



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, QUÍMICAS Y NATURALES

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO (CIDeT)

Director: Dr. Rogelio S. Stampella

Revista de Ciencia Y Tecnología

CONSEJO DE DIRECCIÓN

Director: Ing. Qco. Héctor R. Russo

Área Bioquímica y Farmacia: Dr. Segio Andrés Tonon

Área Ingeniería y Tecnología: Ing. Qco. María D. Pettri Flores

Área Genética y Biología: Dr. Alberto Sergio Fenocchio

CONSEJO DE EDICIÓN

Área Genética y Biología:

Prof. Ing. Fernando Doulut. U.N.P.

Ing. Avelino Fernández. U.N.N.E.

Dr. Juan L. Santos. U. Comp. de Madrid

Dr. Carlos M. Abatte. PROIMI. S.M.T.

Dr. Marcelo Cabada. U.N.R.

Dr. Alfredo Recca. Sec. Rec. Nat. y D.S.

Dra. Stella Maris Alzamora. U.B.A.

Lic. Beatriz A. de Avanza. U.N.N.E.

Área Bioquímica y Farmacia:

Dra. Regina de Wikinski. U.B.A.

Dr. Ramón de Torres. U.B.A.

Dr. Eduardo Ercoli. U. N. de Cuyo

Ing. Federico Emiliani. INALI. S. Fe

Prof. Eloy L. López. U.B.A.

Dra. María M. Elías. U.N.R.

Área Ingeniería y Tecnología:

Dra. María A. Tessi. U.N.L.

Dr. Roberto Rossi. U.N.C.

Dr. Rodolfo H. Mascheroni. U.N.P.

Ing. Martín J. Urbicain. PLAPIQUI. U.N.S. CONICET

Ing. José F. Haddad. Fac. Engenharia. SANIPLAN. R. J. Brasil

Ing. Gloria del Carmen Plaza. U.N. Salta

Ing. Roberto Melos. U. de Concepción. Chile

Esta Revista es un servicio del CIDeT. Está prohibida su venta a terceros como también la reproducción total o parcial con fines comerciales. Los trabajos presentados han sido aceptados para su publicación por el Consejo de Dirección y el Consejo de Edición. La Revista no se hace responsable de las opiniones contenidas en los artículos, siendo de responsabilidad exclusiva de los autores de los mismos. La edición de la Revista cuenta con el apoyo económico de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales y la Fundación Fac.Cs.Ex.Qcas. y Naturales.

Toda correspondencia relacionada a la Revista, debe ser dirigida a: Sr. Director del CIDeT / Félix de Azara 1.552 / 3300 POSADAS. Misiones. Rep. Argentina / Teléfono/Fax: 54 - 752 - 25414 - E-mail: peiu-fceqyn@unam.edu.ar



EDITORIAL UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

San Martín 2212 - 1º Piso - C. P. 3300

Posadas - Misiones - Telefax (0752) 28601

Diseño: Sergio Manela

Armado de interiores y cubierta: Miguel Angel Barreto

Revisión de texto: Hedda Giraudo

Hecho el depósito de la Ley 11723

Impreso en Argentina

ISSN: 0329-8922

Revista de Ciencia y Tecnología

ÍNDICE

1

VOLUMEN I / Nº 1 / 1998

- 4 EDITORIAL
- 6 BIOQUÍMICA Y FARMACIA
Contaminación fúngica del Té. Cambios durante la elaboración controlada del té negro / Tonon, Sergio A.; Marucci, Raúl S.; Fontana, Jorge; Jerke, Gladis; Ferreras, Julián A.
- 14 Frecuencia de aislamiento de SALMONELLA y PSEUDOMONAS en canales de pollos refrigeradas procedentes de Misiones (Argentina) / Benassi, F.; von Specht, M.; García, M.; Pucciarelli, A.; Zubreski, E.
- 20 Control de la calidad higiénica de helados artesanales en Posadas, Misiones / von Specht, Martha; Amer, Lidia; Maubecin, Elsa; Alonso, Roxana; Bargardi, Severino.
- 25 INGENIERÍA y TECNOLOGÍA
Variación de la concentración de Ácido Ascórbico (VITAMINA C) en el procesamiento de la Yerba Mate / Ramallo, L. A.; Schmalko, M. E. y Känzig, R. G.
- 30 Evolución de la calidad de lixiviados de residuos sólidos domiciliarios - Fracción Orgánica - producidos en condiciones anaeróbicas / Pettri Flores, M. D.; Reta, M. R.; Acuña, M. G.; Barboza, O. M.; Russo, H. R.
- 40 El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la Yerba Mate / Escalada, M. A.; Schmalko, M. E.; Känzig, R.G.
- 45 GENÉTICA y BIOLOGÍA
Memoria molecular de CETOAMINAS PLASMÁTICAS y HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS para indagar el estado del metabolismo hidrocarbonado / Coppo, J. A.; Coppo, N. B.
- 53 Calendario polínico preliminar - Ciudad de Posadas (Argentina) / Paul, M. R.; Fernández, L. C. y Huk, L. H.
- 61 Aportes al conocimiento de la distribución geográfica de los ofidios en la Provincia de Misiones / Stetson, R. E.; Insaurralde, D.R.; Benítez, P.; Pividori, N.
- 66 INVESTIGACIONES EN CURSO

EDITORIAL

A más de 10 años de la Resolución de creación de la entonces Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Nordeste, en los albores de la década del '70, un lúcido Docente de la Casa, que se había iniciado en tareas de Investigación en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral y perfeccionado en Centros de Estudios de Japón y Alemania, ponía en marcha el primer proyecto de investigación científica de nuestra Casa de Estudios. Por suerte, y a pesar de las dificultades propias de la Institución Universitaria, la semilla plantada por el Ing. Alfredo González en el área de Celulosa y Papel no sólo germinó, sino que creció, fructificó y se reprodujo adecuadamente. En efecto, y como resultado, también, de la capacitación de algunos docentes en Centros de Estudios de Alta Complejidad, del país y del extranjero, se inician en la década del '70 proyectos de investigación en las áreas de alimentos, de microbiología y de medio ambiente.

La investigación científica, que es impulsada en la Universidad por ser herramienta idónea de la formación de recursos humanos para docencia, nació en nuestra Facultad estrechamente vinculada al sistema productivo provincial y regional, cumpliendo así la Universidad, el compromiso social con el desarrollo y mejoramiento de la calidad de vida de la comunidad en la que se halla inmersa. Esto se comprueba fácilmente analizando los nombres de los primeros proyectos de investigación: en el Área de Celulosa y Papel: «Aprovechamiento integral de la madera del monte natural»; en Alimentos: «Estacionamiento acelerado de la Yerba Mate»; en Microbiología: «Fermentación acetobutílica del almidón de mandioca»; y en Medio Ambiente: «Calidad del agua -química y bromatológica- del río Paraná». Y el monte natural, la mandioca, el río y, sobre todo, la yerba mate, son parámetros definitorios de la arquitectura cultural y productiva de la Provincia de Misiones y del Nordeste Correntino.

La creación de la Carrera de Bioquímica produce cambios pronunciados en la estructura típicamente ingenieril de la Facultad e incorpora nuevas áreas de investigación. La incorporación de «Farmacia» y de la Escuela de Enfermería lleva a nuestra Casa de Estudios a comprometer su esfuerzo científico y técnico con la Salud de la comunidad regional, estableciéndose convenios con las autoridades nacionales y provinciales administradoras de la Salud y creando nuevos proyectos de investigación nacidos de la iniciativa y del compromiso de los propios docentes.

En esa etapa de nuestro crecimiento se decide crear el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico -CIDeT- como organismo asesor, orientador y administrador de la actividad de Ciencia y Técnica cuyo Consejo Directivo es elegido en forma directa por los docentes-investigadores.

La incorporación de las Carreras de Biología y de Genética terminan por definir el perfil de nuestra Casa de Estudios. La naturaleza típicamente académica y científica de estas carreras acentúa marcadamente el compromiso de la Facultad con la Investigación Científica, crece significativamente el número de proyectos de investigación y se amplía marcadamente el campo científico abarcado.

Por último el Programa de Incentivos a los docentes investigadores instituido por el Gobierno Nacional en 1993 logra movilizar toda la capacidad productiva de nuestros docentes e investigadores, siendo el resultado de los cuatro últimos años un número de trabajos de investigación terminados, oscilante entre 80 y 90.

A esta altura de nuestro crecimiento, el Consejo Directivo del CIDeT cree oportuno crear la Revista de Ciencia y Tecnología con el objetivo primordial de ofrecer la posibilidad de completar el ciclo productivo de la tarea científica y de desarrollo: publicar los resultados. Hoy, con inmensa satisfacción e inocultable orgullo, presentamos nuestro primer número. Como es fácil deducir, es el resultado del esfuerzo de muchas personas pero, muy particularmente, de los integrantes del Consejo de Dirección, que han puesto en esta tarea no sólo el tiempo robado a sus actividades particulares sino también el quitado al descanso bien merecido. Y, estoy seguro, lo seguirán haciendo con igual dedicación, tratando de mantener y, si es posible, mejorar la calidad de la revista y el nivel científico-técnico de los trabajos publicados.

La calidad técnica y científica de los trabajos a publicar es un compromiso que hemos asumido para con nuestra Institución, para con nuestros docentes e investigadores, para con los autores que quieren publicar en nuestra revista y, sobre todo, para con nuestros lectores. Y creemos que los parámetros de calidad deseados se garantizan plenamente con la formación de un Consejo de Edición integrado por docentes e investigadores de excelencia científica y probidad reconocidas. Con ese criterio hemos seleccionado a cada uno de ellos con el aditamento, para asegurar imparcialidad, de que son todos externos a nuestra Institución.

A cada uno de estos hombres y mujeres, integrantes del Consejo de Edición de la Revista de Ciencia y Tecnología, nuestro público y sincero agradecimiento por aceptar acompañarnos en el emprendimiento. Un agradecimiento extra para aquéllos a los que ya les hemos robado tiempo con la evaluación de estos primeros trabajos publicados hoy, y un pedido de disculpas si nuestra inexperiencia ha hecho engorrosa y más pesada aún la tarea encomendada. Y juntamente con el agradecimiento, el deseo que nos sigan acompañando por mucho tiempo más.

Por último queremos agradecer a los autores que decidieron publicar en este primer número, esperamos que la revista sea del agrado de los lectores, deseamos nos hagan llegar críticas y sugerencias que crean oportunas, e invitamos a todos nuestros colegas, de la región, del país y del exterior a que elijan nuestra Revista de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la UNaM para publicar los resultados de sus trabajos de investigación y desarrollo.

Hasta el próximo número.

•

Dr. ROGELIO SANTOS STAMPELLA
DIRECTOR CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO



CONTAMINACIÓN FÚNGICA DEL TÉ

CAMBIOS DURANTE LA ELABORACIÓN

CONTROLADA DEL TÉ NEGRO

Tonon, Sergio A. / Marucci, Raúl S. / Fontana, Jorge
Jerke, Gladis / Ferreras, Julián A.

Fungal contamination of Tea.
Changes during the controlled processing of black tea.

ABSTRACT

Standard analysis of black tea processed in the Province of Misiones, Argentina, evaluate its intrinsic characteristics -color, flavor, fragrance and stringency- acquiring a commercial classification in result of it. Biological or chemical contamination can alter the quality of the raw material. Fungal growth during processing and storage is one of the possibilities. The sub-tropical climate of the region and the mainly manual processing of tea favors it. Due to the broad variety of fungal genera able to contaminate plants and the absence of previous evaluation in the literature regarding black tea, we have analyzed the contaminant fungi present in regional tea, sowed and during processing in a pilot plant under controlled conditions of temperature and relative humidity. The total fungal count of green leaves showed an average value about 35×10^3 CFU/g. It continuously descended during processing, reaching a final value of 6×10^3 CFU/g during storage of black tea. The main contaminating genera were Cladosporium, Trichophyton, Aspergillus, Fusarium, Penicillium and Microsporum. Being Aspergillus, Fusarium and Penicillium, found in elevated percentages during storage.

KEYWORDS: Tea; contamination; processing; fungi; Misiones; Argentina.

