e INRA, 2015).

Uruguay posee una histórica preocupación por el control de esta plaga, visible desde que se promulgó la Ley N° 3.606 en 1910 (Uruguay, 1910). Actualmente se encuentra vigente la Ley N° 18.268 (Uruguay, 2008), que declara de interés nacional la lucha contra la garrapata bovina. Esta ley tiene por cometido el control y/o erradicación del parásito dependiendo de la zona en la que se encuentra, y el monitoreo del tránsito de animales de una zona a la otra para evitar su propagación (Errico et al., 2009). Por otro lado, desde 2019 existe la Ley N° 19.717 (Uruguay, 2019), la cual declara de interés general y crea una Comisión Honoraria Nacional y el Plan Nacional para el Fomento de la Producción con Bases Agroecológicas, donde el desarrollo de alternativas de control biológico son parte de la apuesta.

Las condiciones ambientales del territorio determinan que la garrapata puede realizar entre dos y tres generaciones anuales, con variaciones entre las diferentes regiones, principalmente en el número de garrapatas (Cuore et al., 2013). Entre mayo y agosto se ubica el ciclo no parasítico de la plaga, quedando en el suelo y sobre pastos los huevos que hibernan a la espera de las condiciones ambientales para eclosionar (Nari y Fiel, 1994). Cada hembra puede dejar más de 4500 huevos (Cuore et al., 2013). En campos abrigados la primera generación comienza entre julio y agosto, extendiéndose hasta octubre y noviembre con el consiguiente incremento de garrapatas por animal. La segunda generación va desde noviembre a comienzos del otoño y en otoño se da la tercera generación, llegando a más de 400 garrapatas por animal (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Dirección de Servicios Veterinarios, 1994).

El control de *R. microplus* se ha realizado casi exclusivamente con la aplicación de acaricidas químicos, que actúan solo sobre el ciclo parasitario (5 % de la problemática

de la parasitosis) y tienen efectos adversos para el medio ambiente (Kunz y Kemp, 1994). Además del costo que generan, su presión desmedida ha favorecido la aparición de resistencia a cinco de los seis grupos de acaricidas. En 1950 se detectaron en Uruguay poblaciones de *R. microplus* resistentes a los arsenicales (Cardozo y Franchi, 1994), luego se constató resistencia a los organofosforados en 1978 (Petraccia et al., 1983), y en 1994, a los piretroides sintéticos y sus mezclas (Cardozo y Franchi, 1994). En 2006 se descubrió la resistencia a los fenilpirazoles (Cuore, 2006); en 2009, a las amidinas (Cuore et al., 2012); y en 2010, a las lactonas macrocíclicas (Castro-Janer et al., 2012). Existe duda acerca de la resistencia a fluazuron, pero no se cuenta a nivel nacional con diagnósticos oficiales.

Debido a esto, se vuelve necesario encontrar alternativas basadas en el control integrado que sean eficaces en la reducción y control de las infestaciones, respetuosas con el medio ambiente y cuya toxicidad sea baja, como respuesta a los principios de una ganadería sostenible y enfoque de una sola salud (Álvarez et al., 2017).

Existe una tendencia mundial de poner la mirada en la gran diversidad de reguladores naturales, buscando su efectividad mediante un manejo integrado a las buenas prácticas ganaderas. Entre los reguladores naturales se encuentran vertebrados, invertebrados y patógenos (Verrisimo, 1995 y 2013). Pero la mayor diversidad está en el suelo, los cuales han sido ampliamente estudiados y citados por diversos autores (Samnsinakova, 1977; Bittencourt et al., 2003; Angelo et al., 2010; Fernandes et al., 2012; Webster et al., 2017). Esto permite comprender por qué no son aún mayores los niveles de infestación si la cantidad de huevos que oviposita una hembra de *R. microplus* ronda los 4000, con una viabilidad por encima del 90 %. Por lo tanto, es necesario encontrar medidas de control que potencien la acción de los reguladores naturales sobre el ciclo no parasitario de la plaga, que ocurre a nivel del suelo y que representa el 95 % de la problemática de la parasitosis.

Los hongos patógenos de garrapatas

Existen más de 750 especies de hongos entomopatógenos; y dentro de los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Hirsutella* y *Akantomyces* (Pucheta-Díaz et al., 2006).

Metarhizium spp. es patógeno de un amplio grupo, se lo puede encontrar en el suelo, la rizosfera de plantas, los cadáveres de artrópodos y como saprófito y parásito de varios insectos y garrapatas (Schrank y Vainstein, 2010). Sus formas más importantes de dispersión son los conidios, los cuales se adhieren a sus hospedadores, comenzando así la infección. La forma de infección más común es por contacto directo con el hongo, aunque también existe la transmisión horizontal, de un individuo infectado a uno sano (Gutiérrez et al., 2016).

El género *Metarhizium* requiere alta humedad (cerca del 100 %) y temperatura moderada de 25 °C (Ment et al., 2010) para infectar a un amplio rango de hospederos pertenecientes a diferentes órdenes y especies (Ojeda-Chi et al., 2011). En el caso particular de *R. microplus*, diversos autores mencionan esta capacidad (Frazzon et al., 2000; Bittencourt, 2000; Moreno et al., 2001; Fernández et al., 2005; Hornbostel et al., 2005; Bahiense et al., 2006; Ment et al., 2010; Pulido-Medellin et al., 2015.); ya sea solo, en combinación con varias cepas de esta especie o junto con *B. bassiana* (Beys et al., 2020). Pruebas de laboratorio y de campo han demostrado que *M. anisopliae* es eficaz en el

control de garrapatas del ganado, y puede ser una alternativa interesante, manteniendo la plaga por debajo de los niveles de daño económico (Samish y Rehacek, 1999; Frazzon et al., 2000; Ojeda-Chi et al., 2010; Schrank y Vainstein, 2010, Arguedas et al., 2020, Alonso-Díaz et al., 2022). Su acción acaropatógena incluye además la afectación sobre parámetros reproductivos como la disminución de la masa de huevos y su eclosión (López et al., 2009; Fernández-Salas et al., 2017).

Al hongo *Akantomyces lecanii* es común encontrarlo ejerciendo su acción patológica con temperaturas relativamente más bajas que *Metarhizium* spp., entre 17 y 23 °C (Rodríguez dos Santos, 2003), sobre diversas plagas de la agricultura, así como también en la ganadería sobre *R. microplus* (Rijo et al., 1998; Moreno et al., 2001; Beltran-Alzate, 2008). Fassiatova et al., (1978) y Gindin et al., (2001) señalan que los cadáveres de los artrópodos atacados por este hongo presentan una cubierta blanca de largos filamentos que emergen del interior de aquellos con un aspecto generalmente algodonoso (Hall y Atkey, 1981).

Beauveria spp. es otro patógeno de plagas de importancia económica, entre ellas de ácaros como *R. microplus* y *R. annulatus*. Diversos autores han realizado investigaciones tanto *in vitro* como a campo sobre esta capacidad de *Beauveria* spp. (Moreno et al., 2001; De La Cruz y Vahos, 2004; Cardona, 2005; Fragas et al., 2006; Piralhi-Kheirabadi et al., 2007; Posadas y Lecuona, 2009; Tofiño Rivera et al., 2018; Yari Briones et al., 2021; Martínez-García et al., 2023). En combinación con cepas de *M. anisopliae* se inducen mayores mortalidades de garrapatas, lo que puede atribuirse al aumento de la letalidad que produce la combinación de las micotoxinas y enzimas producidas por cada especie (Maranga et al., 2005; Zeina et al., 2022).

Una de las características más importantes de la capacidad de patogenicidad de esos microorganismos sobre *R. microplus* es que las esporas de los hongos interactúan hidrofólicamente con la capa lipídica de la cutícula (Bidochka et al., 1994) mediante proteínas apolares, llamadas hidrofobinas (St. Leger, 1993), adhesinas, como MAD1, GAPDH (Gluceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y fosfatasas (Wang y St. Leger, 2007). Además de estas proteínas, las enzimas lipolíticas pueden contribuir al reconocimiento y adhesión a través del aumento potencial de superficie de hidrofobicidad por degradación de lípidos (Beys da Silva et al., 2010). La capacidad de estos hongos para reconocer los componentes lipídicos de la cutícula de la garrapata es lo que induce a niveles más altos de actividad de lipasa y esterasa (Beys da Silva et al., 2010). La producción de toxinas, proteínas y metabolitos secundarios como ácidos hidroxicarboxílicos, ácido dipicolínico, fenilalanina anhidra, 2,6 dimetoxi-p-benzoquinona, aphidicolina, ácido picolínico, ácido cítrico y oxálico (Bidochka et al., 1994), disminuyen la capacidad reproductiva (Angelo et al., 2012), inhiben los hematocitos, la función muscular y la función del túbulo de Malpighian, así como la supresión del sistema inmunológico del huésped (Bidochka et al., 1994; Pal et al., 2007; Santi et al., 2019).

Los síntomas de patogenicidad fúngica en garrapatas incluyen sensibilidad reducida, movimientos descoordinados y parálisis, que conducen a la muerte del artrópodo. Al ser hemibiótrofos, continúan viviendo en el cadáver como saprófitos, las hifas invaden órganos internos hasta agotar los nutrientes y luego, en condiciones favorables, emergen y forman nuevamente las esporas (Esser et al., 1994, Carballo y Guharay, 2004), las que

podrán diseminarse por el ambiente para recomenzar el ciclo en otros individuos. En la Figura 1 se presenta dicho ciclo en forma esquemática.

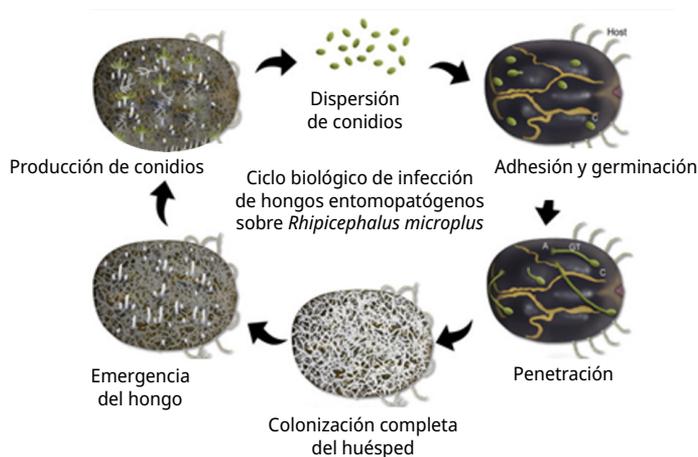


FIGURA 1. Ciclo biológico de infección (Shah y Pell, 2003; Schrank y Vainstein, 2010).

Algunos autores mencionan el efecto de la combinación de cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* para provocar una mayor mortalidad de garrapatas, lo que es inducido por la combinación de micotoxinas y enzimas producidas por cada una de las especies fúngicas, que se vuelven más letales cuando se combinan (Maranga et al., 2005; Beys da Silva et al., 2020). Ojeda-Chi et al. (2010) muestran la disminución de la oviposición de hembras congestionadas de *R. microplus* tratadas con formulaciones combinadas de diferentes cepas de *M. anisopliae*.

Como se ha evidenciado anteriormente, la investigación sobre hongos patógenos de *R. microplus* es extensa, tanto en laboratorio como campo, a nivel mundial y en países vecinos como Brasil (Frazzon et al., 2000; Bittencourt et al., 2003; Bahiense et al., 2006; Beys da Silva et al., 2020; Santos et al., 2022). Algunos países como Estados Unidos ya cuentan con productos comercializables de la especie *M. anisopliae* (Sullivan et al., 2022).

En Uruguay se realizan experiencias de campo desde el 2016 mediante convenios entre asociaciones de productores (Cooperativa de Productores de Leche de Tacuarembó, Liga de Trabajo de Fraile Muerto, Liga de Trabajo de Guichón, Sociedad Fomento Rural de Curticeiras, Cooperativa Agraria de Aigua), BIO Uruguay, la Dirección General de Desarrollo Rural del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), el Instituto Plan Agropecuario y la Universidad del Trabajo de Uruguay (Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2022, 2023a, 2023b; Contexto Ganadero, 2023). Además, desde las autoridades sanitarias del MGAP, Cuore y Solari (2022) señalan que el principal desafío que Uruguay enfrenta es generar conocimiento sobre alternativas biológicas de control de la garrapata bovina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prospección y obtención de aislamientos

Entre los años 2008 y 2021 se llevó adelante la prospección para la obtención de microorganismos nativos en 33 sitios bajo ganadería extensiva en cinco departamentos del norte y este del país. El suelo de este ecosistema, caracterizado por su riqueza de especies vegetales, aloja aún una alta biodiversidad de hongos acaropatógenos. Los aislamientos se realizaron a partir de muestreo de suelo y de garrapatas infectadas. La metodología usada para la obtención de aislamientos desde el suelo fue mediante insectos trampa, según Rodríguez dos Santos et al. (2018). Se extraen muestras de los primeros 10 cm de suelo en diferentes sitios (lugares donde se reúnen los animales, sitios con mayores contenidos de materia orgánica o suelos de agroecosistemas más conservados). Estas componen una muestra que se coloca en un recipiente limpio con tapa, se rotula con el nombre del establecimiento y/o coordenadas de donde fue tomada la muestra y la fecha en la que se tomó. En el laboratorio se mezcla muy bien la muestra y se extraen 15 g de suelo para colocar en recipientes limpios junto a diez larvas de *Gallería mellonella* (insectos trampa). Se incuban durante 7-10 días a temperatura controlada entre unos $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Luego de ese período se extraen aquellas larvas de *G. mellonella* con síntomas de enfermedad o muertas, que presentan cambio de color y secas, las que se incuban nuevamente durante 7 a 10 días para dar lugar a la expresión del agente causante de la enfermedad o muerte. Posteriormente se procede al aislamiento de los hongos por medio de diluciones seriadas o con punta de ansa estéril. Luego de obtener cepas puras se realiza la determinación taxonómica. La identificación de género se basa en las características de crecimiento de los hongos sobre el cadáver del insecto, las características culturales, la morfología y disposición de células conidiógenas y conidios, y la identidad del hospedante, según lo recomiendan Goettel e Inglis (1997) y Humber (1997).

Para la caracterización macroscópica se tomaron discos de 5 mm de diámetro de los diferentes aislamientos y se colocaron en placas Petri (90 mm), que contenían Saboraud Dextrosa Agar (SDA), incubándose en oscuridad continua a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. A los 10 días se midió el crecimiento micelial de las colonias, y se anotaron las siguientes características culturales: aspecto, color de ambas superficies de la colonia, borde y velocidad de crecimiento.

En el caso de la caracterización microscópica, se realizaron microcultivos sobre portaobjetos con agar agar al 2 %, observándose a las 48 y 72 horas con la ayuda de un microscopio binocular (aumento 900 x) la morfología y disposición de las células conidiógenas y los conidios. Los aislamientos se identificaron mediante las claves y descripciones de géneros hechas por Brady (1979), Humber (1997), y Wraight et al. (1998); para proceder al primer bioensayo en busca de seleccionar algunos de los aislamientos que muestren capacidad acaropatógena sobre *R. microplus*, los cuales seguirán adelante en el proceso de evaluación/selección con previa identificación molecular.

Bioensayos

Los aislamientos obtenidos en el paso anterior se usaron para las pruebas de patogenicidad sobre garrapatas. Todos los ensayos se realizaron en forma progresiva en el laboratorio Centro de Reproducción de Entomopatógenos (CREBIO) del Batoví Instituto Orgánico (BIO Uruguay Internacional), situado en la localidad de Zaporá, Departamento de Tacuarembó, Uruguay.

Un primer bioensayo se realizó con el objetivo de conocer cuáles de estos aislamientos mataban el mayor número de garrapatas en un tiempo determinado, como acercamiento a las capacidades acaropatogénicas que permitieran la selección de un número menor de aislamientos para proceder a las siguientes evaluaciones. Para ello se extrajeron hembras adultas de *R. microplus* de más de 4 mm de vacunos con más de 45 días de la última aplicación de acaricidas. Las mismas se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha (7 cm de diámetro), se lavaron con agua esterilizada y se sumergieron durante un minuto en solución de hipoclorito de sodio al 1 % para desinfectarlas (Gindin et al., 2001). Posteriormente 100 hembras de *R. microplus* (por cada aislamiento) estuvieron en inmersión durante 10 minutos en una suspensión de 1×10^8 con/mL, quedando depositadas en cámara húmeda a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las suspensiones conidiales se obtuvieron, tal como describen Goettel y Inglis (1997), a partir de colonias puras que crecieron sobre SDA durante 20 días en la oscuridad y a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las concentraciones fueron determinadas con una cámara de Neubauer y ajustadas convenientemente. A los 20 días se contabilizaron las garrapatas muertas y con presencia visible de desarrollo de los respectivos hongos, determinándose con estos datos la mortalidad absoluta expresada en porcentaje. Se seleccionaron los aislamientos que mostraron porcentajes de mortalidad mayores al 60 % y se enviaron para su identificación molecular al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) Uruguay. En el informe de dicha institución consta que las muestras identificadas con cultivos del género *Akantomyces* fueron repicadas para obtener cultivos puros, luego se obtuvo ADN genómico, que fue amplificado con los cebadores Bt2a y Bt2b (Glass y Donaldson, 1995). El producto de amplificación fue secuenciado con el cebador Bt2b y la secuencia obtenida fue alineada con secuencias de especies relacionadas. El alineamiento obtenido se usó para realizar un análisis mediante Maximum Likelihood con el programa Mega6 (Tamura et al., 2013).

De las muestras identificadas con cultivos del género *Metarhizium*, el ADN fue amplificado con los cebadores EF1T y 1567 para el gen que codifica el factor de elongación 1-alfa, usado como marcador filogenético (Rehner y Buckley, 2005). El producto de PCR fue secuenciado con los mismos cebadores por Macrogen (Corea). Las secuencias obtenidas fueron incluidas, junto a secuencias de cepas tipo de especies de *Metarhizium* relacionadas, en un análisis filogenético realizado por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA6 (Tamura et al., 2013), reconstruyendo la filogenia de *Metarhizium* propuesta por Bischoff et al. (2009).

El ADN obtenido del aislamiento del género *Beauveria* fue amplificado mediante PCR con los cebadores que amplifican el factor de elongación (Carbone y Kohon, 1999), y luego se realizó un análisis filogenético por el método Maximum Likelihood.

Con estos tres aislamientos identificados a género y especie se procedió a la realización de bioensayos para determinar la capacidad acaropatogénica de los mismos

sobre diferentes estados de desarrollo de la plaga. Por practicidad en la manipulación de los estados de desarrollo se usó como criterio de clasificación el tamaño de las garrapatas, dividiendo la población en dos grupos, los individuos menores a 4 mm y los mayores a 4 mm. En ambos casos se evaluó cada aislamiento en tres diferentes concentraciones ($C1 = 10^6$ con/mL, $C2 = 10^7$ con/mL y $C3 = 10^8$ con/mL).

Los individuos de garrapatas se limpiaron y se distribuyeron en tres grupos de 10 (un total de treinta individuos por aislamiento y por concentración), los que estuvieron inmersos durante 1 minuto en la suspensión correspondiente. La técnica de inmersión de las garrapatas fue adaptada de Drummond y Whetstone (1969). Hubo un tratamiento testigo en el cual las garrapatas se sumergieron en agua estéril por el mismo tiempo.

Posteriormente se depositaron en cámara húmeda ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90 % HR) sobre papel secante previamente esterilizado. En todos los individuos de garrapatas se evaluó la mortalidad a los 4, 8 y 13 días, y la presencia visible de micelio de hongo. La patogenicidad de los hongos sobre las garrapatas fue evaluada según la metodología de Bittencourt (2000).

En un grupo de garrapatas teleóginas se evaluó el efecto de la inhibición de la postura y eclosión. Para ello se las colocó en tres grupos de 10 (con el tratamiento previo de lavado e inmersión en la suspensión con hongo como fue explicado) en cámara húmeda durante 35 días (a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 90 % de HR). Luego se extrajeron los huevos de cada grupo, los cuales se pesaron con balanza de precisión y posteriormente fueron depositados nuevamente en placas Petri cerradas durante 65 días, esperando la eclosión.

La inhibición de la postura se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la Postura} = \left[\frac{\text{Peso de la oviposición del testigo} - \text{Peso de la oviposición con tratamiento}}{\text{Peso de la oviposición del testigo}} \right] \times 100$$

Para calcular la eclosión de larvas se tomaron tres alícuotas y se contabilizaron los cascarones rotos y no rotos hasta completar 100 huevos contados. Con los resultados se obtuvo el promedio de eclosión por tratamiento.

Bioensayo a campo

Durante los meses de marzo a mayo de 2021, un rodeo de 36 vacunos adultos con presencia natural de garrapatas fue dividido en cuatro grupos de 9 vacas cada uno. Se realizó un conteo de garrapatas dejando 50 mayores a 4 mm por animal (contabilizados del lado izquierdo). El grupo control fue tratado con agua, mientras que los otros tres fueron tratados con una suspensión de una mezcla de conidios de los aislamientos seleccionados. Estos aislamientos fueron anteriormente seleccionados en estudios de laboratorio por su capacidad patogénica sobre las diferentes etapas de desarrollo de la plaga, su efecto sobre los parámetros reproductivos y los diferentes requerimientos de humedad y temperatura, para abarcar así las diferentes estaciones en las cuales se desarrollan las generaciones de la plaga.

Las suspensiones de diferentes concentraciones se obtuvieron a través del cultivo de hongos sobre arroz en bolsas de polipropileno, como describe Rodríguez dos Santos (2003), y luego se realizaron diluciones en serie hasta obtener la concentración requerida

de 10^6 , 10^7 y 10^8 con/mL (de cada hongo por separado) mezclando volúmenes iguales de la misma concentración de cada cepa.

Los vacunos fueron tratados quincenalmente con aplicaciones de las suspensiones de hongos asperjando con mochila, usando 1 litro por cada 100 kilos de peso vivo de animal (Rijo-Camacho, 2011), cada 15 días. Los tratamientos fueron realizados siempre de tardecita evitando alta irradiación y temperaturas elevadas.

Para evaluar la población de garrapatas sobre los vacunos (como indicador de la evolución de la población de garrapatas con los diferentes tratamientos) se contabilizó cada 15 días, previo a cada aplicación, el número de garrapatas mayores a 4 mm del lado izquierdo de cada animal, por cada grupo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos de laboratorio fueron diseños totalmente aleatorios, mientras que el experimento a campo se hizo con un diseño de bloques al azar. Los análisis de varianza fueron los propios de estos diseños. Para la mortalidad de garrapatas menores y mayores a 4 mm, y el ensayo a campo se realizó un ANOVA de tres factores; mientras que para la inhibición y eclosión de los huevos el ANOVA fue de dos factores.

En todos los casos se realizaron los análisis con los datos originales y, posteriormente, con los datos transformados de conformidad con las exigencias de los estadísticos (Steel y Torrie, 1985).

En todos los casos se realizó ANOVA y posteriormente la prueba de comparación múltiple. Cuando se encontraron diferencias significativas en los análisis de varianza se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de probabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 16 aislamientos patogénicos de *G. mellonella*, de los cuales seis fueron caracterizados como pertenecientes al género *Beauveria*, cinco al género *Metarhizium*, tres al género *Akantomyces*, y uno al género *Paecilomyces*. Los aislamientos se encuentran criopreservados en el banco de cepas del laboratorio CREBIO del Batoví Instituto Orgánico-Uruguay. A continuación, en la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos:

TABLA 1. Mortalidad expresada en porcentaje a los 20 días de la aplicación del hongo sobre garrapatas adultas.