RESUMEN

El té procesado y envasado en la Provincia de Misiones está sujeto a análisis organolépticos para la evaluación de características tales como color, sabor, aroma y astringencia, entre otros, conduciendo a su posterior clasificación comercial. Estas características deseables se ven alteradas generalmente por contaminación de la materia prima con diversas sustancias producidas por eventuales contaminaciones químicas o biológicas. Dentro de las alteraciones biológicas posibles, se encuentran aquellas causadas por hongos contaminantes que se desarrollan durante las diversas etapas del procesamiento del té. Este tipo de contaminación se ve favorecido por el clima sub-tropical y la práctica semi-artesanal de procesamiento empleada en la región. Dada la amplia variedad de géneros y especies fúngicos contaminantes de productos vegetales y la virtual ausencia de evaluaciones previas de este sustrato en la literatura, realizamos un relevamiento de la micoflora presente en té regional cosechado y procesado en microsecadero piloto bajo condiciones de temperatura y humedad relativa ambiente controladas. El recuento general indica una contaminación promedio de 35×10^3 UFC/

g en la materia prima, con un descenso continuo durante la elaboración hasta situarse en 6×10^3 UFC/g en el almacenamiento. La identificación de los principales géneros fúngicos contaminantes destaca la presencia de *Cladosporium*, *Trichophyton*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Microsporum*. Siendo los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los principales contaminantes presentes en el producto almacenado.

PALABRAS CLAVES: Té; contaminación; elaboración; hongos; Misiones; Argentina.

INTRODUCCIÓN

El 90 % de las 50 mil toneladas anuales de té que produce nuestro país se realiza en la Provincia de Misiones y el 10 % restante en la Provincia de Corrientes, siendo una de las actividades agrícolas de mayor relevancia económica en nuestra región. El 80 % del volumen de la producción anual, proveniente de 9.000 productores tealeros, se destina a la exportación; correspondiendo al 3,3 % del comercio mundial. De esta manera, nuestro país se posiciona en décimo lugar como productor y en el séptimo como exportador. El té elaborado se exporta a 20 países, entre los que se destacan: EE.UU. (60%), Chile (18%), Reino Unido (6%), Rusia (6%) y Holanda (3%) entre otros [1].

La *Camellia sinensis* (L) O. Kuntze es la especie más importante desde el punto de vista comercial; pertenece a la familia de las Theaceas que abarca aproximadamente 80 especies. Su principal área de distribución natural es la zona montañosa del Sudeste Asiático por sobre el paralelo de 30° Latitud Norte en una media luna que se extiende desde Japón a Nepal. En su estado natural puede alcanzar el tamaño de un arbusto, hasta un pequeño árbol de 6 a 8 m de altura [2].

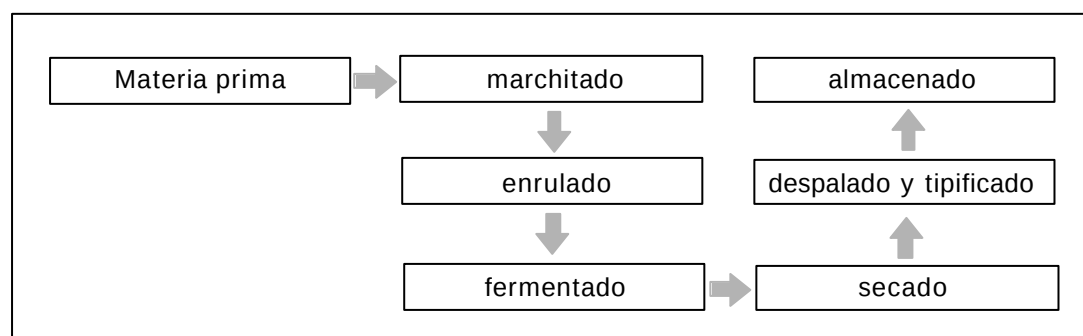
La mayoría de las plantaciones de té regionales son originarias de semillas de calidad desconocida. Como consecuencia de esto las plantaciones de té de Misiones son de variedades heterogéneas con aspectos físicos y botánicos muy diferentes entre sí: Asémicas (hoja ancha), China (hoja chica) y todos los híbridos intermedios [1; 2].

El sistema de elaboración del té negro consta de varias etapas en las que se combinan y suceden operaciones mecánicas y transformaciones fisicoquímicas; el contenido de agua se reduce y la materia seca sufre cambios en su composición [1].

Las características del licor, que se obtiene del producto final seco, son definidas en mayor medida por los componentes de la hoja, tales como polifenoles, sustancias pécticas, compuestos aromáticos y cafeína. Es así que la elaboración del té es entendida como un proceso simple, pero que debe efectuarse prestando particular atención a los numerosos factores que afectan al producto final [2].

Las distintas etapas del procesamiento incluyen los procesos de: 1) Marchitado, 2) Enrollado, 3) Fermentado, 4) Secado, 5) Despalado y Desfibrado, y 6) Tipificado.

ESQUEMA GENERAL DE ELABORACIÓN DE TÉ NEGRO



MARCHITADO

En este proceso, los brotes jóvenes del té que constituyen la materia prima, son marchitados por espacio de 12 a 16 horas, generalmente mediante circulación de aire forzado a temperatura ambiente en catres de madera, a efectos de acondicionarlos para la siguiente etapa [1].

ENRULADO

Durante esta etapa se inicia el proceso enzimático, por el cual los compuestos polifenólicos pertenecientes al grupo de las catequinas, son parcial o totalmente oxidados; originando teoflavinas amarillas o teorrubiginas rojas o marrones [1]. Para ello se hacen pasar las hojas marchitadas a través de un dispositivo de compresión rotativa. La función del mismo es romper las células vegetales para poner en contacto los jugos vegetales con las enzimas contenidas dentro de las mismas, permitiendo la oxidación de los compuestos responsables del buen aroma del té. Luego se procede al tamizado de la muestra a fin de disminuir la temperatura producida por fricción y facilitar la aireación de las células.

FERMENTADO

Luego del enrulado, el material disgregado y acondicionado, pasa a la fermentación, que consiste en una serie de oxidaciones y condensaciones que generará, en tiempos variables, un producto final de calidad relativa a la materia prima empleada. Junto con la fermentación se producen otros cambios, entre ellos el desarrollo de los compuestos aromáticos propios del té [1].

SECADO

En el momento adecuado, la fermentación se detiene completamente por medio de la remoción de la humedad durante la operación de secado. Además de los procesos de deshidratación e inactivación de la oxidación enzimática, algunas catequinas continúan sus cambios químicos. Además, los azúcares son caramelizados, con el resultado del típico aroma a caramelo del té seco. Por medio del secado, no sólo se detiene el proceso de fermentación, sino que se obtiene además un producto seco, fácil de manipular, apto para una conservación más o menos prolongada y listo para su

envasado y comercialización [1; 2].

La Estación Experimental Agropecuaria Cerro Azul del INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) ha implementado una planta piloto a escala, para el procesamiento del té, estableciéndose condiciones controlables a lo largo de todo el proceso, con el propósito de optimizar las diversas etapas con vista a la obtención de un producto de excelencia.

Las muestras de té elaboradas en esta planta provienen, generalmente, de cultivos experimentales propios de la Estación y en el marco del presente estudio, dada la ausencia de estudios detallados acerca de la micoflora contaminante de té y subproductos en la Provincia, se determinó la necesidad de conocer el tipo y cambios de la contaminación fúngica del sustrato durante las distintas etapas de su procesamiento.

Si bien existen descripciones técnicas precisas acerca de las operaciones involucradas en el procesamiento del té, por lo general el rango de humedad, temperatura e higiene empleados en el mismo varían ampliamente. Esta situación, conduce a la generación de condiciones favorables para la proliferación de diversos géneros de hongos contaminantes; los cuales mediante su crecimiento en el sustrato en distintas etapas de su procesamiento y posterior almacenamiento, pueden modificar mediante acción directa o indirecta su calidad bromatológica y comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El sustrato analizado provino de la plantación de té clonal de la Estación Experimental INTA Cerro Azul, Clon/semilla Policlonal 3-18, sembrada en Nazareno, INTA, Cerro Azul, cosechado de manera mecánica-manual.

Se analizaron 7 muestras en total, obtenidas aleatoriamente durante las diversas etapas de procesamiento en planta piloto, mediante sonda muestreadora cilíndrica: 1) muestra verde, 2-5) etapas de marchitado, enrulado, fermentado y secado, respectivamente, y 6-7) té negro elaborado y almacenado en latas, cosecha 91 y 93, tipificación BOP y BOPF, respectivamente (Tabla I).

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ANALÍTICAS

De cada muestra general se tomaron aleatoriamente y por duplicado, 50 g como muestras

TABLA I: Características generales de las muestras analizadas

MUESTRA	Peso Total	Humedad Relativa muestra	Tiempo de Proceso	Características de la Muestra
Muestra verde	2,430 Kg	80 %	—	Color verde Hojas en buen estado
Marchitado	1,880 Kg	77 %	120 min.	Color verde Hojas apenas marchitas
Enrulado	800 g	70 %	50 minutos	Color verde-cobrizo Aroma fuerte
Fermentado	810 g	65 %	45 minutos	Color cobrizo Aroma suave
Secado (a 98°C)	800 g	3 %	45 minutos	Color cobrizo-fuerte. Aroma a caramelo fuerte
BOP/ '91	500 g	5 %	5 años almacenado	Té negro elaborado cosecha 1991
BOPF/ '93	500 g	4 %	3 años almacenado	Té negro elaborado cosecha 1993

analíticas; se homogeneizaron en licuadora con cantidad suficiente de agua peptonada estéril, obteniéndose diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada muestra, adecuadas al posterior proceso de recuento e identificación fúngica. Luego de filtrar los homogenatos por gasa estéril, fueron mantenidos en tubos plásticos con tapa a rosca estériles, a 4°C hasta su siembra [3; 4; 8].

SIEMBRA DE LAS MUESTRAS

En el secadero piloto de la Estación Experimental se sembraron las diversas diluciones con espátula de Drigalski, por dispersión en superficie. Se utilizaron placas de petri de 100 mm. de diámetro conteniendo medio OGYE (Agar Glucosa Extracto de levadura con Oxitetraciclina) o DRBC (Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol). Una vez sembradas, rotuladas y secas, las placas se recubrieron con polietileno y se guardaron en heladera portátil a 4°C para ser transportadas hasta el laboratorio, en donde se incubaron en estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 a 14 días [4; 7; 8; 10].

RECuento DE CEPAS FÚNGICAS

Como técnica de recuento se empleó la técnica de dilución en placas; procediéndose a contar las colonias desarrolladas en las siembras a diversas diluciones y promediando los duplicados. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de

colonias/gramo de muestra analizada (UFC/g) [4-7].

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS CEPAS CONTAMINANTES

Una vez realizado el recuento fúngico general, se sembraron en placas de OGYE y DRBC homogenatos representativos de 5 gramos de cada muestra analítica; utilizando espátula de Drigalski e incubándose en estufa a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 7 a 14 días. Durante este tiempo se llevó a cabo el aislamiento de las cepas de crecimiento independiente, repicándolas a picos de flauta conteniendo PDA (Agar papa-dextrosa), Agar papa zanahoria y/o Agar jugo V8. La identificación a nivel de género de las cepas aisladas se realizó por observación de sus características macroscópicas generales y bajo lupa estereoscópica, además de sus características microscópicas mediante las técnicas de la cinta engomada y de microcultivo. Se utilizó diversa bibliografía descriptiva de los principales géneros fúngicos [7; 9; 11-14].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECuento GENERAL DE LA MICOFLORA CONTAMINANTE

La materia prima, hojas y palos de té verde, presenta un grado importante de contaminación

fúngica inicial con 35×10^3 UFC/g en promedio. Se observó un descenso de la misma luego del marchitado a 20×10^3 UFC/g en promedio, alcanzando sus valores más bajos luego del secado, 6×10^3 UFC/g. Las muestras provenientes de lotes almacenados presentaron un grado de contaminación similar a la procesada en el secadero piloto, entre 6 y 8×10^3 UFC/g. Los datos generales del recuento se presentan en la tabla II.

El relevamiento de la flora fúngica contaminante del té regional, nos permite evaluar la calidad microbiológica inicial del sustrato y su susceptibilidad al ataque fúngico durante su procesa-

miento y posterior almacenamiento. Debido a la inexistencia de datos bibliográficos sobre esta temática, los resultados obtenidos clarifican puntos previamente estimados por comparación a otros productos similares.

Así observamos que debido al tipo de cosecha preferentemente manual y contacto directo con el suelo regional, la materia prima posee niveles apreciables de contaminación fúngica inicial. Sin embargo, ésta decrece rápidamente durante las diferentes etapas involucradas en el proceso de elaboración, manteniéndose en niveles bajos durante el almacenamiento.