Género	Código	Porcentaje de mortalidad absoluta (%)
<i>Paecilomyces</i>	PEAG	12,0
<i>Beauveria</i>	BPH 1	23,0
<i>Beauveria</i>	BK 1	37,2
<i>Metarhizium</i>	MM 3	44,7
<i>Beauveria</i>	BPH 2	45,0
<i>Akantomyces</i>	AE	46,3
<i>Metarhizium</i>	MA	47,0
<i>Akantomyces</i>	AHO 1	47,1
<i>Beauveria</i>	BP 2	52,0
<i>Metarhizium</i>	ME	52,8
<i>Akantomyces</i>	AS	54,0
<i>Beauveria</i>	BP 1	56,2
<i>Metarhizium</i>	BP	59,0
<i>Akanmomyces</i>	AHO	68,0
<i>Beauveria</i>	36RUF	78,9
<i>Metarhizium</i>	MC	84,7

Los aislamientos que provocaron una mayor mortalidad de garrapatas (superior al 60 %), como se observa en la Tabla 1, correspondieron a aislamientos pertenecientes a los géneros *Akantomyces* (AHO), *Beauveria* (36RUF) y *Metarhizium* (MC), los cuales se presentan en la Figura 2. Los resultados de la identificación molecular de INIA mostraron que la cepa (AHO) de *Akantomyces* formó un clado con 62 % de soporte con cepas de *Lecanicillium muscarium*, actualmente *Akanthomyces muscarius* (Nicoletti y Becchimanzi, 2020). El análisis filogenético permitió identificar a la cepa (MC) de *Metarhizium* como perteneciente a la especie *Metarhizium anisopliae sensu stricto* en un clado con 95 % de soporte, que incluye la cepa tipo (ARSEF 7487) de la especie. Para la cepa (36RUF) de *Beauveria*, de acuerdo con las filogenias construidas a partir de las secuencias obtenidas, se determinó que pertenece a la especie *Beauveria bassiana*. Estos resultados de especies identificadas de hongos acaropatogénicos sobre *R. microplus* concuerdan con la amplia bibliografía reportada en este artículo, en especial *B. bassiana* y *M. anisopliae*.

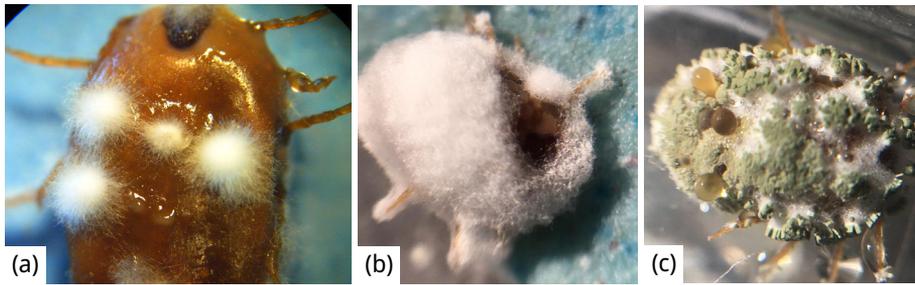


FIGURA 2. Garrapata adulta infectada con (a) *Akantomyces muscarius*, (b) *Beauveria bassiana* y (c) *Metarhizium anisopliae*.

En la Tabla 2 se muestran los datos de los resultados correspondientes a la mortalidad del grupo de garrapatas de menor desarrollo (hasta 4 mm) con cada cepa (36RUF, MC, y AHO) en las tres diferentes concentraciones (C1 = 1×10^6 , C2 = 1×10^7 , C3 = 1×10^8 con/mL).

TABLA 2. Patogenicidad de las diferentes cepas, en diferentes concentraciones, en el grupo de garrapatas de las primeras etapas de desarrollo (expresado en porcentaje de mortalidad a los 13 días).

Tratamiento	Media del porcentaje de mortalidad en garrapatas jóvenes (%)
Testigo	8,88 ± 0,57 a
<i>B. bassiana</i> C1	45,55 ± 2,30 b
<i>M. anisopliae</i> C1	48,88 ± 3,21 cd
<i>M. anisopliae</i> C2	58,88 ± 1,52 de
<i>M. anisopliae</i> C3	60,00 ± 2,64 de
<i>A. muscarius</i> C1	71,11 ± 2,08 de
<i>B. bassiana</i> C3	72,22 ± 4,16 e
<i>B. bassiana</i> C2	76,66 ± 4,35 e
<i>A. muscarius</i> C2	94,44 ± 2,08 f
<i>A. muscarius</i> C3	95,55 ± 1,52 f

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; desvío estándar = 0.38).

Sobre garrapatas menores a 4 mm se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los tratamientos en relación con el testigo. El mayor efecto de patogenicidad visible a través de la mortalidad corresponde a la cepa de *A. muscarius* en las dos concentraciones más altas (10^7 y 10^8 con/mL), sin diferencias significativas entre estas dosis y con diferencias significativas de los demás tratamientos. *B. bassiana* y *M. anisopliae* en las concentraciones más altas (10^7 y 10^8 con/mL) no mostraron diferencias significativas con *A. muscarius* en su dosis más baja, concluyendo que *A. muscarius* es la cepa más patogénica sobre garrapatas de menor desarrollo.

En la Tabla 3 se presentan los datos de los resultados correspondientes a la mortalidad del grupo de garrapatas de mayor desarrollo (mayores a 4 mm) con cada cepa y en las tres diferentes concentraciones mencionadas en Tabla 2 (C1, C2 y C3).

TABLA 3. Patogenicidad de las diferentes cepas, en diferentes concentraciones, en el grupo de garrapatas de las últimas etapas de desarrollo (expresado en porcentaje de mortalidad a los 13 días), mayores a 4 mm.

Tratamiento	Media del porcentaje de mortalidad en garrapatas adultas (%)
Testigo	16,67 ± 1,73 a
<i>A. muscarius</i> C1	33,33 ± 3,46 b
<i>A. muscarius</i> C3	43,33 ± 3,46 c
<i>A. muscarius</i> C2	63,33 ± 4,35 d
<i>B. bassiana</i> C1	64,44 ± 4,04 de
<i>B. bassiana</i> C3	77,77 ± 2,51 de
<i>B. bassiana</i> C2	80,00 ± 2,00 de
<i>M. anisopliae</i> C1	86,66 ± 3,00 de
<i>M. anisopliae</i> C3	91,11 ± 3,78 de
<i>M. anisopliae</i> C2	97,77 ± 1,15 f

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; desvío estándar = 1,55).

Para este grupo de desarrollo también se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$ %) en la capacidad patogénica de todos los aislamientos en las tres concentraciones en relación con el tratamiento testigo. Las cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* en cualquiera de las tres concentraciones, y la de *A. muscarius* en la concentración de 10^7 con/mL, no mostraron diferencias significativas. Los resultados concuerdan con el efecto acaricida encontrado por Beltran-Alzate, (2008), Fernández-Salas (2017) y Martínez-García et al., (2023).

El efecto de los tratamientos sobre la inhibición de la oviposición se presenta a continuación:

TABLA 4. Porcentaje de inhibición de la oviposición (%).

Tratamiento	Media del porcentaje de inhibición de la oviposición (%)
<i>A. muscarius</i> C1	7,48 ± 2,81 a
<i>A. muscarius</i> C2	9,86 ± 3,98 ab
<i>M. anisopliae</i> C1	13,78 ± 1,55 bcd
<i>M. anisopliae</i> C2	25,51 ± 4,62 abc
<i>A. muscarius</i> C3	25,68 ± 9,06 bcd
<i>B. bassiana</i> C1	29,42 ± 5,21 cd
<i>B. bassiana</i> C2	39,29 ± 7,36 de
<i>M. anisopliae</i> C3	40,99 ± 8,01 de
<i>B. bassiana</i> C3	48,30 ± 3,86 e

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$; desvío estándar = 14,62).

Los resultados, tal como se observa en Tabla 4, muestran que todos los aislamientos en las diferentes concentraciones (con excepción de la menor concentración de *A. muscarius*) presentan diferencias significativas en la inhibición de oviposición respecto al testigo. El resultado de la cepa de *B. bassiana* concuerda con los autores Yari Briones et al. (2021), quienes también reportan la capacidad inhibitoria de esta especie sobre la oviposición. Asimismo, autores como Fernandez-Salas et al. (2017) destacan el efecto de *M. anisopliae* en la reducción de la masa de huevos, considerándolo muy importante pues de esta forma se reducen las poblaciones o infestaciones en el campo.

El efecto de los diferentes tratamientos (cepas y concentraciones) sobre la eclosión de huevos se presenta a continuación, mediante la evaluación del porcentaje de larvas nacidas, contabilizadas a partir de los cascarones rotos y no rotos.

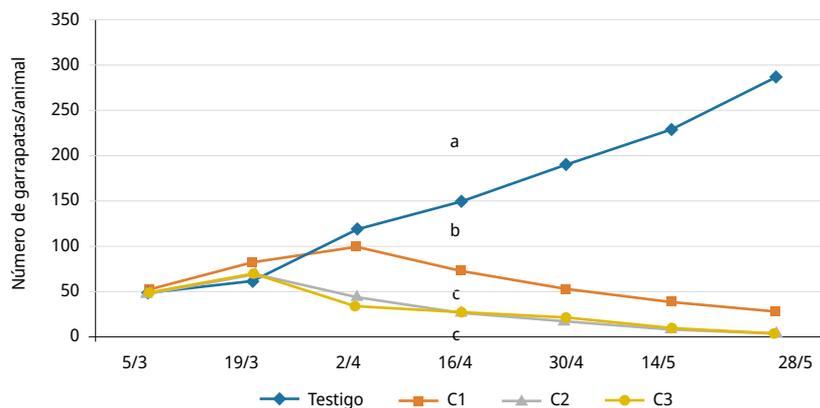
TABLA 5. Efecto de los tratamientos sobre la eclosión de huevos, contabilizados a partir de cascarones vacíos en porcentaje.

Tratamiento	Media del porcentaje de eclosión de huevos (%)
<i>M. anisopliae</i> C1	17,33 ± 0,05 a
<i>M. anisopliae</i> C2	19,33 ± 0,08 a
<i>M. anisopliae</i> C3	19,67 ± 0,05 a
<i>B. bassiana</i> C1	37,33 ± 0,04 b
<i>B. bassiana</i> C2	42,67 ± 0,02 b
<i>B. bassiana</i> C3	44,00 ± 0,08 bc
<i>A. muscarius</i> C1	46,67 ± 0,06 bcd
<i>A. muscarius</i> C3	57,67 ± 0,02 cd
<i>A. muscarius</i> C2	61,33 ± 0,04 d
Testigo	84,67 ± 0,01 e

Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$; desvío estándar = 0,21).

Los resultados del efecto de los tratamientos sobre el nacimiento de larvas muestran que todos los aislamientos en las diferentes concentraciones fueron capaces de inhibir la eclosión de garrapatas con diferencias significativas ($p < 0,05\%$) respecto al testigo. El tratamiento con *M. anisopliae* fue el que más influyó en este parámetro, sin diferencias significativas según las concentraciones y con diferencias significativas en relación con los demás tratamientos de las otras cepas en cualquiera de sus concentraciones. Estos resultados corroboran la información de López et al. (2009) sobre el efecto de *M. anisopliae* en la disminución de nacimientos de larvas.

Siendo *A. muscarius* la cepa que mostró mejores capacidades de patogenizar las primeras etapas de desarrollo de garrapatas, y *B. bassiana* junto a *M. anisopliae* de afectar los parámetros reproductivos, se pensó que una combinación de estas cepas puede brindar los mejores resultados en la disminución poblacional de las garrapatas. Por esta razón se definió realizar el ensayo de campo con una combinación de las tres cepas, en diferentes concentraciones (10^6 , 10^7 , 10^8 con/mL).



Letras diferentes indican diferencias significativas a partir de los 45 días del inicio del tratamiento.

FIGURA 3. Bioensayo a campo. Evolución del promedio del número de garrapatas por vacuno ($p < 0,05$; desvío estándar = 0,46).

El ensayo a campo mostró un aumento relativo de la cantidad de garrapatas por animal en los primeros 30 días en todos los tratamientos, aunque este incremento fue menor, tal como se aprecia en la Figura 5, en los tratamientos con hongos en relación al testigo con agua. Posteriormente y a partir de los 45 días (tercera aplicación), se comenzó a visualizar el potencial de disminución significativa de garrapatas sobre los animales tratados con las 3 diferentes concentraciones en relación con el tratamiento testigo con agua. Esta disminución de garrapatas se va acentuando al tiempo que en el tratamiento testigo crece la presencia de la plaga. Se resaltan los tiempos requeridos para evidenciar la acción patogénica a campo (45 días) y, por ende, la herramienta de control biológico para efectivizar el control y disminuir la infestación de la plaga por animal.

Al no haber diferencias significativas entre los tratamientos de 10^8 y 10^7 con/mL y sí con el tratamiento de 10^6 con/mL, se propone usar concentraciones de 10^7 con/mL.

Los ensayos de laboratorio mostraron que las cepas afectan con diferentes potenciales a cada etapa de desarrollo de la plaga, y la mezcla de hongos evidenció su potencial a campo, resultado acorde con los obtenidos por Zeina et al. (2022). Si bien los resultados a campo corroboran el potencial de control, es necesario y recomendable repetirlos en el tiempo para obtener conclusiones acerca de la efectividad real.

CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra, en primer lugar, la riqueza de especies de hongos acaropatogénicos a través de la prospección realizada en suelos de Uruguay. A partir de una primera evaluación de dicha capacidad sobre *R. microplus*, se seleccionaron tres cepas para la realización de bioensayos que permitieran profundizar en el conocimiento, las cuales fueron identificadas molecularmente como *Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*.

Las evaluaciones sobre las diferentes fases de desarrollo de la garrapata y sobre su reproducción muestran el potencial de uso de estos agentes de control sobre la plaga,

lo que representa un aporte importante ya que en Uruguay solo se dispone de ixodas químicos, a los cuales la plaga ha desarrollado resistencias.

Se infiere que el uso combinado de las diferentes cepas puede mejorar el potencial de control sobre la plaga debido a que cada una de ellas tiene capacidades patogénicas diferentes sobre los distintos estados de desarrollo de garrapatas, así como también sobre los parámetros reproductivos evaluados en este trabajo (oviposición y eclosión de los huevos).

Si bien es importante realizar nuevos ensayos de campo para determinar el potencial real, este trabajo arroja información promisoriosa sobre el efecto de la disminución de *R. microplus* a partir de la tercera aplicación de una mezcla de cepas (*Akantomyces muscarius*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*) tanto en concentraciones de 10^7 como de 10^8 con/mL.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Ing. Agr. Virginia Rossi (UDELAR) y Eduardo Chía (INRAE Francia) por el aporte incondicional y dedicada contribución para promover mejoras y motivar la generación de este material a partir de las experiencias prácticas. Al Ing Agr. Mag. José Fernando Restrepo H, por desarrollar los análisis estadísticos necesarios y aportar a su discusión.

REFERENCIAS

- Alonso-Díaz, M.A.; Fernández-Salas, A.; Galindo-Velasco, E.; Lezama-Gutiérrez, R. y Contreras-Lara, R. 2022. Effect of *Metarhizium anisopliae* 1 (Ma14 strain) against *Rhipicephalus microplus* 2 on cattle infested naturally. En: *Southwestern Entomologist*, 47(2), pp. 285-290. DOI: <https://doi.org/10.3958/059.047.0203>
- Álvarez, M.; Castillo, I.; Garrastazu, C.; Gonzalo, R. y Ordóñez, J., 2017. *Dípteros y garrapatas: un problema de salud pública. Dípteros y garrapatas: un problema de salud pública uso responsable de los repelentes*. Madrid: COFM. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM017994.pdf>
- Angelo, I.; Fernandes, E.; Bahiense, T.; Perinotto, W.; Golo, P.; Moraes, A. y Bittencourt, V., 2012. Virulence of *Isaria sp.* and *Purpureocillium lilacinum* to *Rhipicephalus microplus* tick under laboratory conditions. En: *Parasitology Research*, 111(4), pp. 1473-1480. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2982-y>
- Angelo, I. C.; Fernandes, É. K. K.; Bahiense, T. C.; Perinotto, W. M. S.; Moraes, A. P. R.; Terra, A. L. M. y Bittencourt, V. E. P., 2010. Efficiency of *Lecanicillium lecanii* to control the tick *Rhipicephalus microplus*. En: *Veterinary Parasitology*, 172(3-4), pp. 317-322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.038>
- Aparicio-Medina, J. M.; Paredes-Venegas, V.; González-López, O. y Navarro-Reyes, O., 2011. Impacto de la ivermectina sobre el ambiente [En línea]. En: *La Calera*, 11(17), pp. 64-66. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://lcalera.una.edu.ni/index.php/CALERA/article/view/144>

- Arguedas, M.; Álvarez, V. y Bonilla, R., 2020. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) [En línea]. En: *Agronomía Costarricense, Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(2), pp. 137-147. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: https://www.mag.go.cr/rev_agr/v32n02-137.pdf
- Bahiense, T. C.; Fernandes, É. K. y Bittencourt, V.R.E.P., 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus tick*. En: *Veterinary Parasitology*, 141 (3-4), pp. 319-324.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.011>
- Beltran-Alzate, C., 2008. Patogenicidad de *Lecanicillium lecanii* (fungi) sobre la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), en laboratorio. En: *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), pp. 90-97. [Consulta 31 de octubre de 2023].
Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882008000100012
- Beys da Silva, W. O.; Santi, L.; Corrêa, A. P. F.; Silva, L. A. D.; Bresciani, F. R.; Schrank, A. y Vainstein, M. H., 2010. The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. En: *Fungal Biology*, 114(11-12), pp. 911-916.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.007>
- Beys da Silva, W.; Rosa, R.; Berger, M.; Coutinho-Rodrigues, C. J.; Vainstein, M.; Schrank, A.; and Bittencourt, V. y Santi, L. 2020. Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). En: *Experimental Parasitology*, 208, 107812. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Bidochka, M. J.; Mc Donald, M. A.; St.Leger, R.J. y Roberts, D. W., 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). En: *Current Genetics*, 25, pp. 107-113.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00309534>
- Bischoff, J. F.; Rehner, S. A. y Humber, R. A., 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. En: *Mycologia*, 101(4), pp. 512-530.
DOI: <https://doi.org/10.3852/07-202>
- Bittencourt, V., 2000. Trials to control South American Ticks with Entomopatogenic Fungi. En: *Annals New York Academy of Science*, 916, pp. 555-558.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05335.x>
- Bittencourt, V. R. E. P.; Bahiense, T. C.; Fernandes, E. K. K. y Souza, E. J., 2003. Avaliação da ação in vivo de *Metarhizium anisopliae* (Metschnikof, 1879) Sorokin, 1883 aplicado sobre *Brachiaria decumbens* infestada com larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini 1883) (Acari: Ixodidae). En: *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(1), pp. 38-42. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: http://www.ufrjr.br/rbpv/1212003/c12138_42.pdf
- Brady, B. L., 1979. *Verticillium lecanii* (Zimm). Viegas. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. En: *Commonwealth Mycological Institute*, 82(811).
- Carballo, M. y Guharay, F., eds., 2004. *Control biológico de plagas agrícolas*. Managua: CATIE. (Serie Técnica. Manual técnico/CATIE, 53). [Consulta 31 de octubre de 2023].
Disponible en: <https://bit.ly/3TrkSCz>
- Carbone, I. y Kohn, L. M., 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. En: *Mycologia*, 91, pp. 553-556.

- Cardona, Z. A., 2005. *Evaluación de Metarhizium anisopoleae y Beauveria bassiana sobre los estados de desarrollo de Boophilus microplus*. Medellín: Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia. (Tesis de Maestría).
- Cardozo, H. y Franchi, M., 1994. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: A. Nari, y C. Fiel. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en Bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control*. pp. 369-402. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Castro-Janer, E.; Schumaker, T. T. S.; Klafke, G. M., Rifran, L., González, P., Niell, C., Namindome, A.; Gil, A.; Piaggio, J.; Martins, J.R.; Mendes, M. C. y Miller, R. J., 2012. *Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil* [En línea]. Montevideo: INIA. [Consulta 31 de octubre de 2023].
Disponible en: <https://bit.ly/4apbWUi>
- CONtexto Ganadero, 2023. *Ganadería: Control biológico de la garrapata con el uso de hongos patógenicos* [En línea]. Bogotá: CONtexto Ganadero. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/control-biologico-de-la-garrapata-con-el-uso-de-hongos-patogenicos>
- Cuore, U., 2006. Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas [En línea]. XXXIV *Jornada de Buiatría*. Paysandú, Uruguay (8-10 de junio de 2006). Paysandú: Uruguay. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/handle/123456789/279>
- Cuore, U.; Altuna, M.; Cicero, L.; Fernández, F.; Luengo, L.; Mendoza, R.; Nari, A.; Pérez Rama, R.; Solari, M. y Trelles, A., 2012. Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay [En línea]. En: *Veterinaria*, 48(187), pp. 5-13. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/204>
- Cuore, U.; Cardozo, H.; Solari, M. y Cicero, L., 2013. Epidemiología y control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En: Fiel, C. y Nari, A., eds. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes: fundamentos epidemiológicos para su prevención y control*. 2a. ed. Montevideo: Hemisferio Sur. pp. 457-484.
- Cuore, U. y Solari, M. A., 2014. Poblaciones multirresistentes de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. En: *Veterinaria*, 50(193), pp. 4-13. [Consulta: 30 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/247>
- Cuore, U. y Solari, M., 2022. *Manual práctico para el control de la garrapata común del ganado y enfermedades asociadas* [En línea]. Montevideo: CEV. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/manual-practico-para-control-garrapata-comun-del-ganado-enfermedades#>
- De La Cruz, M. J. y Vahos, Z. R., 2004. Evaluación de los hongos *Metarhizium anisoplice* y *Beauveria bassiana* para el control de la garrapata *Boophuius microplus* a nivel de campo. En: *Revista de Investigaciones*, 3(1); pp. 75-94.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>
- Drummond, O. y Whetstone, M., 1969. Oviposition of the gulf coast tick. En: *Journal of Economic Entomology*, 63(5), pp. 1547-1551. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/63.5.1547>

- Esser, Karl; Lemke, Paul A. y Bennett, J. W., 1994. *The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research*. Berlín: Springer-Verlag.
- Errico, F.; Nari, A.; Cuore, U.; Mendoza, R.; Suárez, H.; Mesa, P.; Fernandez, S.; Sosa, E.; Salada, D. y Saporiti, D., 2009. Una nueva ley de lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* en el Uruguay. En: *Revista Plan Agropecuario*, 131, pp.42-47.
- FAO e INRA, 2015. *Enfoques innovadores: que vinculan la producción sostenible y agroecológica con mercados en los países en desarrollo. Taller para profesionales e Investigadores* [En línea]. Bogotá: Fondo de Cultura Económica. [Consulta: 9 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/az561s/az561s.pdf>
- Fassiatiova, O.; Hostounski, Z.; Mixikova, S. y Samsinakova. A., 1978. *Hongos entomófagos de plagas en Cuba*. La Habana: Instituto de Zoología, Academia de Ciencias de Cuba. pp. 1-14.
- Fernández, E. K., Bitencourt, V. R. y Roberts, D. W., 2012. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. En: *Experimental Parasitology*, 130(3), pp. 300-305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>
- Fernández, R. M.; Zhioua, E. y García, V. Z., 2005. Infectividad de *Metarhizium anisopliae* en contra de cepas de garrapata *Boophilus microplus* sensible y resistente a los organofosforados. En: *Técnica Pecuaria en México*, 43(3), pp. 433-440.
- Fernández-Salas, A.; Alonso-Díaz, M. A.; Alonso-Morales, R. A.; Lezama-Gutiérrez, R.; Rodríguez-Rodríguez, J. C. y Cervantes-Chávez, J.A. 2017. Acaricidal activity of *Metarhizium anisopliae* isolated from paddocks in the Mexican tropics against two populations of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. En: *Medical and Veterinary Entomology*, 31, pp. 36-43. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12203>
- Fragas, I.; Gema, G. F. e Hidalgo, L., 2006. *Formulación de hongos entomopatógenos como control biológico*. La Habana: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.
- Frazzon, A. P. G.; Vaz Junior, I. D. S.; Masuda, A.; Schrank, A. y Vainstein, M. H., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. En: *Veterinary Parasitology*, 94(1-2), pp. 117-125. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00368-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00368-x)
- Goettel, M. S. y Inglis, G. D., 1997. Fungi: *Hyphomycetes*. En: Lacey, L. A., ed. *Manual of techniques in insect pathology*. Nueva York: Academic Press. pp. 213-249.
- Gómez-Beltrán, D. A.; Pérez Montes, J. E. y Villar, D., 2023. Impacto ecológico del insecticida fipronil: valoración de riesgos en humanos. En: *Revista Med. Vet. Zoot.*, 70(1), pp. 65-84. DOI: <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v70n1.100631>
- Gindin, G.; Samish, M.; Alekseev, E. y Glazer, I., 2001. The susceptibility on *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. En: *Biocontrol Science and Technology*, 11(1), pp. 111-118. DOI: <https://doi.org/10.1080/09583150020029790>
- Glass, N. L. y Donaldson, G. C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 61, pp. 1323-1330. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Gutiérrez, A. C.; Machado, J. A. R.; Hubner-Campos, R.; Pennisi, M. A.; Rodrigues, J.; López Lástra, C. C.; García, J. J.; Fernandes, É. K. y Luz, C., 2016. Nuevos conocimientos sobre la infección de las ninfas de la cucaracha americana *Periplaneta americana*