TABLA II: Recuento de la micoflora total contaminante del té durante su procesamiento en planta piloto y almacenamiento ($\times 10^3$ UFC/g)

Etapas	Medio DRBC	Medio OGYE	Promedio
Muestra Verde	30 ; 33 ; 35 ; 29	38 ; 41 ; 37 ; 35	35
Marchitado	28 ; 30 ; 31 ; 33	37 ; 34 ; 29 ; 32	32
Enrulado	22 ; 24 ; 22 ; 20	26 ; 24 ; 23 ; 24	23
Fermentado	15 ; 16 ; 13 ; 16	18 ; 16 ; 15 ; 18	16
Secado	6 ; 4 ; 4 ; 5	8 ; 6 ; 7 ; 7	6
Almacenado'91	8 ; 7 ; 5 ; 8	9 ; 10 ; 12 ; 7	8
Almacenado'93	7 ; 5 ; 5 ; 6	6 ; 4 ; 7 ; 9	6

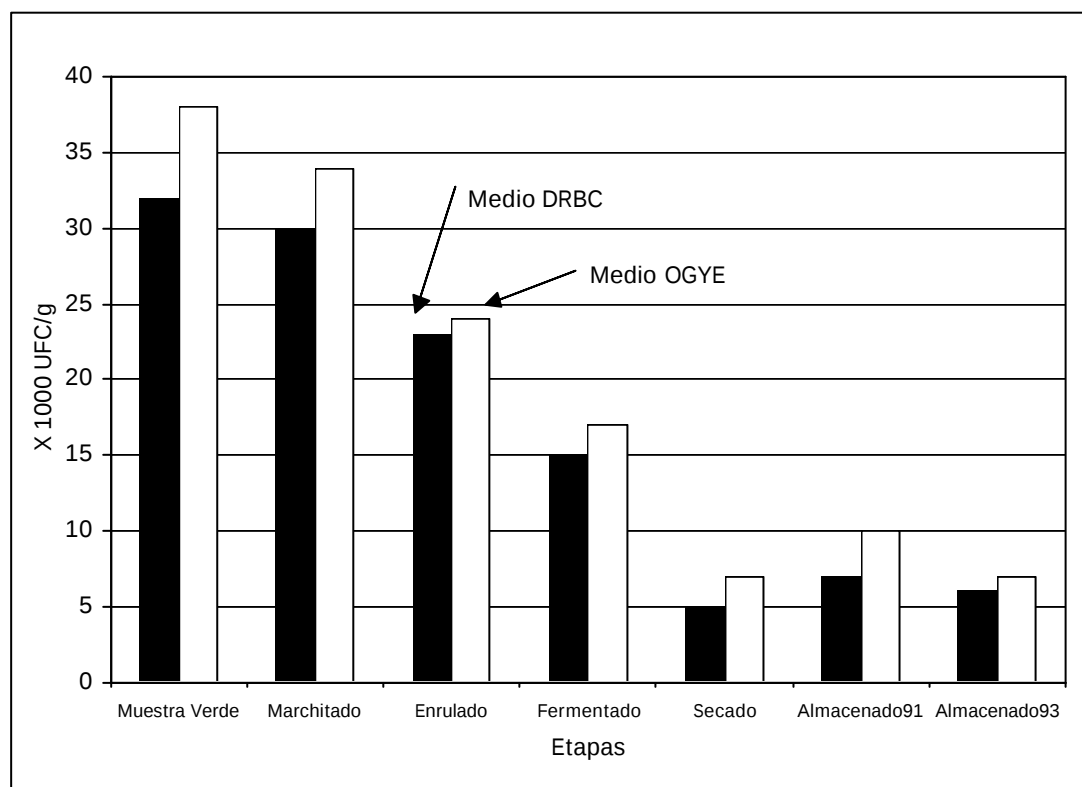


GRÁFICO I: Evolución de la contaminación fúngica durante el procesamiento piloto y almacenamiento de té regional

La naturaleza de los procesos involucrados en la elaboración del té -tratamientos térmicos elevados y macerados- afectan directamente el grado de contaminación fúngica presente en cada una de las distintas etapas. Se establecen dos mesetas en el descenso de la contaminación; el inóculo inicial de $30\text{-}35 \times 10^3$ UFC/g se reduce a 20×10^3 UFC/g luego del proceso de enrulado, posiblemente por el calor generado por fricción mecánica, para finalmente llegar a valores de 6×10^3 UFC/g luego del secado en horno con aire caliente forzado. El análisis de las muestras almacenadas demuestra que el bajo contenido de humedad relativa y por consiguiente el bajo a_w del té negro seco, contribuye como barrera físico-química a la colonización y contaminación fúngica, detectándose niveles similares a los de la muestra recientemente procesada y secada ($6\text{-}8 \times 10^3$ UFC/g).

IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS CONTAMINANTES

La identificación a nivel de género de la flora fúngica contaminante presente en el procesamiento piloto del té y su almacenamiento, se detalla en la Tabla III.

Se observó una alta incidencia de hongos de los géneros *Cladosporium* (18-38%) y *Trichophyton*, (15-22%) en las muestras tomadas durante el procesamiento; siguiendo en importancia los géneros *Aspergillus* (10-21%), *Fusarium* (9-18%), *Penicillium* (6-11%) y *Microsporum* (4-8%).

En las muestras almacenadas, la distribución relativa de géneros fue diferente, teniendo preponderancia los *Aspergillus* (31-37%), *Fusarium* (15-24%) y *Penicillium* (17-18%) sobre el género *Cladosporium* (9-11%).

Los principales géneros fúngicos contaminantes representan una muestra típica de los presentes en el suelo regional, con predominio de Deuteromicetes. El inóculo inicial presente en la hoja verde muestra una limitada variedad de géneros, destacándose *Cladosporium* (31%), *Trichophyton* (15%), *Aspergillus* (14%) y *Fusarium* (12%).

La evolución de cada uno de estos géneros durante el procesamiento muestra un comportamiento diferencial; mientras el género predominante *Cladosporium* disminuye del 37% en muestra verde al 18% en el secado, los demás mantienen o incluso aumentan su porcentaje relativo. Esto podría relacionarse con una menor resistencia térmica del género mencionado frente a los demás contaminantes presentes (Gráfico II).

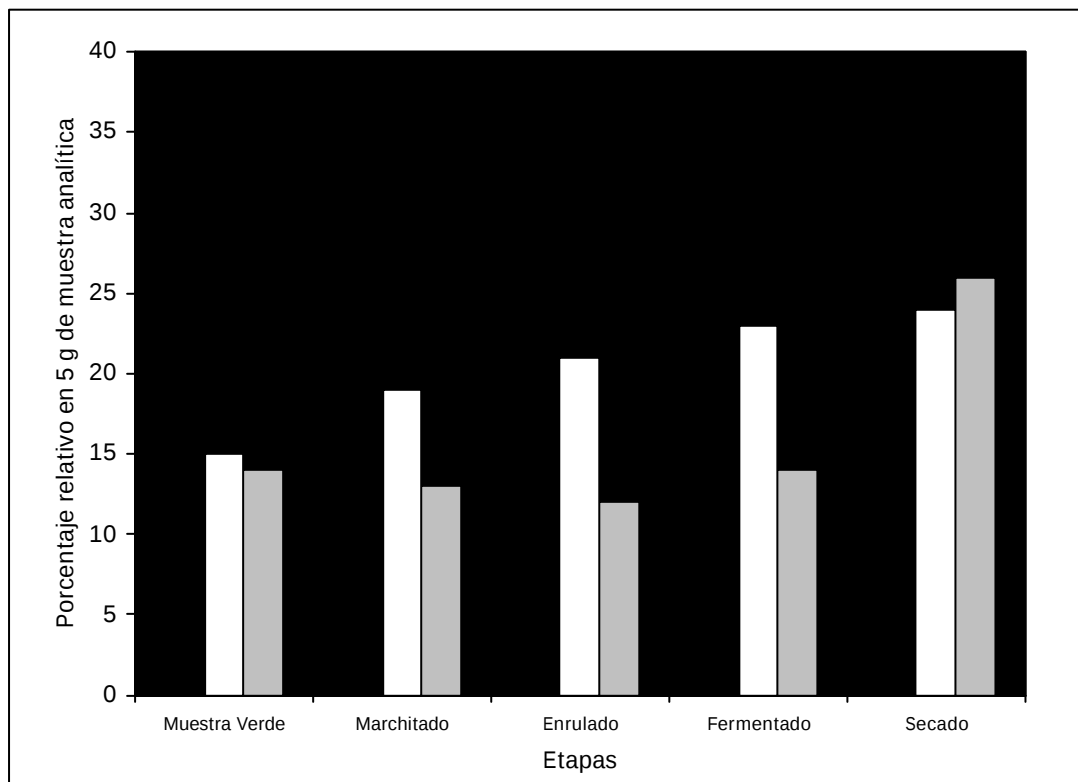


GRÁFICO II: Evolución de los principales géneros fúngicos durante el procesamiento piloto de té regional

Tabla III: Recuento e identificación de los principales géneros fúngicos contaminantes de las distintas etapas del procesamiento piloto y el almacenamiento del té

Géneros	Muestra Verde	Marchitado	Enrulado	Fermentado	Secado	Almacenado 91	Almacenado 93
Cladosporium	50 ^a (30,7%) ^b	45 (37,8%)	22 (24,7%)	14 (26%)	7 (18,4%)	6 (11%)	5 (9,2%)
Trichophyton	25 (15%)	23 (19,3%)	19 (21,3%)	12 (22%)	7 (18,4%)	4 (6,9%)	1 (1,8%)
Aspergillus	23 (14%)	15 (12,6%)	10 (11,4%)	7 (13%)	8 (21%)	18 (31%)	20 (37%)
Penicillium	10 (6%)	8 (6,9%)	5 (5,6%)	5 (9,3%)	4 (10,5%)	10 (18%)	9 (17%)
Fusarium	20 (12,3%)	10 (8,4%)	10 (11,4%)	9 (16,7%)	7 (18,4%)	9 (15%)	13 (24%)
Microsporium	8 (5%)	5 (4,2%)	5 (5,6%)	3 (5,5%)	3 (7,8%)	1 (1,7%)	1 (1,8%)
Curvularia	5 (3,3%)	3 (2,5%)	2 (2,2%)	1 (2%)	0	2 (3%)	0
Gliocladium	3 (0,5%)	1 (0,8%)	1 (1,1%)	0	0	1 (1,7%)	0
Pseudoallescheria	3 (1,8%)	1 (0,8%)	0	0	0	2 (3%)	0
Levaduras	8 (5%)	1 (0,8%)	0	1 (2%)	0	3 (4%)	2 (3,7%)
Sin identificar	3 (1,8%)	3 (2,5%)	6 (6,7%)	0	0	1 (1,7%)	1 (1,8%)
Otros	5 (3,3%)	4 (3,4%)	9 (10%)	1 (2%)	2 (5,5%)	1 (1,7%)	2 (3,7%)
TOTAL	163	119	89	54	38	58	54

Otros: Rhizopus, Alternaria, Trichoderma, Trichotecium, Botritis, Aerobasidium, Scopulariopsis, Epidermophyton.

(a) Número de cepas independientes aisladas, (b) Porcentaje relativo en las muestras de dicha etapa.

En las muestras almacenadas, se observa una preponderancia de los géneros denominados “de almacén” *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. La presencia relativa de estos contaminantes va tomando paulatina importancia a medida que la

materia prima va siendo procesada y por consiguiente perdiendo humedad relativa, hasta alcanzar porcentajes importantes (34-17%) en el producto almacenado (Gráfico III).