- con *Metarhizium anisopliae* sl (Ascomycota: Hypocreales). En: *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), pp. 1373–1383. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13254>
- Hall, R. A. y Atkey, P. T., 1981. An ultra-structural study of blastospores and conidiospores of *Verticillium lecanii*. En: Glasshouse Crops Research Institute. *Annual report*. Littlehampton: Glasshouse Crops Research Institute. pp. 119-120.
- Hornbostel, V. L.; Zhioua, E.; Benjamin, M. A.; Ginsberg, H. S. y Ostfeld, R. S., 2005. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. En: *Experimental and Applied Acarology*, 35, pp. 301-316. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10493-004-5437-z>
- Humber, R. A., 1997. Fungi: Identification. En: Lacey, L. A., ed. *Manual of techniques in insect pathology*, pp. 153-158. New York: Academic Press. ISBN: 9780080535777.
- Kunz, S. E. y Kemp, D. H., 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. En: *Review Scientific Technology*, 13(4), pp. 1249-1286. DOI: <https://doi.org/10.20506/rst.13.4.816>.
- López, E.; López, G. y Orduz, S. 2009. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. En: *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), pp. 42-46. DOI: <https://doi.org/10.25100/socolen.v35i1.9187>
- Maranga, M.; Kaaya, G.; Mueke, J. y Hassanali, A., 2005. Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopleae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (Ixodidae) in relation to seasonal changes. En: *Mycopathologia*, 159, pp. 527-532. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0659-3>
- Martínez-García, J.; Abad-Zavaleta, J.; García-Gómez, M. y Núñez-Gaona, O., 2023. In vitro evaluation of the acaricidal potential of *Beauveria bassiana* DS3.17 on the common tick (*Rhipicephalus microplus*) in Oaxaca, Mexico. En: *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 14(3), pp. 644-657. DOI: <https://doi.org/10.22319/rmcp.v14i3.6265>
- Ment, D.; Gindin, G.; Glazer, I., Perl, S.; Elad, D. y Samish, M., 2010. The effect of temperature and relative humidity on the formation of *Metarhizium anisoplice* chlamydospores in tick eggs. En: *Fungal Biology*, 114(1), pp. 4-56. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.10.005>
- Moreno, R.; Hernández, F.; Benavides, E.; Cotes, A. M.; Romero, A.; Gómez, M. L. y García, L. P., 2001. Evaluación in vitro de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* para el control de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini) (Mestastigmata: Ixodidae). En: Sociedad Colombiana de Entomología. *XVIII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología*. Pereira, Colombia (8-10 de agosto de 2001). Pereira: Colombia.
- Nicoletti, R. y Becchimanzi, A., 2020. Endophytism of *Lecanicillium* and *Akanthomyces*. agriculture. En: *Agriculture*, 10(6), 205. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture10060205>
- Nari, A. y Fiel, C., eds., 1994. *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Ojeda-Chi, M. M.; Rodríguez-Vivas, R. I.; Galindo Velasco, E. y Lezama-Gutiérrez, R., 2010. Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the

- Mexican tropics. En: *Veterinary Parasitology*, 170(3-4), pp. 348-354.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.022>
- Ojeda-Chi, M.; Rodríguez-Vivas, R.; Galindo-Velasco, E.; Lezama-Gutiérrez, R. y Cruz-Vázquez, C., 2011. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revisión. En: *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*, 2(2), pp. 177-192. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v2n2/v2n2a5.pdf>
- Pal, S.; St. Leger, R. J. y Wu, L. P., 2007. Fungal peptide Destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. En: *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), pp. 8969-8977.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M605927200>
- Petraccia, C.; Cardozo, H.; Nari, A. y Solari, M. A., 1983. Estudios de resistencia a garrapaticidas organofosforados (OF) en *Boophilus microplus*: Resultados obtenidos en cepas de campo llegadas al CI Vet." Miguel C. Rubino" durante los años 1981 y 1982. En: *Veterinaria*, 19(83), pp. 5-9. [Consulta 31 de octubre de 2023].
Disponible: <https://revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/997>
- Pirahi-Kheirabadi, K.; Haddadzadeh, H.; Razzaghi-Abyaneh, M.; Bokaie, S.; Zare, R.; Ghazavi, M.; y Shams-Ghafarokhi, M., 2007. Biological control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* by different strains of *Metarhizium anisopleae*, *Beauveria bassiana* and *Lecanicillium psalliotae* fungi. En: *Parasitological Research*, 100, pp. 1297-1302. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0410-x>
- Posadas, J. y Lecuona, R., 2009. Selection of native isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) for the microbial control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae). En: *Journal of Medical Entomology*, 46(2), pp. 284-291.
DOI: <https://doi.org/10.1603/033.046.0213>
- Pucheta-Díaz, M.; Flores-Macias, A.; Rodríguez-Navarro, S. y De La Torre, M., 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Caracas, Venezuela. En: *Interciencia*, 31(12), pp.856-860. [Consulta 31 de octubre de 2023].
Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>
- Pulido-Medellin, M. O.; Rodríguez-Vivas, R. I.; García-Corredor, D. J.; Díaz-Anaya, A. y Andrade-Becerra, R., 2015. Evaluación de la eficacia de la CEPA MAF1309 de *Metarhizium anisopliar* en el control biológico de garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* en Tunja, Colombia. En: *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 56(2), pp. 75-81. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ve.scielo.org/pdf/rfvc/v56n2/art04.pdf>
- Rehner, S. A. y Buckley, E. A., 2005. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. En: *Mycologia*, 97(1), pp. 84-98.
DOI: <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.84>.
- Rijo-Camacho, E., 2011. *Control de garrapata del ganado, Boophilus microplus* (Canestrini) con hongos entomopatógenos. La Habana: Laboratorio de Entomófagos INISAV.
- Rijo, C. E.; Navarro, G.; Rodríguez, R. M. y Murillo, E. Y., 1998. Efectividad de *Verticillium lecanii* sobre la fase parasítica de la garrapata *Boophilus microplus* (Acari: *Metastigmata* Ixodidae). En: *Revista Colombiana de Entomología*, 24(2), pp. 67- 69. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://bit.ly/3v0wKkN>

- Rodríguez dos Santos, A., 2003. *Una alternativa con hongos entomopatógenos nativos para el control de Trialeurodes vaporariorum (West) en el cultivo de tomate en invernáculos en Uruguay*. La Habana: Universidad Agraria de la Habana. (Tesis de doctorado).
- Rodríguez dos Santos, A.; Bernardo, J.; Meirelles, R.; Da Silva, R. y Criveletto, C., 2018. *Isolamento on farm de fungos patogénicos de hormigas (géneros Atta sp y Acromyrmex sp) y carrapatos (Rhipicephalus)*. En: Grupo de Agricultura Sustentável. 2º Forum de Agricultura Sustentável. Goiana, Brasil (20-22 de agosto de 2018). Goiana: Brasil.
- Samish, M. y Rehacek, J., 1999. *Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control*. En: *Annual Review of Entomology*, 44(1), pp. 159-182.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.159>
- Samnsinakova, A., 1977. The effects of fungic preparations on larvae of the colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. En: *Acta Entomológica Bohemoslovaca*, 74(2), pp. 76-80. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://kramerius.lib.cas.cz/view/uuid:be72f4c3-148b-11e1-1729-001143e3f55c?page=uuid:be72f516-148b-11e1-1729-001143e3f55c>
- Santi, L.; Coutinho-Rodrigues, C. J. B.; Berger, M.; Klein, L. A. S.; De Souza, E. M.; Rosa, R. L.; Guimarães, J. A.; Yates, J. R.; Perinotto, W. M. S.; Bittencourt, V. R. E. P. y Beys-da-Silva, W.O., 2019. Secretomic analysis of *Beauveria bassiana* related to cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, infection. En: *Folia Microbiol.*, 64(3), pp. 361-372.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0659-3>
- Santos, M. L.; Pereira, J. R.; Fiorini, L. C.; Duarte, F. C.; Almeida, I. B.; Roma, J., Luiz C.; Soares, Weber V.B.; Bendassolli, R. H.; Almeida, J., E.M. y Mendes, M. C., 2022. *Control of cattle tick in pasture with Metharizium anisopliae (IBCB 425)*. En: *Systematic & Applied Acarology*, 27(11), pp. 2131-2138. DOI: <https://doi.org/10.11158/saa.27.11.1>
- Schrank, A. y Vainstein, M. H., 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. En: *Toxicon*, 56, pp. 1267-1274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Shah, P.A., y Pell, J.K. 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, pp. 413-423.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1240-8>
- Solari, M. A.; Dutra, F. y Quintana, S., 2013. Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (Babesia y Anaplasma) en el Uruguay. En: Fiel, C. y Nari, A. *Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Fundamentos para su prevención y control*. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pp. 657-608.
- Souza, C., 2021. *Besouro conhecido como "rola-bosta" ganha destaque nas telas e nas pesquisas* [En línea]. Lavras: Universidade Federal de Lavras. [Consulta 31 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://ufla.br/noticias/pesquisa/13164-besouro-conhecido-como-rola-bosta-ganha-destaque-nas-telas-e-nas-pesquisas>
- St. Leger, R. J., 1993. Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by *Deuteromycete fungal* pathogens. En: Beckage, N. E.; Thompson, S. N. y Federici, B. A., ed. *Parasites and pathogens of insects*. San Diego: Academic Press. pp. 211- 229.
- Steel, R. G. y Torrie, J. H., 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2da ed. Nueva York: McGraw-Hill.
- Sullivan, C. F.; Parker, B. L. y Skinner, M., 2022. A review of commercial *Metarhizium*- and *Beauveria*-based biopesticides for the biological control of ticks in the USA. En: *Insects*, 13(3), 260. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13030260>

- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. y Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. En: *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725–2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Tofiño Rivera, A. P.; Ortega Cuadros, M.; Pedraza Claros, B.; Perdomo Ayola, S.C. y Moya Romero D.C., 2018. Efectividad de *Beauveria bassiana* (Baubassil®) sobre la garrapata común del ganado bovino *Rhipicephalus microplus* en el Departamento de la Guajira, Colombia. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), pp. 426-430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.10.005>
- Uruguay. Ley 3.606, de 13 de abril de 1910. *Diario Oficial* [En línea], 26 de abril de 1910. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/3606-1910>
- Uruguay. Ley 18268, de 17 de abril de 2008. *Diario Oficial* [En línea], 25 de abril de 2008. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008>
- Uruguay. Ley 19717, de 21 de diciembre de 2018. *Diario Oficial* [En línea], 23 de enero de 2019. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/diariooficial/2019/01/23/12>
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Servicios Veterinarios, 1994. *Garrapata Boophilus microplus. Epidemiología y campaña sanitaria*. Montevideo: MGAP.
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2022. *MDR Paysandú: Presentan resultados del proyecto Control Biológico de Garrapata* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/presentan-resultados-del-proyecto-control-biologico-garrapata>
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2023a. *Capacitación sobre control integrado de garrapata bovina en Curticeiras* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 28 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/capacitacion-sobre-control-integrado-garrapata-ovina-curticeiras>
- Uruguay. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2023b. *Nueva jornada sobre control integrado de garrapata bovina en SFR Curticeiras* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 5 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/nueva-jornada-sobre-control-integrado-garrapata-ovina-sfr-curticeiras>.
- Verrissimo, C. J., 1995. Inimigos naturais do carrapato parasita dos bovinos. En: *Agropecuária Catarinense*, 8(1), pp. 35-37.
- Verissimo, C. J., 2013. Controle biológico do carrapato do boi, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Brasil. En: *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 11(1), pp. 14-23. DOI: <https://doi.org/10.36440/recmvz.v11i1.5370>
- Wang, C. y St Leger, R. J., 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. En: *Eukaryotic Cell*, 6(5), pp. 808–816. DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>

- Webster, A.; Pradel, E.; Souza, U. A.; Martins, J. R.; Reck, J.; Schrank, A. y Klafke, G., 2017. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? En: *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(2), pp. 270-274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.11.012>
- Wraight, S.P.; Carruthers, R.; Bradley, C. A.; Jaronski, S. T.; Lacey, L. A.; Wood, P. y Galaini-Wraight, S., 1998. Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces spp.* and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. En: *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(3), pp. 217-26. DOI: <https://doi.org/10.1006/jjipa.1997.4734>
- Yari Briones, D. I.; Paredes-Valderrama, J. R.; Milla Pino, M. E. y Murga Valderrama, N. L., 2021. Efecto del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* en el control de garrapatoxis en ganado bovino. En: *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(5). DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19586>
- Zeina, G. W.; Ahmed, M.; Saeed, M.; Ziena, L. y Laing, M., 2022. Field evaluation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for the biocontrol of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) ticks on cattle. En: *Experimental Parasitology*, 235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108215>

Comparación interlaboratorio para medición de masa convencional en cinco laboratorios: aportes a la infraestructura de la calidad en Panamá y República Dominicana

Interlaboratory comparison for conventional mass measurement in five laboratories: contributions to the quality infrastructure in Panama and the Dominican Republic

Comparaçãõ interlaboratorial para mediçãõ de massa convencional em cinco laborat3rios: contribuições para a infraestruturã de qualidade no Panam3 e na Rep3blica Dominicana

 SAÚL GARCÍA (1)

 DAVID SING (1)

 MAGALYS D'OLEO (2)

 EPIFANÍA DE ROTAR (3)

 MARGARITA ABRAHAM (4)

 JULIO DIMAS (5)

 JOSÉ ALEJANDRO LÓPEZ (5)

(1) Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP), Panamá.

(2) Laboratorio Nacional de Masas y Volumen del INDOCAL, República Dominicana.

(3) Laboratorio de Metrología Biomédica, PROMED, Panamá.

(4) Centro Experimental de Ingeniería (CEI), Universidad Tecnológica de Panamá (UTP), Panamá.

(5) Laboratorio de Calibración CALINHOUSE S.A., Panamá.

RECIBIDO: 25/7/2023 → APROBADO: 1/9/2023 ✉ sgarcia@cenamep.org.pa

RESUMEN

Este artículo describe los resultados de una comparación entre cinco laboratorios de metrología, ubicados en Panamá y República Dominicana, con mediciones realizadas desde julio hasta septiembre de 2022. La intercomparación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de los laboratorios para calibrar patrones de masas de clase de exactitud F1, en el rango de 2 mg a 2 kg, así como de clase M1 de 20 kg, en concordancia con lo establecido en la Recomendación Internacional OIML R 111-1. Debido a que los participantes obtuvieron de manera consistente resultados satisfactorios, no fue necesario implementar acciones correctivas en los laboratorios participantes para la

mejora de sus procesos de calibración de patrones de masas. Con los resultados de este estudio se fortalece la confianza de la gestión técnica de los cinco laboratorios participantes y, en consecuencia, de la infraestructura nacional de la calidad.

Palabras clave: instrumento de pesar, magnitud mecánica, metrología, patrones de masa.

ABSTRACT

This article describes the results of a comparison between five metrology laboratories, located in Panama and the Dominican Republic, with measurements carried out from July to September 2022. The objective of the intercomparison was to evaluate the capacity of the laboratories to calibrate mass standards of class of accuracy F1, in the range from 2 mg to 2 kg, as well as class M1 of 20 kg, in accordance with the provisions of the International Recommendation OIML R 111-1. Because the participants consistently had satisfactory results, it was not necessary to implement corrective actions in the participating laboratories to improve their mass standard calibration processes. The results of this study strengthen the confidence of the technical management of the five participating laboratories and, consequently, of the national quality infrastructure.

Keywords: mass standard, mechanical quantity, metrology, weighing instrument.

RESUMO

Este artigo descreve os resultados de uma comparação entre cinco laboratórios de metrologia, localizados no Panamá e na República Dominicana, com medições realizadas de julho a setembro de 2022. O objetivo da intercomparação foi avaliar a capacidade dos laboratórios para calibrar padrões de massa de classe de precisão F1, na faixa de 2 mg a 2 kg, bem como classe M1 de 20 kg, de acordo com o disposto na Recomendação Internacional OIML R 111-1. Como os participantes obtiveram consistentemente resultados satisfatórios, não foi necessário implementar ações corretivas nos laboratórios participantes para melhorar seus processos de calibração de padrão de massa. Os resultados deste estudo reforçam a confiança da direção técnica dos cinco laboratórios participantes e, conseqüentemente, da infraestrutura nacional de qualidade.

Palavras-chave: instrumento de pesagem, metrologia, padrão de peso, quantidade mecânica.

INTRODUCCIÓN

Una de las magnitudes más comúnmente utilizadas en cualquier país es la masa. La mayor parte de las transacciones comerciales, los tratamientos médico-químicos y la fabricación de concretos, entre otros procesos, se valen del uso de instrumentos de pesar -como las balanzas y las básculas- para tazar o dosificar la masa requerida de un producto específico.

Garantizar el estado adecuado de estos instrumentos requiere de la intervención de los laboratorios de metrología. Dichos laboratorios, mediante la aplicación de métodos normalizados y con el uso de patrones de medición calibrados, determinan los errores de

estos instrumentos, junto con sus incertidumbres asociadas; y con esta información se verifica si son aptos o no para un determinado fin, en la industria, por ejemplo.

Contar con una herramienta objetiva que ayude a evaluar los procesos de calibración de estos laboratorios resulta de mucha importancia para el Estado, ya que estos procesos de calibración repercuten directamente en la salud y la seguridad de la población, la protección del medio ambiente, la calidad y la equidad en las transacciones comerciales.

En una infraestructura de la calidad (IC) que funciona adecuadamente, todos los actores claves interactúan entre sí para brindar confianza a la sociedad respecto de los distintos roles que cada una de las instituciones desempeña (Gonçalves et al., 2014). Dichas instituciones pueden ser las entidades regulatorias, los organismos evaluadores de la conformidad, las entidades de normalización y reglamentación técnica, los laboratorios de prueba y los laboratorios de calibración, entre otras.

El Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP), en su calidad de Laboratorio Nacional de Metrología y como uno de los actores claves de la IC, tiene entre sus funciones establecer comparaciones interlaboratorios para mejorar o evidenciar la competencia técnica de los laboratorios de calibración y ensayos, como lo señala el Ministerio de Comercio e Industrias, el MICI (Panamá, 2007).

Este artículo describe los resultados de una comparación realizada entre cinco laboratorios de metrología, ubicados en dos países y que se llevó a cabo desde julio hasta septiembre de 2022. El estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad de los laboratorios participantes para calibrar patrones de masas de clase de exactitud F (en el rango de 2 mg a 2 kg) y de clase M1 de 20 kg, acordes con lo establecido en la Recomendación Internacional OIML R 111-1 (International Organization of Legal Metrology, 2004).

Dentro de la IC de un país dado, este tipo de patrones son utilizados para calibrar, ajustar y/o verificar balanzas o básculas de tipo industrial o comercial, lo cual representa un amplio alcance en el rango de las mediciones a nivel nacional y regional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sobre el protocolo de la comparación

Previo a realizar la comparación interlaboratorio fue necesario confeccionar su respectivo protocolo. Esto tuvo lugar entre los meses de febrero y junio del año 2022. El objetivo de este protocolo fue contar con un documento mutuamente acordado que sirviera como guía de trabajo para las actividades y aspectos técnicos más importantes de la comparación.

El protocolo fue realizado con la colaboración de los participantes y se incluyeron los siguientes tópicos: objetivo de la comparación, confidencialidad, costos de la participación, cronograma de actividades, periodo de inscripción, roles de los involucrados, información de contacto de los participantes, plan de medición de los participantes, procedimiento de embalaje y transporte, instrucciones respecto a la limpieza y manipulación de masas, método para el cálculo del valor de referencia, método de evaluación de desempeño de los participantes y, finalmente, plantillas para la declaración de los resultados. A continuación, se presentan los aspectos más relevantes de este protocolo.

Objetivo de la comparación interlaboratorio: evaluar y mejorar los procesos de calibración de masa convencional de los laboratorios participantes.

Plan de medición: cada laboratorio escogió los valores nominales en los cuales podía participar, de acuerdo con sus propias capacidades de calibración instaladas. Este plan se presenta en la Tabla 1.

TABLA 1. Plan de medición de los laboratorios participantes.

Nombre del laboratorio	200 mg	1 g	50 g	200 g	1 kg	2 kg	20 kg
Centro Experimental de Ingeniería (CEI), Universidad Tecnológica de Panamá (UTP)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Laboratorio de Calibración, CALINHOUSE S.A.							✓
Laboratorio de Metrología Biomédica de PROMED	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Laboratorio Nacional de Masas y Volumen (República Dominicana)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Centro Nacional de Metrología de Panamá (CENAMEP AIP, laboratorio piloto)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Confidencialidad de los datos: los resultados se presentaron en un informe asignando códigos de una letra a cada participante de modo que solo el laboratorio piloto (el CENAMEP AIP) y el laboratorio participante conociesen la letra asignada. Las letras asignadas a cada participante fueron determinadas al azar. Para el valor nominal de 20 kg fue necesario asignar un nuevo juego de letras a cada participante, ya que había un participante que solo medía en dicho valor (Tabla 1). Esta codificación garantizó el anonimato de los resultados durante el desarrollo del proceso experimental.

Trazabilidad de las mediciones: para la calibración de los patrones viajeros en el rango de 2 mg a 2 kg, el CENAMEP AIP utilizó un juego de masas de clase E1 de 1 mg a 2 kg, marca Häfner (con código interno CMP-M1-100), el cual se calibra en el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), de Alemania, cada dos años. El patrón viajero de 20 kg fue calibrado con una masa de 20 kg de clase F1, marca Häfner (con código interno CMP-M1-118), el cual se calibra en el CENAMEP AIP cada año. Este patrón, a su vez, es calibrado con 20 masas de 1 kg, de clase E2 (con códigos internos consecutivos que van desde CMP-M1-124 a CMP-M1-143) y son enviados a calibrar al PTB de Alemania cada dos años.

Aseguramiento de la calidad de las mediciones: como parte del proceso de aseguramiento de la calidad de los datos de referencia, el laboratorio piloto realizó mediciones de estabilidad a los patrones de masas de la comparación (patrones viajeros) para verificar su aptitud. Esta evaluación se realizó durante 30 días, a partir del 1 de marzo del año 2022.

Además, se realizaron mediciones al inicio de la comparación, antes de la salida de los patrones viajeros hacia República Dominicana y al retorno de los patrones desde dicho país hacia Panamá. Por último, se verificó que los resultados fueran consistentes entre sí dentro de las incertidumbres declaradas por el laboratorio piloto.

Laboratorios participantes, patrones viajeros y su cronograma

Los cinco laboratorios participantes se presentaron en la Tabla 1. El CENAMEP AIP organizó y coordinó las actividades de la comparación en Panamá y República Dominicana, así como también proporcionó los patrones viajeros y sus valores de referencia. Las restantes entidades fungieron como laboratorios participantes.

Para la comparación se utilizó un conjunto de siete patrones de masa, de marca Häfner, cuya información más relevante se muestra en la Tabla 2. Esta información fue proporcionada a todos los laboratorios participantes en el protocolo de la comparación, con el objetivo de que se contara con toda la información requerida para el cálculo de los resultados acordes con el método de calibración.

TABLA 2. Información de los patrones viajeros.

Valor nominal	Clase ⁽¹⁾	Estabilidad encontrada	Densidad (kg/m ³)	Material	U (ρ) ⁽²⁾ (kg/m ³)	U (k=2) ⁽³⁾ (mg)
200 mg	E2	< 0.006 mg	7 950	Acero inoxidable	140	0.020
1 g	E2	< 0.010 mg	7 950	Acero inoxidable	140	0.03
50 g	E2	< 0.030 mg	7 950	Acero inoxidable	140	0.1
200 g	E2	< 0.10 mg	7 950	Acero inoxidable	140	0.3
1 kg	E2	< 0.5 mg	7 950	Acero inoxidable	140	1.6
2 kg	E2	< 1.0 mg	7 950	Acero inoxidable	140	3.0
20 kg	M1	< 100 mg	7 200	Hierro fundido	600	300

⁽¹⁾ Clase de exactitud declarada por el fabricante de las masas.