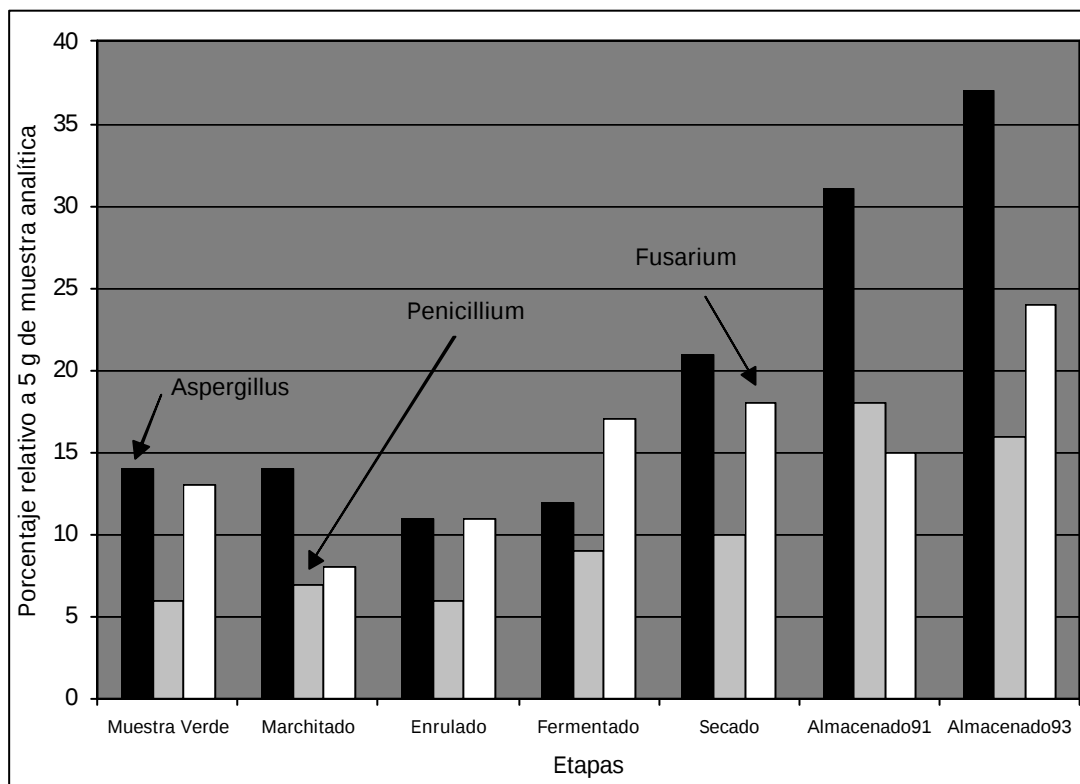


GRÁFICO III: Evolución de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* durante el procesamiento piloto y almacenamiento de té regional

La presencia de esporas de estos hongos en el té almacenado puede representar un problema desde el punto de vista bromatológico. La mayoría de las especies pertenecientes a los mencionados géneros tienen la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios tóxicos, denominados micotoxinas [15]. Las mismas representan un riesgo potencial a la salud humana y animal, por lo que diferentes países han implementado programas de control de micotoxinas en diferentes alimentos, preferentemente cereales y oleaginosas. Diversos estudios en nuestro laboratorio continúan analizando las especies contaminantes aisladas y su potencialidad micotoxigénica; teniendo en cuenta que la mayoría de las micotoxinas son termo-resistentes, pudiendo resistir los procesos de elaboración y encontrarse presentes de manera inalterada en el producto final.

Dada la amplia variedad de esquemas de procesamiento del té empleados en nuestra región, estamos, además, realizando un estudio micológico comparativo entre establecimientos productores y el microsecadero piloto, para poder generar un esquema regional de la contaminación fúngica de este producto.

TONON, Sergio A.; MARUCCI, Raúl S.; JERKE, Gladis; FERRERAS, Julián A. / Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDEt), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

FONTANA, Jorge / Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental INTA Cerro Azul.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con aportes del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDEt) de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

REFERENCIAS

1. PRAT KRICUN, S.D., PICCOLO, G.A., y RIVERA FLORES, S.E. Té, cultivo y elaboración. Catálogo tecnológico. Miscelánea N° 6, INTA Cerro Azul. p. 1-43. 1988.
2. PRAT KRICUN, S.D. Descripciones y características del cultivo de té, en Primer curso de capacitación en producción de té. INTA, Cerro Azul, Pcia. de Misiones. 1994.

3. SAMSON, R. y REEMEN-HOEKSTRA V. Introduction to Food-Borne Fungi. Institute of the Royal Netherlands. 1988.
4. PITT, J., et al. Recommended methods for mycological examination of foods. 1992, en Modern methods in food mycology, R. Samson, et al., Editor. Elsevier: Amsterdam-London-New York-Tokyo. p. 365-368. 1992.
5. CÁTEDRA DE MICROBIOLOGÍA. Guías Prácticas del Curso de Micología de Alimentos. Córdoba. Editorial Universitaria de Córdoba. 1994.
6. VAAMONDE, G. y CABRAL, D. Micología de Alimentos. Universidad de Buenos Aires: Buenos Aires. 1995.
7. KING, A.D.J., et al. Methods for the Mycological Examination of Food. Plenum Press, Editor. Plenum Press & NATO Scientific Affairs Division: New York and London. 1986.
8. KING, A.D.J.; HOCKING, A.D. y PITT, J.I. A novel selective medium for the enumeration of yeasts and moulds associated with food spoilage. J. Appl. Environ. Microbiol. 37: p. 959-964. 1979.
9. BETTUCCI, L. y ROQUEBERT, M.F. Curso sobre biología e identificación de hongos contaminantes de Alimentos. Micotoxinas. Universidad de la República. Facultad de Ciencias. PEDECIBA. Montevideo, Uruguay. 1995.
10. KING, A.D.J.; HOCKING, A.D. y PITT, J.I. Dichloran-Rose Bengal Medium for enumeration and isolation of molds from foods. J. Appl. Environ. Microbiol. 37(5): p. 959-964. 1979.
11. KONEMAN, E.W. y ROBERTS, G.D. Prácticas de Laboratorio. 3º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 1987.
12. PIONTELLI, E.L. Bases y conceptos para la clasificación de los hongos de importancia Médico-Veterinaria, en Curso: Criterios taxonómicos básicos para las disciplinas microbiológicas. 1995. Posadas, Misiones: UNaM.
13. ALEXOPOULOS, C.J. Introducción a la Micología. 3º ed., Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires. 1979.
14. WEBSTER, J. Introduction to Fungi. 2º ed., C.U. Press. Vol. 1. Londres, Inglaterra. 1991.
15. TONON, S. A. y MARUCCI, R. S. Flora fúngica contaminante de Yerba Mate estacionada. Presencia de hongos productores de aflatoxinas. La Alimentación Latinoamericana, 206 p. 23-32. 1994.



FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE *SALMONELLAS* Y *PSEUDOMONAS* EN CANALES DE POLLOS REFRIGERADAS PROCEDENTES DE MISIONES (ARG.)

Benassi, F. / von Specht, M. / García, M. / Pucciarelli, A. / Zubreski, E.

ISOLATION FREQUENCY OF *SALMONELLA* AND *PSEUDOMONAS* IN REFRIGERATED RAW CHICKEN CARCASSES FROM MISIONES (ARGENTINA)

ABSTRACT

The research was focused on the occurrence of psychrotrophic microorganisms, *Salmonella* and *Pseudomonas* in raw chicken carcasses from a poultry processing plant of Misiones, Argentina.

Microorganisms were removed from carcasses by the rinse method. Plate counts of psychrotrophic microorganisms were performed by plating Plate Count Agar (total microorganisms), Calcium Caseinate and Milk Agar (proteolytic psychrotrophic), Butter Agar and Triolein Agar (lipolytic psychrotrophic). *Pseudomonas spp.* were recovered from plates of Cetrimide Agar.

Elevated temperature technique for the isolation of *Salmonella spp.* was applied. The methodology consisted in applying an enrichment procedure by using Selenite-Cystine and Rappaport-Vassiliadis Broth. *Salmonella* organisms were recovered by streaking plates of Bismuth Sulphite Agar (BS), Xylose Lysine Deoxicholate Agar (XLD), and Eosin Methylene Blue Agar (EMB).

Out of 52 refrigerated carcasses (-2°C), *Salmonella spp.* were isolated from 12,5% of the samples [*Salmonella* Enteritidis (82%), *Salmonella* Hadar (18 %)]. Best isolation frequency of *Salmonella spp.* was obtained when the combination of RV Broth and XLD Agar was used. Also, *Pseudomonas fluorescens* (70,7 %) and *Pseudomonas putida* (19,5 %) were identified.

Average plate count of total psychrotrophic microorganisms was $1,7 \times 10^6$ UFC/ml, proteolytic psychrotrophic prevailed among the studied samples.

These results show an important raw chicken carcasses contamination, therefore measures should be taken in order to correct this situation.

RESUMEN

KEY WORDS: Chicken carcasses. *Salmonella*. *Pseudomonas*. Psychrotrophic microorganisms.

Se investigó la presencia de microorganismos psicrotrofos, *Pseudomonas* y *Salmonella* en canales de pollos refrigeradas, provenientes de una planta faenadora de la provincia de Misiones.

La toma de muestras se realizó por el método del lavado de cada canal. Se efectuaron recuentos de microorganismos Psicrotrofos Totales (Plate Count Agar - PCA), Psicrotrofos Proteolíticos (Agar Leche y Agar Caseinato de Calcio), Psicrotrofos Lipolíticos (Agar Manteca y Agar Trioleína) y aislamiento y tipificación de microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* (Agar Cetrímide) y *Salmonella* en caldos: Selenito-Cistina (SC) y Rappaport-Vassiliadis (RV) y placas de: Agar Bismuto - Sulfito (BS), Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), Agar Eosina Azul de metileno (EMB).

Sobre un total de 52 canales evisceradas refrigeradas (-2°C), se aisló *Salmonella* en el 12,5% de las mismas [*S. Enteritidis* (82%), *S. Hadar* (18 %)]. La mejor combinación de medios resultó: Caldo RV / Agar XLD. Las especies del género *Pseudomonas* identificadas fueron *P. fluorescens* (70,7 %) y *P. putida* (19,5 %). El promedio de los recuentos psicrotrofos totales fue de $1,7 \times 10^6$ UFC/ml, con predominio de flora proteolítica.

Los resultados demuestran una importante contaminación de las canales, lo que hace necesario aplicar medidas correctivas para optimizar la calidad del producto refrigerado.

PALABRAS CLAVES: Canales de pollos. *Salmonella*. *Pseudomonas*. Microorganismos alterantes.

INTRODUCCIÓN

La industria aviar constituye una importante actividad económica en el país. En nuestro medio se considera de gran interés la actividad avícola y en los últimos años se ha verificado un aumento sostenido del consumo de carne de pollo.

Las bacterias alterativas psicrótrofas, entran a la planta procesadora en las patas y en las plumas de las aves, y en menor número en el suministro de agua y de hielo. Posteriormente se multiplican sobre las superficies sucias del equipo, en los tanques de agua helada y sobre la superficie de las aves. Los microorganismos psicrótrofos, juegan un rol significativo en procesos de deterioro a bajas temperaturas. Su presencia en alto número puede causar diversos tipos de alteraciones en las canales evisceradas refrigeradas, que se manifiesta por malos olores, seguidos por la formación de limo y diversos cambios en la coloración de las carcasas, durante el período de almacenamiento, y a la vez indica un manejo sanitario deficiente [1, 2].

A medida que las bacterias se multiplican, el pH se eleva y aumenta la cantidad de amoníaco y compuestos afines, aunque estos cambios no son marcados hasta que el nivel de bacterias psicrótrofas no sobrepasa 10^8 UFC/ml [2, 3].

Uno de los principales factores que influyen en el crecimiento bacteriano de canales refrigeradas, es la carga inicial de microorganismos psicrótrofos alterativos. Si ésta es elevada, el tiempo de latencia se acortará, y por tanto la vida útil será menor [2, 4].

La mayor parte de los autores [1-5], coinciden en que el principal agente causal de deterioro a bajas temperaturas es el género *Pseudomonas*. Según la ICMSF [2], también intervienen especies de los géneros *Alteromonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella*.

El género *Salmonella* comprende especies patógenas que ocasionan enfermedades entéricas en el hombre [6-9], siendo las principales causas la ingestión de agua y alimentos contaminados.

Se considera a la carne de pollo como uno de los vehículos importantes para la transmisión de *Salmonella* en humanos [10, 11].

Debido a que en nuestra zona no se han realizado hasta el presente, estudios microbiológicos durante el procesamiento en planta, se procedió a investigar microorganismos psicrótrofos totales, proteolíticos, lipolíticos y presencia de *Salmonella* y *Pseudomonas* en canales de pollos refrigeradas, provenientes de una planta procesadora de la provincia de Misiones, con el fin de contribuir a optimizar la calidad del producto refrigerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se realizaron 13 operaciones de muestreo en el período marzo-diciembre de 1994. Cada muestreo consistió en la toma de 5 canales de pollo eviscerados de la cámara (-2°C) de la Planta Faenadora. Se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se trasladaron refrigeradas para ser procesadas inmediatamente en el laboratorio.