⁽²⁾ Incertidumbre expandida de la densidad con $k = 2$.

⁽³⁾ Incertidumbre expandida del valor de referencia con $k = 2$. Para los valores nominales de 200 mg a 2 kg, la incertidumbre declarada del valor de referencia corresponde a la incertidumbre de calibración declarada por CENAMEP AIP en el Apéndice C (Capacidades de Medición y Calibración, incertidumbres para masas F1) del MRA, BIPM.

Los valores declarados en la columna "Estabilidad encontrada" representan el máximo de estabilidad que se considera aceptable para la clase de exactitud de los patrones viajeros (aproximadamente 1/3 de la tolerancia de la clase). Adicionalmente, la incertidumbre declarada en el rango de 2 mg a 2 kg (Tabla 2), es la incertidumbre que el laboratorio piloto tiene reconocida en el Buró Internacional de Pesos y Medidas (BIPM). Esta incertidumbre se puede considerar apropiada para calibrar masas de clase F1 en el rango indicado. Para la masa de 20 kg, se declaró una incertidumbre de aproximadamente 1/3 de la tolerancia de la clase M1, tal como se había indicado en el protocolo de la comparación.

Es importante remarcar que este ejercicio de comparación no puede demostrar concordancia de las mediciones con los valores de referencia para incertidumbres más bajas que las declaradas para los valores de referencia. Esto principalmente debido a que

cualquier error de medición por parte de los participantes quedaría cubierto en vista de la incertidumbre relativamente alta de los valores de referencia.

Finalmente, los patrones viajeros se circularon entre los laboratorios participantes de acuerdo con el cronograma de medición presentado en la Tabla 3.

TABLA 3. Cronograma del desarrollo de las mediciones en los cinco laboratorios.

Descripción de la actividad	Fecha inicial	Fecha final
Medición inicial por parte del CENAMEP AIP	2022-07-11	2022-07-15
Medición en el Laboratorio de Metrología Biomédica (PROMED)	2022-07-29	2022-08-06
Medición en el Laboratorio CEI de la UTP	2022-08-08	2022-08-15
Medición en CALINHOUSE S.A.	2022-08-16	2022-08-19
Medición en el CENAMEP AIP ⁽¹⁾	2022-08-22	2022-08-29
Medición en el Laboratorio Nacional de Masas y Volumen (República Dominicana)	2022-09-02	2022-09-11
Medición en el CENAMEP AIP (cierre de mediciones)	2022-09-17	2022-09-19

⁽¹⁾ Se incluye una medición a los patrones viajeros previo al envío a República Dominicana, para disponer de información del estado de las masas antes de la salida al nivel internacional, y así no generar riesgo en el ejercicio de comparación. Esta medición no fue utilizada para el cálculo del valor de referencia.

Procedimientos utilizados

A continuación, se describen los procedimientos utilizados en la comparación en cinco laboratorios, ubicados en dos países.

Recepción: el CENAMEP AIP entregó los patrones viajeros a cada participante de acuerdo con el cronograma de medición indicado en la Tabla 3. Cada participante recibió y revisó los patrones viajeros, lo que fue registrado acorde con lo establecido en el protocolo de medición. No se registraron incidentes remarcables sobre los patrones viajeros que pudieran afectar los valores de referencia durante el ejercicio de comparación.

Medición: cada laboratorio participante determinó la masa convencional de los patrones viajeros utilizando sus propias instalaciones y procedimientos de medición. Se solicitó en el protocolo de medición que los participantes hicieran el cálculo de empuje del aire y que para ello utilizaran la densidad indicada en la Tabla 2, para cada masa en estudio. La limpieza de las masas se hizo solamente con pincel o con paño seco.

Valor de referencia: los valores de masa fueron medidos por el CENAMEP AIP antes del inicio de la comparación y al final de ésta, con el objetivo de verificar su estabilidad durante el ejercicio y así determinar un valor de referencia. No se observaron desvíos apreciables (en relación con la incertidumbre de los valores de referencia declarados para

cada masa), que requiriesen aplicar corrección por deriva de los patrones viajeros. En este sentido, el valor de referencia fue calculado utilizando el promedio de ambas mediciones:

$$m_{ref} = \frac{(m_1 + m_2)}{2} \quad (1)$$

Donde:

m_1 y m_2 son las mediciones iniciales y finales realizadas a cada patrón viajero.

Evaluación de desempeño: la evaluación de desempeño se realizó utilizando el error normalizado (E_n), el cual fue calculado de acuerdo con la ecuación (Efron y Tibshirani, 1993):

$$E_n = \frac{(m_A - m_{ref})}{\sqrt{(U_A^2 + U_{ref}^2 + U_d^2)}} \quad (2)$$

Donde:

m_A y U_A son el valor de masa convencional y la incertidumbre expandida declaradas por el participante.

m_{ref} y U_{ref} son el valor de referencia y la incertidumbre expandida asociada con el valor de referencia.

Por su parte, la incertidumbre U_d debido a la deriva de la masa se tomó en cuenta tal como se describe en la siguiente ecuación JCGM 100:2008 (Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG1), 2008):

$$U_d = k \sqrt{\left(\frac{m_2 - m_1}{2\sqrt{3}}\right)^2} \quad (3)$$

Donde:

k es el factor de cobertura = 2.

m_1 es el valor de referencia medido inicialmente.

m_2 es el valor de referencia medido al final del proceso.

Cabe indicar que se operó bajo el supuesto de que U_d tiene una distribución uniforme y que los valores iniciales y finales representan el valor máximo y mínimo de dicha distribución. Finalmente, el error normalizado fue utilizado como indicador de aptitud para cada laboratorio participante, utilizando los siguientes criterios:

Resultados satisfactorios: si $-1 \leq E_n \leq 1$.

Resultados no satisfactorios: si $-1 > E_n > 1$.

RESULTADOS

Resultados de las comparaciones

Cada laboratorio participante en este estudio calculó la masa convencional de los patrones viajeros y los reportó con su respectiva incertidumbre, de acuerdo con sus propios procedimientos de medición, el plan de medición y el cronograma establecido en el protocolo de la comparación.

En las Tablas 4 a la 10 se muestran los desvíos de masa convencional de los patrones viajeros respecto de sus valores nominales. Estas tablas fueron calculadas a partir del valor de masa convencional reportada por cada uno de los laboratorios participantes. En las columnas tituladas como “Valor de referencia” y “Valor del laboratorio” las fórmulas indicadas en la respectiva celda tienen el siguiente significado:

m_{PL} : valor convencional de masa reportado por el laboratorio piloto.

m_n : valor nominal del patrón viajero.

m_i : valor de masa convencional reportado por el laboratorio participante.

TABLA 4. Resultados de la comparación en la masa de 200 mg.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	U (k = 2) (mg)
REF1		-0.092	0.020
C	-0.091	-0.095	0.010
K	-0.091	-0.093	0.008
M	-0.091	-0.095	0.003
REF2		-0.091	0.020

TABLA 5. Resultados de la comparación en la masa de 1 g.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	U (k = 2) (mg)
REF1		-0.785	0.030
C	-0.784	-0.790	0.016
K	-0.784	-0.786	0.010
M	-0.784	-0.790	0.004
REF2		-0.784	0.030

TABLA 6. Resultados de la comparación en la masa de 50 g.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	U (k = 2) (mg)
REF1		-2.611	0.10
C	-2.611	-2.638	0.05
K	-2.611	-2.619	0.03
M	-2.611	-2.600	0.01
REF2		-2.610	0.10

TABLA 7. Resultados de la comparación en la masa de 200 g.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	U (k = 2) (mg)
REF1		-3.503	0.30
C	-3.506	-3.787	0.18
K	-3.506	-3.233	0.38
M	-3.506	-3.500	0.06
REF2		-3.509	0.30

TABLA 8. Resultados de la comparación en la masa de 1 kg.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	U (k = 2) (mg)
REF1		-8.663	1.60
C	-8.512	-9.500	0.82
K	-8.512	-8.157	0.97
M	-8.512	-8.500	0.33
REF2		-8.361	1.60

TABLA 9. Resultados de la comparación en la masa de 2 kg.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	$U (k = 2)$ (mg)
REF1		-14.853	3.00
C	-14.761	-15.700	1.62
K	-14.761	-14.816	1.49
M	-14.761	-14.000	0.39
REF2		-14.670	3.00

TABLA 10. Resultados de la comparación en la masa de 20 kg.

Código del laboratorio	Valor de referencia	Valor del laboratorio	Incertidumbre del laboratorio
	$m_{PL} - m_n$ (mg)	$m_i - m_n$ (mg)	$U (k = 2)$ (mg)
REF1		218	300
F	242.608	320	262
I	242.608	262	100
O	242.608	255	19
REF2		267	300

Los valores indicados como REF1 y REF2 son los valores reportados respectivamente por el laboratorio piloto en la medición inicial y final de la comparación. Como se puede observar, las diferencias entre REF1 y REF2 son menores a las incertidumbres del valor de referencia reportado y confirman la estabilidad requerida de las masas.

Por otro lado, las Figuras 1 a la 7 se construyeron en este estudio para observar la relación existente entre los valores reportados con sus incertidumbres (identificados mediante letras) y los valores de referencia (identificados con los caracteres "REF"), en cada una de las comparaciones de los laboratorios participantes.

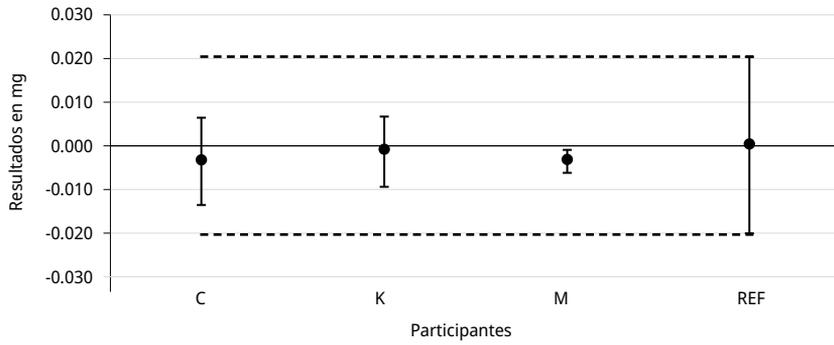


FIGURA 1. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 200 mg.

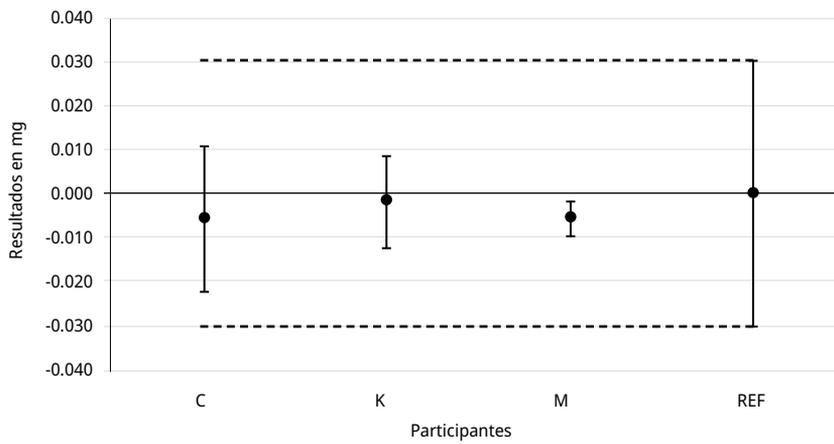


FIGURA 2. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 1 g.

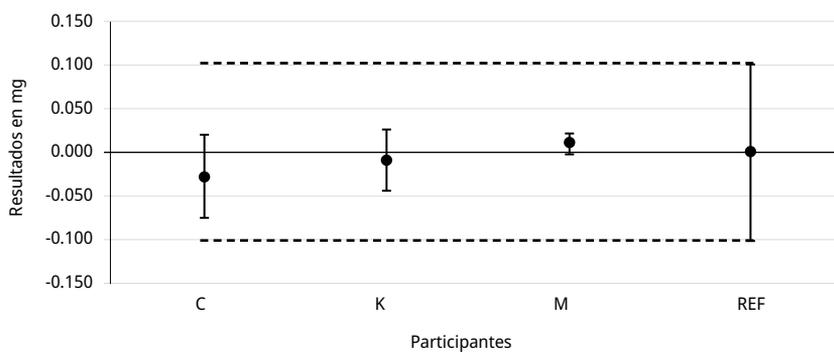


FIGURA 3. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 50 g.

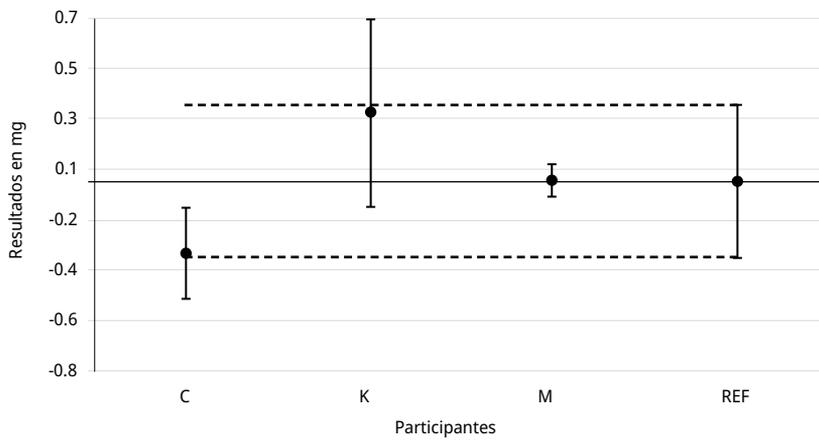


FIGURA 4. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 200 g.

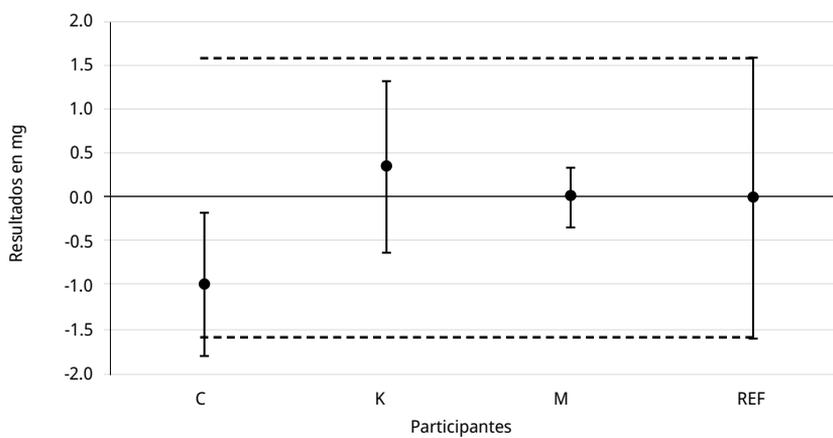


FIGURA 5. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 1 kg.

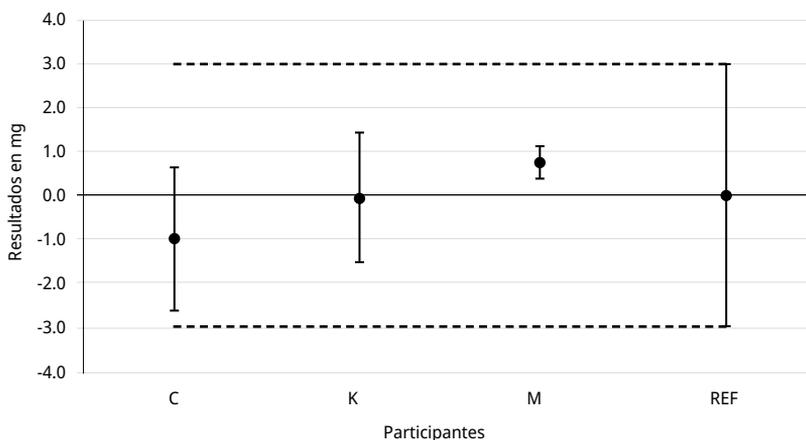


FIGURA 6. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 2 kg.

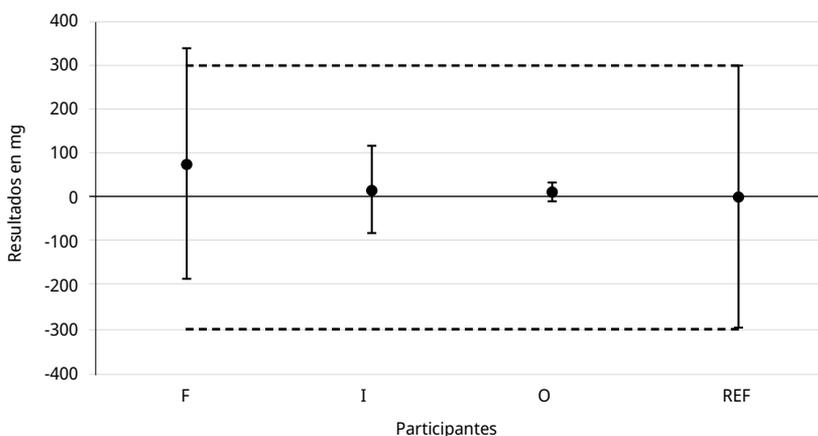


FIGURA 7. Diferencias entre el valor de referencia y los laboratorios participantes para la masa de 20 kg.

DISCUSIÓN

En las Figuras 1 a la 7 es posible observar que todos los resultados reportados por los participantes caen dentro del área delimitada por las líneas discontinuas de los valores de referencia. Esto implica que en esta comparación interlaboratorios realizada en los dos países se observa consistencia entre todos los valores reportados por los participantes y los valores registrados por el laboratorio piloto.

De manera complementaria, como herramienta para analizar el desempeño o la aptitud de los participantes se estableció en el protocolo el uso del error normalizado (E_n). En este sentido, en las Tablas 11 y 12 se presenta el E_n calculado para cada valor nominal, por cada participante.

TABLA 11. Desempeño de los laboratorios participantes en los valores nominales de 200 mg a 2 kg.

Valor nominal	Error normalizado (E_n)		
	C	K	M
200 mg	-0.16	-0.07	-0.17
1 g	-0.16	-0.05	-0.18
50 g	-0.25	-0.08	0.10
200 g	-0.80	0.57	0.02
1 kg	-0.55	0.19	0.01
2 kg	-0.28	-0.02	0.25

TABLA 12. Desempeño de los laboratorios participantes en los valores nominales de 20 kg.

Valor nominal	Error normalizado (E_n)		
	F	I	O
20 kg	0.19	0.06	0.04

En la Tabla 11 se muestra que los participantes, indicados con las letras C, K y M, presentan un E_n entre -1 y 1, lo que es indicativo de consistencia con los valores de referencia para los valores nominales de 200 mg a 2 kg. De igual forma, en la Tabla 12 se muestra que los participantes, indicados con las letras F, I y O presentan un E_n entre -1 y 1, lo que es indicativo nuevamente de la consistencia con el valor de referencia en 20 kg. Ambos métodos, el método gráfico y el E_n , son consistentes entre sí y dan muestras de la aptitud de los laboratorios participantes en los valores reportados en esta intercomparación realizada en Panamá y República Dominicana.

CONCLUSIONES

Debido a que los participantes tuvieron un $E_n < 1$ (menores a 0.8 en la mayoría de los casos), no fue necesario establecer acciones correctivas de parte de los participantes para la mejora de los procesos de calibración de patrones de masas en sus respectivos laboratorios.

Los resultados de esta comparación se fundamentan en el cálculo de los valores de referencia y sus incertidumbres asociadas. Actualmente, el CENAMEP AIP tiene reconocimiento internacional de sus capacidades de calibración de masas en el rango de 1 mg a 2 kg, para incertidumbres de calibración de masas F1. Este reconocimiento internacional le da mucha confianza al ejercicio de comparación en el rango indicado. Contar con este reconocimiento internacional para calibraciones de masas de valor

nominal iguales o mayores de 20 kg fortalecería la gestión del CENAMEP AIP en este tipo de ejercicios.

Por otro lado, también se desprende de este ejercicio la necesidad de mejorar las incertidumbres de calibración de masa en el rango de 1 mg a 20 kg, ya que en la comparación se pudo observar que las incertidumbres de medición reportadas por los participantes eran menores a las reportadas por el laboratorio de referencia. Si estos laboratorios participantes quisiesen evaluar su capacidad de medición al nivel de las incertidumbres reportadas, con las incertidumbres reconocidas del laboratorio de referencia, actualmente no se podría hacer. Esto abre opciones importantes para colaboración y trabajo a futuro.

Con el desarrollo de este tipo de estudios colaborativos, el CENAMEP AIP apunta permanentemente al fortalecimiento de sus programas de comparaciones interlaboratorios, y así lograr cumplir con los requisitos solicitados por la Norma Internacional ISO/IEC 17043 (International Organization for Standardization, 2023). En el desarrollo de estos estudios, sin duda, el centro se consolidará como un proveedor de ensayos de aptitud confiable y reconocido por los organismos de acreditación y otras partes interesadas, tanto del país como de la región.

Finalmente, con los resultados obtenidos en esta comparación interlaboratorio, todos los laboratorios participantes, en su rol de proveedores de trazabilidad, se ven fortalecidos al contar con evidencia de sus capacidades de calibración en masas, las cuales son utilizadas en un sinnúmero de servicios que impactan positivamente en toda la infraestructura de la calidad y, en general, en la sociedad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a sus respectivos laboratorios, autoridades y entidades en Panamá (CALINHOUSE S.A., CENAMEP AIP, PROMED y UTP) y en República Dominicana (INDOCAL), por facilitar los recursos de trabajo para la conducción de las comparaciones.

El Laboratorio Nacional de Masa y Volumen del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), agradece al personal del CENAMEP AIP, por el soporte técnico durante los procesos de la comparación interlaboratorio. Se agradece también, y de manera especial, el apoyo del INDOCAL, en las manos de Lorenzo Ramírez (director general), Rubén Neris (director de metrología) y los técnicos de laboratorio Natanael Bello y Jessel Gerardo.

Por su parte, el Laboratorio de Metrología de la Universidad Tecnológica de Panamá (UTP) desea agradecer a todas sus autoridades y al personal de administración por brindar el apoyo para formar parte de este ensayo, que resalta la importancia de las intercomparaciones para garantizar la confiabilidad de las mediciones obtenidas en nuestras instalaciones a nivel nacional y regional.

Se agradece también al Dr. Jaime Estrella E. (ORCID 0000-0002-8020-2184), de la Coordinación de I+D+i del CENAMEP AIP, por realizar la asesoría para la concepción y diseño de este artículo científico y por sus aportes de edición a todo el manuscrito inicial.

REFERENCIAS

- Efron, B. y Tibshirani, R., 1993. *An introduction to the bootstrap*. Londres: Chapman & Hall/CRC.
- Gonçalves, J., Göthner K. y Rovira, S., eds., 2014. *Midiendo el impacto de la infraestructura de la calidad en América Latina: experiencias, alcances y limitaciones*. [En línea]. Santiago de Chile: CEPAL, GIZ y PTB. 192 p. [Consulta: 15 de mayo de 2023]. Disponible en: https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/36634/S2014154_es.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- International Organization of Legal Metrology (OIML), 2004. *International Recommendation OIML R 111-1. Weights of classes E_1 , E_2 , F_1 , F_2 , M_1 , M_{1-2} , M_2 , M_{2-3} and M_3 . Part 1: Metrological and technical requirements* [En línea]. Ed 2004 (E). Paris: OIML. [Consulta: 15 de mayo de 2023]. Disponible en: https://www.oiml.org/en/files/pdf_r/r111-1-e04.pdf.
- International Organization for Standardization, 2023. *ISO/IEC 17043: Conformity assessment — General requirements for the competence of proficiency testing providers*. Ginebra: ISO.
- Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG1), 2008. *JCGM 100:2008. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement*. Sèvres Cedex: JCGM. 134 p.
- Panamá. Ley No. 52, de 11 de diciembre de 2007. Que regula las actividades metrológicas en la República de Panamá. *Gaceta Oficial Digital* [En línea], miércoles 19 de diciembre de 2007, No. 25943. [Consulta: 15 de mayo de 2023]. Disponible en: <https://www.gacetaoficial.gob.pa/pdfTemp/25943/8093.pdf>.