Investigación de microorganismos psicrotrofos. Se procedió de acuerdo con la siguiente metodología [12-16]:

Toma de muestra. Por el método no destructivo del lavado de cada canal con 300 ml de Agua de Peptona al 1% (suspensión madre).

Preparación de las diluciones. A partir de la suspensión madre se efectuaron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} empleando Agua de Peptona al 0,1%.

Psicrotrofos totales. Se inocularon por duplicado placas de PCA, mediante el método de siembra en volumen [17].

Psicrotrofos proteolíticos. Se inocularon en superficie y por duplicado placas de Agar Caseinato de Calcio y Agar Leche. Se efectuaron recuentos de colonias que presentaron halos debidos a la proteólisis.

Psicrotrofos lipolíticos. En placas de Agar Manteca y Agar Trioleína, por duplicado. Se contaron colonias que presentaron halos de lipólisis [18].

Condiciones de cultivo. En todos los casos la incubación se realizó a 7°C durante 10 días, efectuándose luego los recuentos correspondientes.

Pseudomonas psicrotrofas. Se inocularon en superficie, placas de Agar Cetrimide (AC). Se incubaron a 7°C durante 10 días. Se seleccionaron colonias características en Agar Infusión de Cerebro y Corazón, se incubaron 24 horas a 30°C y se efectuaron las siguientes pruebas bioquímicas [19]: Tinción de Gram, prueba de la oxidasa, prueba de la catalasa, formación de H₂S, movilidad, O/F (oxidación fermentación) fermentación de los siguientes compuestos: glucosa, inositol, sorbitol, manitol, ramnosa; producción de indol, de lisina descarboxilasa y de fenil alanina deaminasa.

Las cepas presuntivas de género Pseudomonas, se enviaron al Instituto Nacional de Microbiología «Dr. Carlos G. Malbrán», para confirmación bioquímica.

Investigación de Salmonella: Para aislamiento y tipificación se procedió de acuerdo con la siguiente metodología [19-24]:

Toma de Muestras. La toma de muestras se realizó por el método no destructivo del lavado de cada canal, utilizando 300 ml. de caldo peptonado bufferado en bolsas de polietileno estériles.

a) Preenriquecimiento. En caldo peptonado bufferado, incubado a 37°C, durante 24 hs.

b) Enriquecimiento selectivo. Se sembraron al 10 % caldos Selenito-Cistina (SC) y Rappaport-Vassiliadis (RV), que se incubaron durante 48 hs. a 41,5°C.

c) Aislamiento. Se utilizaron placas de los siguientes medios: Agar Bismuto-Sulfito (BS), Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD), Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) y Agar Verde Brillante-Rojo fenol-Lactosa-Sacarosa (BPLS). Se incubaron a 37°C por períodos variables según requerimientos. Los ensayos se realizaron por duplicado. De cada placa se aislaron 5 colonias que se sembraron en Agar Tripticosa Soya (TSA), con el fin de lograr cultivos adecuados para realizar las pruebas bioquímicas.

d) Identificación primaria. Se realizaron las siguientes pruebas: oxidasa, ureasa, fenil-alanina deaminasa, fermentación de hidratos de carbono: glucosa, lactosa, sacarosa; producción de sulfhídrico; lisina decarboxilasa, producción de indol; pruebas de Voges-Proskauer y licuefacción de gelatina. Se efectuaron las pruebas de beta-galactosidasa (ONPG) y utilización de citrato con cepas lisina decarboxilasa negativas.

e) Tipificación serológica. Fue realizada en el Centro Nacional de Referencia de Enterobacterias del Instituto Nacional de Microbiología «Carlos G. Malbrán», utilizando sueros somáticos y flagelares polivalentes, monovalentes y factores. La identificación de serovariedades se realizó de acuerdo con los criterios de Popoff y Le Minor.

f) Análisis Estadístico. Se utilizó el Test de Student para comparar los valores medios de psicrotrofos proteolíticos y lipolíticos y el test de las proporciones para evaluar la combinación de medios [25].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aisló Salmonella en el 12,5 % de las canales. La identificación serológica demostró la presencia de Salmonella Enteritidis (82%) y Salmonella Hadar (18%).

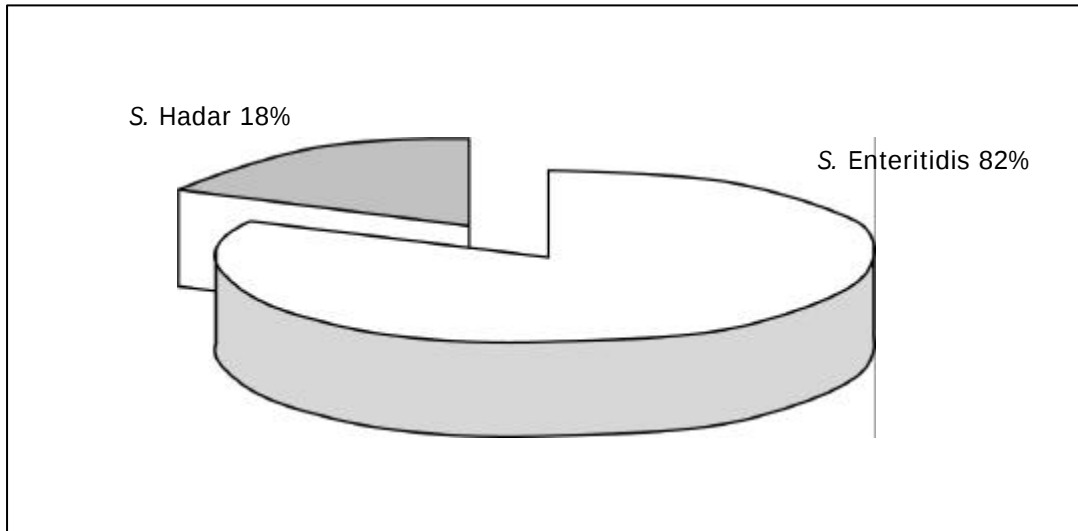


GRÁFICO 1. Aislamientos de *Salmonella*. Porcentajes.

La eficiencia de aislamiento de los medios de cultivo se aprecia en el cuadro 1. La combinación más adecuada resultó XLD - SC ($p < 0,05$).

CUADRO Nº 1: Eficiencia de los medios de cultivo					
CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO	MEDIOS DE AISLAMIENTO				TOTAL (%)
	XLD	EMB	BS	BPLS	
SC	40%	27%	13%	0%	80%
TT	0%	2%	0%	0%	2%
RV	16%	0%	2%	0%	18%

Se identificaron *Pseudomonas fluorescens* (70,7%), *Pseudomonas putida* (19,5%) y *Stenotrophomonas maltophilia* (9,8%) lo que se ilustra en el gráfico 2.

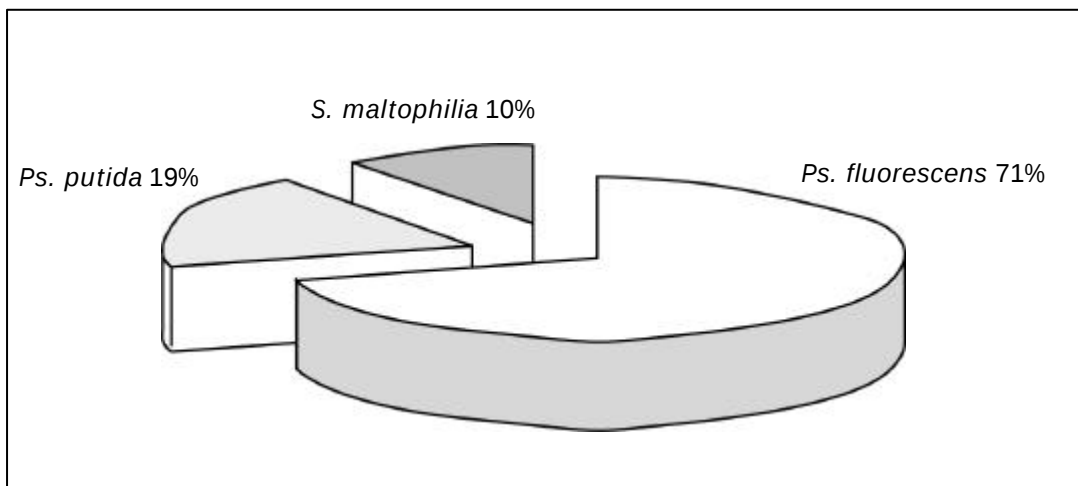


GRÁFICO 2. Distribución de *Pseudomonas* spp en canales de pollos evisceradas refrigeradas.

El promedio de los recuentos de psicrotrofos totales fue de $6,2 \times 10^5$ UFC/ml, con una mínima de $2,3 \times 10^5$ UFC/g y máxima de 3×10^7 UFC/g. El coeficiente de variación resultó elevado en todos los casos, dando valores entre 100 y 240.

Las diferencias entre los valores medios de psicrotrofos proteolíticos ($2,9 \times 10^4$ UFC/g) y lipolíticos ($2,0 \times 10^3$ UFC/g), demuestran predominio de los primeros ($p < 0,004$).

Los resultados obtenidos muestran una importante contaminación de las canales de pollos, lo que hace necesario la aplicación de medidas correctivas a través de la aplicación del análisis de riesgos y puntos críticos de control como así también, introducir innovaciones durante el faenamiento de las canales de pollos, como ser el tratamiento con compuestos orgánicos de manera tal de minimizar la contaminación en el producto final [5].

Según Ayres y colaboradores [2], para una carga microbiana inicial comprendida entre 10^3 y 10^4 UFC/g, el período de vida útil a 4°C es de una semana. En nuestro caso, la carga microbiana inicial oscila entre el orden de 10^5 y 10^6 UFC/g, lo que asegura una vida útil de 2 a 5 días.

BENASSI, F.; VON SPECHT, M.; GARCIA, M.; PUCCIARELLI, A.; ZUBRESKI, E. / Cátedra de Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

AGRADECIMIENTOS

A las divisiones: Bacteriología Especial y Enterobacterias del Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, por la confirmación bioquímica y tipificación serológica de cepas aisladas.

REFERENCIAS

1. BARNES, E.; IMPEY, C. Psychrotrophic spoilage of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 97-107. 1968.
2. INTERNATIONAL COMMISSION FOR MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS ON FOODS. (ICMSF). *Ecología Microbiana de los Alimentos*. Tomo II. Ed. Acribia. 1980.
3. BRYAN, F. L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. *J. Food Prot.* 43 (2): 140-150. 1980.
4. HALBINGER, R. E.; VIDDAL, M. S.; FRIEDMAN, R. *Microbiología de los alimentos conservados por el frío*. Ed. Hemisferio Sur. 1992.
5. LILLARD, H. S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broilers carcasses. *J. Food Prot.* 53 (3): 202-204. 1990.
6. BULLETIN EPIDEMIOLOGIE HEBDOMADAIRE. Francia, Les Infections a Salmonella Enteritidis en 1987. 26: 101. 1988.
7. BUTTA, N.; EIGUER, T. Salmonella, Shigella y Escherichia coli enteropatógena infantil (EPI). Datos registrados de la República Argentina durante el período 1979-1981. *Bact. Clin. Arg.* 1: 117-128. 1982.
8. CAFFER, M. I.; EIGUER, T. Salmonella Enteritidis in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 15-19. 1994.
9. CAYLE, F.; RIVEIRO, C. D.; HOWARD, A. J.; ROWER, B.; PALMER, S.R.; JONES, H. I.; WARD, J. Salmonella Enteritidis phage type 4 infection association with hen's eggs. *Lancet*: 1295-1297. 1988.
10. MERCADO, E. C. Salmonella en pollos eviscerados provenientes de plantas procesadoras del Gran Buenos Aires. *Rev. Arg. Microbiol.* 15 (4): 187-191. 1983.
11. ANONYMOUS. REPORTS OF OUTBREAKS OF FOODBORNE ILLNESS. Increasing rate of Salmonella Enteritidis infections in the Northeastern United States. *J. Food. Protection.* 50: 435. 1987.
12. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 13ª Ed. 1976.
13. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 14ª Ed. 1978.
14. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF)

Microorganisms in Foods. I - 2ª Ed. 1978.

15. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF)

Microorganisms in Foods. I - 2ª Ed. 1978.

16. RAFAGHELLI, R. C.; MASSEL, P.; JIMENEZ, S.;

TIBURZI, M. C.; MOGUILEVSKY, M. A. Características de la microflora psicrotrofa de canales evisceradas conservadas a 5°C. La Ind. Cárnica

Latinoamericana 17 (76): 31-35. 1989.

17. VIEHWEG, S.; SCHMITT, R.; SCHMIDT LORENZ, W.

Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers.

Production of off odours from poultry skin by bacterial isolates. Lebensm. Wiss. u. Technol. 22: 356-367. 1989.

18. UMEMOTO, Y. A Method for the Detection of

weak lipolysis of dairy lactic acid bacteria on

double-layered agar plates. Agr. Biol. Chem. (33)

11: 1651-1653. 1969.

19. MAC FADDIN, J. F. Pruebas bioquímicas para

la identificación de bacterias de importancia

clínica, Ed. Med. Panam. Bs. As. 1980.

20. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL

CHEMISTRY. Isolation and identification of

Salmonella species, p. 701-718. In Bacteriological Analytical Manual. 6th Ed. Ed. Arlington. V.A.

1984.

21. BAILEY, J.S.; CHIE, J.Y.; COX, N.A.; JOHNSON, R. W.

Improved selective procedure for detection of

Salmonella from poultry and sausage products. J.

Food Prot. 51 (5): 391-396. 1988.

22. BLANKENSHIP, L. C.; COX, N. A. Modified

water rinse sampling for sensitive non adulterating

Salmonella detection on eviscerated broiler

carcasses, J. Food Prot. 39: 680-681. 1976.

23. HAWA, S. G.; MORRISON, G. J.; FECT, G. H.

Method to rapidly enumerate Salmonella on

chicken carcasses. J. Food Prot. 47 (12): 932-936.

1984.

24. NOTERMANS, S.; KAMPELMACHER, E. J.

Attachment of some bacterial strains to the broiler

chickens. Br. Poult. Sc. 15: 573-585. 1988.

25. STATGRAPHICS PLUS (VERSION 7 FOR DOS).

STATGRAPHICS User Manual. Manugistics,

Inc. Rockville, Maryland. U.S.A. 1993.



CONTROL DE LA CALIDAD HIGIÉNICA DE HELADOS ARTESANALES EN POSADAS, MISIONES

von Specht, Martha / Amer, Lidia / Maubecin, Elsa
Alonso, Roxana / Bargardi, Severino.

HYGIENIC CONTROL ON ICECREAM FACTORY STORES IN POSADAS, MISIONES.

ABSTRACT

With the purpose of assesing the hygienic quality on icecream production and selling conditions, 47 icecream samples from three different stores in the city of Posadas were examined during the period 5/95 to 3/96.

Total mesophilic aerobic microorganisms, coliforms, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* counts were carried out, and *Salmonella* sp searched for.

All samples showed total mesophilic, on a 10^2 to 10^4 UFC/g average rate, a 7 to 93 NMP/g coliforms and no thermotolerant coliforms, *E. coli* nor *Salmonella* sp were found. Although these microorganisms were not isolated, it is absolutely necessary to evaluate them in case of food diseases outbreak.

For the *S. aureus* counts, two methods described by Food and Drug Administration (FDA) were used and it turned positive in two samples: in one 10 UFC/g and in the other 2 to 10/g (NMP)

All samples showed lower levels than the maximum ones allowed by the Argentinian Food Code for icecream production. There were no season difference from the microbiological point of view along the year.

Key Words: Hygienic Control; Bacterias in icecream factory; *Salmonella* sp in icecream.

RESUMEN

Con el propósito de conocer la calidad higiénica en helados de fabricación artesanal y formas de comercialización, se examinaron 47 muestras de helados en tres heladerías de Posadas (Misiones) durante el período 5/95 al 3/96.

Se realizaron recuentos de microorganismos mesófilos aerobios totales, coliformes, coliformes termotolerantes *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y se investigó *Salmonella* sp.

Todas las muestras presentaron microorganismos mesófilos totales, en un rango comprendido entre 10^2 y 10^4 UFC/g, coliformes de 7 a 93/g y no se detectaron coliformes termotolerantes, *E. coli* ni *Salmonella* sp. A pesar de no haberse aislado estos gérmenes es necesario tenerlos presentes siempre y estar preparados para casos de brotes de enfermedades de transmisión alimenticia.

Para el recuento de *S. aureus* se usaron dos métodos recomendados por la Food and Drug Administration (FDA) y resultó positivo en dos muestras, en una con 10 UFC/g y otra entre 2 y 10 /g (NMP)

Todas las muestras alcanzaron resultados inferiores a los máximos permitidos por el Código Alimentario Argentino para helados de elaboración artesanal. No se observó diferencia estacional, desde el punto de vista microbiológico, en todo el año.

Palabras Claves: Higiene en helados; Helados artesanales; *Salmonella* sp en helados.

INTRODUCCIÓN

Debido a la necesidad de aportar una base real de lo que acontece con alimentos no cárnicos en esta provincia, dado que no se cuenta con datos estadísticos o trabajos sobre el tema, se procedió a realizar un estudio de la calidad microbiológica de helados de elaboración artesanal desde mayo/95 a marzo de 1996.

La calidad higiénico sanitaria se evaluó mediante las siguientes determinaciones: a) Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Totales (MT); b) Recuento de Coliformes (C); c) Recuento de Coliformes termotolerantes (CT) y *E. coli*; d) Recuento de *S. aureus*; e) Investigación de *Salmonella* sp.

Teniendo en cuenta el gran consumo de helados en esta ciudad durante todo el año, se concentró la tarea a comprobar la higiene de la fabricación, y el posterior expendio de los mismos, a fin de aportar datos a los medios e instituciones encargadas del control oficial y asesoramiento técnico a las fábricas.

Es importante tener en cuenta la posible contaminación exógena a través del factor humano (1) o la contaminación post pasterización procedente de las superficies de contacto del equipo y también de las frutas, nueces, colorantes, aromatizantes que pueden contribuir a la contaminación del producto, sobre todo si la adición se efectúa después de la pasterización.

Se sabe de la importancia del consumo de alimentos de buena calidad para resguardar la salud de la población. En nuestra zona, las diarreas infantiles son muy frecuentes y originadas por causas diversas, entre ellas los helados; ello debe inducir a efectuar controles de calidad frecuentes y estar alertas a los brotes de enfermedades de transmisión alimenticia (ETA).

La microflora de los helados antes de la pasterización es la que procede de los diversos ingredientes; sin embargo, no suelen ocurrir alteraciones, debido a que la mezcla debe ser pasterizada a temperaturas más altas que las que se utilizan

para la leche, y además durante el congelamiento hay una desintegración de las células microbianas por efecto del movimiento rápido de los cristales de hielo (2).

La masa de helado líquido constituye un medio de cultivo donde puede ocurrir un rápido crecimiento microbiano, mientras que en el helado duro (-20°C), la baja temperatura y la baja actividad de agua impide la proliferación microbiana. No obstante, no debe existir una demora entre la pasterización y la congelación para que no se produzca alteración, a menos que se vaya a utilizar como helado blando, el cual está a una temperatura de -6°C a -7°C.

Las ETA causadas por *Staphylococcus aureus*, son debidas a la contaminación post-proceso que permite su crecimiento, o en su defecto, a la aportada por la leche, ya que la enterotoxina estafilocócica (3) es termoestable y resiste al tratamiento térmico de la pasterización (4), lo que no ocurre con las enterotoxinas de *Salmonella* sp, las que son termosenesibles.

La presencia de *Salmonella* sp y *S. aureus* en helados, como también de una flora acompañante en proporciones mayores a las permitidas, atentan a la salud pública y son un claro indicio de una labor descuidada en los puntos críticos que se debe analizar y prevenir comunicando a los fabricantes para no incurrir en errores por desconocimiento y en otros casos motivados por factores económicos personales.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS

Se examinaron 47 muestras de 500 gramos cada una de helados de fabricación artesanal a base de crema de leche, procedentes de 3 heladerías de la ciudad de Posadas, con muestreos semanales, durante el período entre mayo/95 y marzo/96. Las muestras fueron tomadas directamente de los establecimientos tal como se comercializa al público, se transportaron refrigeradas y se analizaron de inmediato a su arribo al laboratorio.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS:

Se homogeneizaron por agitación 25 g con 225 ml de agua peptonada (AP) al 0,1% (5), y se efectuaron los siguientes recuentos: microorganismos aerobios mesófilos totales (agar para recuento en placa, PCA), (UFC/g); coliformes y coliformes termotolerantes (caldo lauril sulfato, LST; caldo verde brillante lactosa bilis, BGLB) (NMP/g); *E. coli*, biotipo 1, (BGLB, agar eosina azul de metileno, EMB; IMViC).

DETERMINACIÓN DE SALMONELLA SP

Se realizó el pre-enriquecimiento no selectivo en AP al 1% (24 hs a 35-37°C). Luego se sembraron los cultivos en dos caldos de enriquecimiento selectivo: selenito cistina (SC) y tetraciónato (TT). Se incubaron durante 24 horas a 43°C.

Para el aislamiento de *Salmonella* se utilizaron los siguientes medios selectivos: EMB, Agar *Salmonella Shigella* (SS), agar bismuto sulfito (BS), agar verde brillante (VB), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD) y se incubaron entre 35 y 37°C durante 24-48 horas. Las siembras se efectuaron por duplicado.

De cada una de las placas, se aislaron 5 colonias presuntivas de *Salmonella*, previa purificación de las mismas, se sembraron en tubos de agar triple azúcar hierro (TSI) y agar lisina hierro (LIA) y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Luego se continuó con la identificación bioquímica y serológica de las mismas (oxidasa, ureasa, indol, rojo de metilo, Voges Proskauer, citrato, fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, gas de glucosa, SH₂) (6). La tipificación serológica de las cepas de *Salmonella* se efectuó con antiseros polivalentes provistos por el Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán, Bs. As.

DETERMINACIÓN DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Para esta determinación se emplearon dos métodos (2): 1) Recuento en placas y 2) NMP. En ambos casos con 10 g de muestra en 90 ml de agua de peptona salada al 0,1% con pH 7 (7).

1) Recuento en placas: A partir de la suspensión madre homogenizada, se prepararon diluciones seriadas al décimo en agua de peptona salada al 0,1%. Se sembraron en placas agarizadas de medio de Baird Parker, adicionadas de telurito y yema de huevo. Se incubaron 48 hs a 37°C y se efectuaron los recuentos. Las colonias típicas se

repicaron para su confirmación en caldo de infusión de cerebro y corazón. Previa observación microscópica de los preparados coloreados por Gram, se efectuaron las siguientes determinaciones: catalasa, la coagulasa en tubo y la utilización anaeróbica de la glucosa. (8).

2) Técnica del NMP (9,10): Se utilizó caldo tripteína soja (CTS) con 10% de CINA y 1% de piruvato de sodio y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Se estriaron luego placas de Baird Parker, y se incubaron a 37°C durante 48 horas. Se confirmaron como se indicó anteriormente.

RESULTADOS

Los resultados de las 47 muestras analizadas se observan en las Tablas N° 1 y 2.

Salmonella sp no se aisló en los 47 muestreos analizados, pero se recuperó la cepa patrón de *Salmonella Enteritidis* en los ensayos realizados.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales encontrados está en un rango de 10^2 y 10^4 UFC/g y no sobrepasó el límite establecido por el Código Alimentario Argentino (CAA) para el número máximo de bacterias permitidas en helados de elaboración artesanal ($\text{no} > 2 \times 10^5/\text{g}$) pero, según bibliografía, el recuento total de aerobios tras la pasteurización no debería ser mayor de unos cientos por mililitro de muestra (11, 4).

En lo referente al grupo coliforme, en algunos Códigos de Salud Pública de los Estados Unidos se propusieron para este grupo, valores entre 10 y 20 bact/g (2) y el CAA señala que no debe ser mayor de $1,5 \times 10^2$ bact/g (11). Nuestros valores oscilan entre 7 y 93 bact/g.

En base a estas comparaciones los helados estudiados poseen una calidad higiénica adecuada a nuestro CAA.

Los recuentos de *S. aureus* por los métodos usados dieron 10 UFC/g y otro entre 2 y 10/g (NMP), resultados éstos que se encuentran dentro de lo permitido por el CAA (11) que establece menos o igual a 5×10^2 NMP/g y son concordantes con otros estudios llevados a cabo por investigadores argentinos en helados artesanales, lo que en cierta forma señala que los helados estudiados poseen una buena calidad higiénica. Para realizar este tipo de análisis recomendaríamos la técnica del NMP debido a la baja cantidad de gérmenes encontrados (9, 10). Consideramos tam-

TABLA N°1: Recuento de bacterias aerobias mesófilas totales y *S. aureus* en helados artesanales. Período Mayo 1995 - Marzo 1996

MUESTRAS No positivas No Analizadas	Distribución de los recuentos: (UFC/g) Mesófilos Totales	% DE MUESTRAS
6/47	10 -10 ²	13
31/47	10 ² -10 ³	65
10/47	10 ³ -10 ⁴	22
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
1/24*	< de 10	4
* En las primeras 24 muestras. Método de recuento en placas (B.Parker).		

TABLA N°2: Recuento de coliformes, coliformes termotolerantes, *E. coli* y *S. aureus* en helados artesanales. Período Mayo 1995 - Marzo 1996

TIPO DE RECuento	Distribución de los recuentos (NMP/g) Mesófilos Totales	% (N° positivas N° analizadas)
Coliformes	menor a 10 11 - 100	89 (42/47) 11 (5/47)
Coliformes termotolerantes	0	100 (47/47)
<i>E. coli</i>	0	100 (47/47)
<i>S. aureus</i> *	2 a 10	4 (1/23)
* En las 23 muestras restantes. Método del NMP.		

bién importante, coincidentemente con otros autores, la inclusión del método de recuento utilizado en el CAA (3).

En un estudio global, se podrían obtener seguramente helados de mejor calidad microbiológica con respecto a normas de países más exigentes. Para ello deberá tenerse en cuenta una suma de otros factores para determinar el origen humano o bovino principalmente de *S. aureus* ya que éste es un buen indicador de la higiene de operarios y establecimientos procesadores de alimentos, más aún considerando que estas bacterias son vulnerables a tratamientos térmicos y desinfectantes (2); esto también implicaría a *Salmonella* sp.

Por otra parte, es fundamental el control de la calidad bacteriológica de los insumos donde es posible señalar: a) selección de ingredientes con

una baja tasa bacteriana, b) el uso de tratamientos pasterizantes suficientemente intensos para reducir la carga bacteriana hasta niveles bajos, pero no lo suficientemente severos para ser perjudiciales para el producto, c) evitar la contaminación post-pasterización, d) el mantenimiento constante de la mezcla de helado a una temperatura baja (4) y e) el factor económico humano en relación a costo/beneficio de mucha importancia en nuestros días en los países en desarrollo.

En cuanto a las pruebas de identificación para *S. aureus* recomendadas por el FDA, la prueba de coagulasa en tubo que da 4+ debe ser confirmada por otras pruebas como acidez de la glucosa y manitol en anaerobiosis, sensibilidad a la lisotafina y termonucleasa.

El bajo recuento de mesófilos, habla de un relativamente buen diagrama de flujo de las heladerías.

Si bien no se detectó *Salmonella* sp en las muestras investigadas, ensayos efectuados con cepas control, revelan que el método empleado es útil para este tipo de trabajo, por la recuperación lograda.

En la ciudad de Posadas el consumo de helados no presenta una variación estacional significativa, como tampoco observamos diferencias desde el punto de vista microbiológico en todo el año. Algunos autores sostienen que los controles deberían realizarse hasta los 10 días de elaboración del helado para obtener resultados más fidedignos (12, 13), opinión con la que se coincide pensando que es un dato más que se aporta si no se conoce el comportamiento local del ambiente y las circunstancias que muchas veces motivan la fabricación de helados basándose en la mera especulación económica y muy alejada del daño al consumidor, sin tener en cuenta tampoco a los microorganismos; otros sostienen que la muerte microbiana en el helado es mínima (3).

La opinión del grupo de trabajo es que el muestreo y análisis bacteriológicos de helados deberían estar orientados a conocer la tasa total de los indicadores generales de higiene como MT, C, CT, hongos y de contaminación fecal como *E. coli*; y en caso de un brote de enfermedad alimentaria investigar bacterias enteropatógenas como *Salmonella* sp y *S. aureus*, entre otras. •

VON SPECHT, Martha; AMER, Lidia; MAUBECIN, Elsa; ALONSO, Roxana; BARGARDI, Severino / Cátedra de Microbiología General Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM.

AGRADECIMIENTOS

A las autoridades del CIDEt que facilitaron el aporte del programa nacional de incentivo decreto 2437/93.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RUIZ, C. S. de; ALLORI, C. G. de; SAAB, O. A. de; GUTIERREZ, R. C. de; CASTILLO, M. C. de; FERNANDEZ, N. P. de; RUIZ HOLGADO, A. P. de; NADER, G. M. de. Control de Calidad Bacteriológica de Helados; VII Congreso Arg. de Microbiología, D: 2, Bs. Aires. 1995.
2. CENTORBI, O. P. de; GUZMÁN, A. C. de; CUADRADO, A. A. de; LACIAR, A. L.; ALCARÁZ, L. E.;

MILÁN, M. C. de; PEDERIVA, N. B. Determinación de la calidad higiénica e investigación de *Salmonella* sp y *Yersinia enterocolitica* en helados; Rev. Arg. de Microbiología 21: 63-68. 1989.
3. RIVAS, M. Helados de elaboración industrial. Incidencia de *S. aureus* y enterotoxigenicidad; Rev. Arg. de Microbiología 16 N°4: 225-232. 1984.
4. SILLIKER, J. H.; ELLIOTT, R. P.; BAIRD PARKER A. C.; BRYAN, F. L.; CHRISTIAN, J. H. B. B.; CLARK, D. S.; OLSON, J. C.; ROBERTS, T. A. Ecología microbiana de los alimentos. Vol. II, pág. 498-502. Ed. Acibria. Zaragoza, España. 1980.
5. HITCHINS, A. D.; FENG, P.; WATKINS, V. D.; RIPPEY, S. R.; CHENDLER, L. A. 1992. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Bacteriological Analytical Manual, 7th Ed. Food and Drug Administration, pp. 27-38. Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International.
6. MC FADDIN, Jean F. Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana S.A. Viamonte 2164. Bs.As. 1980.
7. TIMM, Frite. Fabricación de Helados, pág. 250-251, Ed. Acibria. Zaragoza, España. 1989.
8. ESTEVAO BELCHIOR, S.; DAS NEVES, M.; PUCCI, O. Estudios de bacterias aisladas en un medio selectivo para *S. aureus*. VII Congreso Argentino de Microbiología, D: 31, Bs. Aires. 1995.
9. PEELER, J. T.; MC CLURE, S. D. Bacteriological Analytical Manual. 7ª Ed. Food and Drug Administration. Cap. 12, Appendix 2. Ass. Off. Analit. Chem. W.D.C. 1992.
10. BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. 1992. *Staphylococcus aureus*. Bacteriological Analytical Manual. 7ª Ed. Food and Drug Administration, pp. 161-165 Arlington VA: Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International.
11. DE LA CANAL Y ASOCIADOS S.R.L. Código Alimentario Argentino (Actualizado) Cap. 12, pag. 352-354, Buenos Aires.
12. FORMENTI, L.; TOBIA, M.; CÓRDOBA, A.; PEREZ, A. Incidencia del *S. aureus* en helados de elaboración artesanal. Influencia de la temperatura de conservación, VII Congreso Arg. de Microbiología. D: 3. Bs. Aires. 1995.
13. PUCCI O. H.; CORREIA, M. A.; DIAZ, A. B. Recuperación de microorganismos en medios utilizados en la industria alimentaria; VII Congreso Arg. de Microbiología, E 56. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires. 1991.



VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C) EN EL PROCESAMIENTO DE LA YERBA MATE

Ramallo, L. A. / Schmalko, M. E. / Känzig, R. G.

VARIATION OF ASCORBIC ACID (VITAMIN C) CONTENT IN YERBA MATE MANUFACTURE

ABSTRACT

The objective of this research was the determination of ascorbic acid (vitamin C) content during the manufacture and consumption of the yerba mate (*ilex paraguariensis* saint hilaire).

A chromatographic technique (HPLC) for vitamin C in yerba mate was developed. With this technique, vitamin C, in twigs and leaves was determined. Higher concentration in leaves than in twigs was found.

During the manufacture of yerba mate, an important degradation of vitamin C was found, varying its concentration from 104.31 to 22.10 mg/100g of dry solid. During the consumption of the drink, as maté, a 38% of the vitamin C is extracted.

Finally, during the manufacture and consumption of the yerba mate, as maté, only the 5.6% of the content of vitamin C in the tree is consumed.

KEY WORDS: vitamin C, yerba mate, degradation.

RESUMEN

Este trabajo tiene por objetivo la determinación de la variación del ácido ascórbico (vitamina C) en la yerba mate durante el procesamiento y consumo de la yerba mate (*ilex paraguariensis* saint hilaire).

Se desarrolló una técnica de cromatografía líquida (HPLC) para determinar la concentración de vitamina C en la yerba mate. Con esta técnica se determinó la concentración de esta vitamina en hojas y palos. Se encontraron contenidos mayores de esta vitamina en hojas que en los palos.

En el procesamiento de la yerba mate se produce una importante degradación de la vitamina C, variando en las hojas de 104,31 a 22,10 mg/100 g de sólido seco. En el consumo del mate, se extrae el 38% de la vitamina contenida en el sólido.

Finalmente, durante el procesamiento de la yerba mate y su consumo en forma de mate, se mantiene solamente el 5,6% del contenido inicial en la planta.

PALABRAS CLAVES: vitamina C, yerba mate, degradación.

INTRODUCCIÓN

En general, las vitaminas son sensibles a diversos factores tales como la variación genética, el grado de madurez, las condiciones del suelo, la temperatura, la disponibilidad de luz y de agua, la manipulación post-recolección y los procesamientos industriales[1], [2], [3], [4].

El proceso de elaboración de la yerba mate consta de cuatro etapas principales: sapecado, secado, canchado o molienda gruesa y estacionamiento. La primera, es un tratamiento térmico violento (temperaturas superiores a los 300°C) durante corto tiempo. El secado se realiza generalmente con gases de combustión a temperaturas no superiores a los 120°C, durante varias horas. La cuarta etapa, el estacionamiento que puede ser natural o acelerado, se lleva a cabo en condiciones de temperatura, humedad y concentración de oxígeno que varían considerablemente de una industria a otra. En general, los equipos utilizados y las condiciones de operación varían grandemente, haciendo que prácticamente no existan dos establecimientos que trabajen de la misma forma.

Debido a que la yerba mate se consume exclusivamente en forma elaborada y teniendo en cuenta lo antes mencionado, en el presente estudio se busca determinar el contenido de ácido ascórbico en el extracto acuoso, simulando la forma más común de consumo (el tradicional "mate"). Por otra parte, se estudia la degradación del ácido ascórbico durante el procesamiento analizando el contenido del mismo en hojas y palos verdes (sin procesar) y en hojas y palos secos.

MATERIALES Y MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

a) Para cuantificación del contenido de ácido ascórbico en el material sólido:

Se utilizaron hojas y palos de yerba mate verde y yerba mate provenientes de un molino de la Provincia de Misiones. Dado el alto contenido de humedad de las hojas verdes no fue posible molerlas y se las utilizó cortadas en pequeños pedazos. En la yerba seca se separaron en forma manual las hojas de los palos, los que fueron molidos utilizando un molino de cuchilla con tamiz abertura 1,5 mm.

En el estudio de la yerba elaborada (procesada y estacionada) se seleccionaron seis de las marcas más comercializadas.

Las muestras se escogieron al azar en comercios locales, en paquetes de 1 Kg.

Partiendo de 2 Kg. de cada marca, por cuarteo se separó un lote de aproximadamente 100 gr. para el estudio de vitaminas.

Estas muestras fueron finamente molidas y almacenadas en frascos cerrados durante más de 48 horas para uniformar su humedad.

Se colocó 5 gr. de muestra en un erlenmeyer de 125 ml., al que se adicionó 50 ml. de buffer (pH=5,2), dejando macerar la mezcla durante 30 minutos a 60°C en un baño a temperatura constante, con agitación cada 5 minutos y en ausencia de luz.

Posteriormente se separó el residuo sólido mediante filtración a través de papel Whatman N° 3, y se enrasó a 50 ml. el filtrado obtenido. Antes de la inyección al cromatógrafo se realizó una segunda filtración a través de un filtro de nylon 0.22 µ, 13 mm.

b) Para cuantificación del contenido de ácido ascórbico en el extracto acuoso:

Debido a que la yerba mate se consume exclusivamente en forma elaborada y teniendo en cuenta que el objetivo de este estudio es determinar la cantidad de vitamina que se extrae durante la mateada, se trabajó con varias marcas de yerba ya industrializada.

Partiendo de 2 Kg. de cada marca, por cuarteo se separó un lote de aproximadamente 500 gr. para el estudio de vitaminas.

La extracción de las sustancias solubles en agua de la yerba mate, se realizó en un dispositivo que simula el proceso real de toma de mate.

El mismo consta de un recipiente de vidrio de 50 mm. de diámetro y 110 mm. de altura con una bombilla conectada por medio de una manguera flexible a un kitasato en el que se hace vacío por medio de una trompa de vacío. Se utiliza una bombilla de plástico de calidad alimenticia, con orificios no mayores a 0,8 mm. El kitasato se encuentra dentro de un recipiente con hielo. El dispositivo tiene la forma que se muestra en la figura 1.

En el recipiente de vidrio se colocan 50 gr. de muestra. Se vierten aproximadamente 30 ml. de agua destilada a 70°C (en termo), se espera 20 segundos y se realiza vacío hasta extraer todo el extracto posible. Después de 40 segundos del primer vertido se realiza el siguiente. El proceso se repite hasta que en el kitasato alcance un nivel de 500 ml.

MÉTODO DE ANÁLISIS: [5]

Equipamiento cromatográfico: Se utilizó un modelo de cromatógrafo líquido Shimadzu LC 6A, equipado con un integrador CR3 A y un detector a 254 nm (Shimadzu).

Columna: Se utilizó una columna Alltima C18 5 Micron, de 250 mm x 4,6 mm.

Fase móvil: Consistió en una fase isocrática formada por una mezcla buffer: acetonitrilo (95:5 v:v). La solución buffer se preparó disolviendo acetato de sodio en agua bidestilada en una concentración 0,05 M, pH=5,20 ajustado con ácido acético. Una vez preparada la mezcla buffer: acetonitrilo, la misma fue desaireada con ultrasonido.

Flujo: 1 mm/min.

Detector: UV 254 nm; UFS=0,04

Inyección: 10 µl

Standard de referencia: las muestras standard de ácido ascórbico se prepararon diluyendo 30 mg de ácido ascórbico (Sigma Chemical CO) en 30 ml de buffer. Luego esta solución se diluyó 1/100 (10 µl de la solución anterior en 1 ml de buffer). Se tomó como referencia el área obtenida con la inyección de 10 µl de standard (técnica de patrón externo).

Los análisis, en todos los casos, se realizaron por duplicado y los resultados que se registran son la media de estos análisis.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD:

El contenido de humedad se determinó por el método de la pesada constante en estufa a 105°C durante 6 hs. [6].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra la variación en el contenido de ácido ascórbico durante el procesamiento de las hojas y palos de yerba mate.

Tabla I: Contenido de vitamina C en hojas y palos de yerba mate de la muestra verde y el producto seco (en mg/100 g de sólido seco).			
Hojas verdes	Palos verdes	Hojas secas	Palos secos
104,31	6,29	22,10	3,81

La Tabla 2 muestra el contenido de ácido ascórbico en yerba mate elaborada (mezcla de hojas y palos) y se compara con el contenido del extracto acuoso de yerba mate obtenido simulando

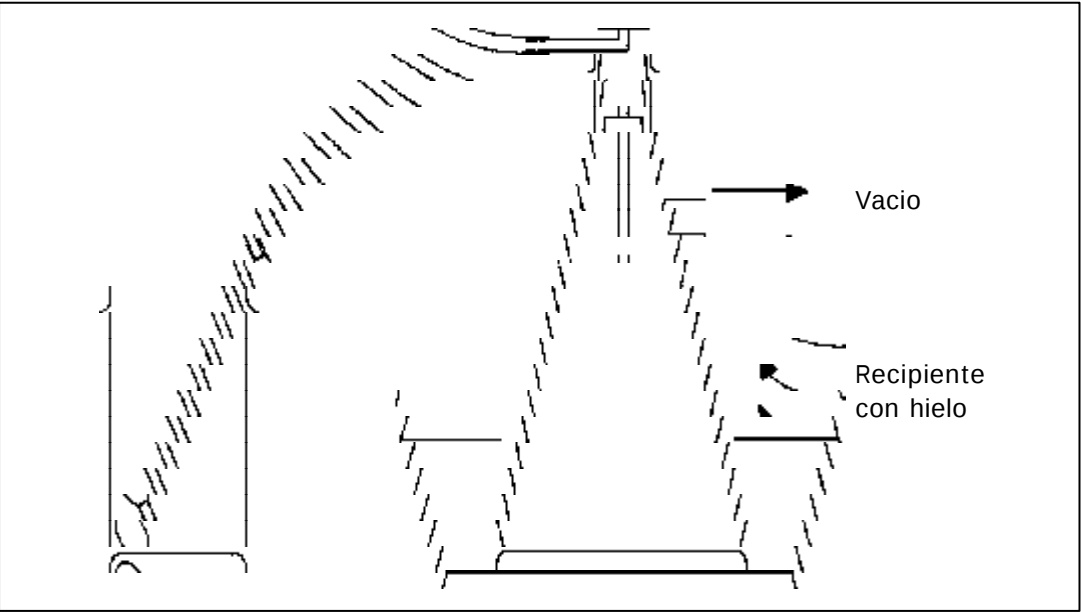


FIGURA 1: Extractor de la muestra para el análisis del extracto acuoso simulando una mateada.

el tradicional mate. Tomando los valores medios de los resultados obtenidos se puede inferir que se extrae aproximadamente el 38 % del ácido ascórbico durante la mateada.

Tabla 2: Contenido de vitamina C en 6 muestras diferentes de yerba mate elaborada, en el producto seco y en el extracto acuoso

	Contenido en la yerba mate elaborada (mg/100g de sólido seco)	Contenido en el extracto acuoso (mate) (mg/100g de sólido seco)
	14,76	3,98
	12,76	2,81
	8,05	3,46
	9,74	3,20
	11,18	5,61
	8,47	5,62
Valores promedios	10,83	4,11
Desviación standard	2,60	1,22

Por otra parte, a partir de los valores de extracto acuoso de las seis muestras de yerba mate elaborada cuyos contenidos en vitamina C figuran en la Tabla 2 y conociendo la relación existente entre el valor de extracto acuoso y la fracción en peso de hojas [7], daría un contenido de palos del 32% aproximadamente.

De acuerdo con este valor, el porcentaje de vitamina C que se consume es del 5,6%, con respecto al contenido inicial en las hojas y palos verdes de yerba mate.

Este porcentaje es mucho menor que el encontrado en otros vegetales. En arvejas se encontró una retención de aproximadamente el 79% [4] En habas Van Buren et al. [8], encontraron una retención de aproximadamente el 78%. En el procesamiento de las papas se encontró que luego del escaldado la retención del ácido ascórbico era del 40,5% [2]. Sin embargo, estos autores no identifican contenido alguno de ácido ascórbico en papas elaboradas en forma de copos. En pimientos, Howard et al. [9] encontraron pérdidas de vitamina C del orden del 75% en el procesamiento, pero, el tratamiento térmico a que es sometido es mucho menor que el de la yerba mate. En espárragos,

Esteve et al. [10], encontraron una pérdida del 66% a los 10 días cuando se almacenaba a 4°C. Comparando las pérdidas reportadas con las producidas en la yerba mate, se concluye que en esta última son mucho mayores. Sin embargo se tiene que tener en cuenta que el tratamiento térmico a que es sometida la yerba mate, como se menciona en la introducción de este trabajo, es mucho mayor.

CONCLUSIONES

Se encontró que la concentración de vitamina C es notoriamente mayor en las hojas que en los palos de yerba mate; encontrándose en hojas/palos verdes una relación del 16,6 y en la yerba seca esta relación es del 5,8.

El procesamiento de la yerba (sapeado, seco y canchado) produce una importante degradación de la vitamina C haciendo que los valores en el contenido de la misma en hojas caigan de 104,31 a 22,10 mg/100 gr de yerba seca. A partir del contenido en hojas y en palos se estimó que durante el estacionamiento se degrada aproximadamente un 66 % del ácido ascórbico presente. Durante la toma del mate se extrae un 38 % del contenido de vitamina C en la yerba mate.

Finalmente, durante el procesamiento de la yerba mate y el consumo en forma de mate, se mantiene sólo el 5,6% del contenido inicial de vitamina C presente en la planta. •

RAMALLO, L. A.; SCHMALKO, M. E. y KÄNZIG, R. G. Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

REFERENCIAS

1. LEE, C. Y.; MASSEY, L. M. and VAN BUREN, J. P. Effects of post-harvest handling and processing on vitamin contents of peas. J. of Food Science, vol. 47: 961-964. 1982.
2. SULLIVAN, J.; KOZEMPEL, M. F.; EGOVILLE, M. J. and TALLEY, E. A. Loss of Amino Acids and Water Soluble Vitamins during Potato Processing. J. of Food, Science vol. 50: 1249-1253. 1985.
3. FENNEMA, Owen R. Food Chemistry. Third Edition. Marcel Dekker, Inc. 559-568. 1996.

4. GARCÍA HERNÁNDEZ, F. P.; DÍAZ ROMERO, C. y HARDISSON DE LA TORRE, A. Estabilidad de tiamina y riboflavina frente a algunos factores fisicoquímicos. Revista Afinidad N° 451: 237-240. 1994.
5. FALLON, A.; BOOTH, R. F. G. and BELL, L. D. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Edited by Elsevier. Third Edition. Amsterdam, p: 284. 1993.
6. IRAM: Instituto de Racionalización de Materiales. Norma 20503.
7. ESCALADA, A; SCHMALKO, M. E. y KÄNZIG, R. G. El extracto acuoso como una medida del contenido de palos en la yerba mate. Actas de la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Tomo IV. Pág. 145-148. 1996.
8. VAN BUREN, J. P.; LEE, C. Y. and MASSEY J. R. Variation of Vitamin Concentration and Retention in canned Snap Beans from Three Processing Plants During two years. J. of Food Science vol. 47: 1545-1548. 1982.
9. HOWARD, L. R.; SMITH, R. T.; WAGNER, A. B.; VILLALOL, B. and BURNS, E. E. Provitamin A and Ascorbic Acid Content of fresh Pepper Cultivars (*Capsicum annuum*) and Processed Jalapeños. J. of Food Science, vol. 58: 362-365. 1994.
10. ESTEVE, M. J.; FARRÉ, R. and FRÍGOLA, A. Ascorbic Acid Stability in Ground Asparagus Samples and Oxalic Acid Extracts. J. of Food Science, vol. 60: 1282-1283. 1995.



EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD DE LIXIVIADOS DE RESIDUOS SÓLIDOS DOMICILIARIOS - FRACCIÓN ORGÁNICA - PRODUCIDOS EN CONDICIONES ANAERÓBICAS

Pettri Flores, M. D. / Reta, M. R. / Acuña, M. G. / Barboza, O. M. / Russo, H. R.

EVOLUTION OF THE LEACHATE QUALITY OF DOMICILIARY SOLID WASTES ORGANIC FRACTION PRODUCED IN ANAEROBIC CONDITIONS

ABSTRACT

The characteristics of the leachate generated during the process of anaerobic digestion of the Urban Solid Waste organic fraction, inoculated with rural biodigester effluent were studied in a batch, pilot scale reactor of 69 litres, during 434 days.

Quality indicators such as BOD₅, COD, TS, TVS, TFS, pH, Volatile Organic Acids and Conductivity, were analysed employing standard methods. The results obtained are in good agreement with the literature data. Correlations between the most important parameters were found. It was determined that pH with Volatile Organic Acids can be used together with any one of the following parameters: BOD₅, COD, Total Solids or Total Fixed Solids, to characterise the leachates generated in the conditions of the present work.

The selection of the parameter will be subject to the availability of equipment and materials, the degree of reliability and reproducibility of the adopted method and the cost involved.

KEY WORDS: leachate; anaerobic digestion; municipal solid waste; putrescible waste.

RESUMEN

Se estudiaron las características del lixiviado generado durante el proceso de digestión anaeróbica de la fracción orgánica de Residuos Sólidos Urbanos inoculada con efluente de un biodigestor rural, en un ensayo tipo batch a escala piloto, llevado a cabo en un reactor de 69 litros, durante 434 días.

Se analizaron los indicadores de calidad tales como DBO₅, DQO, ST, STV, STF, pH, Ácidos Orgánicos Volátiles y Conductividad, empleando métodos estandarizados. Los resultados obtenidos concuerdan de manera general con los encontrados en la literatura específica.

Se hallaron las correlaciones existentes entre los parámetros más significativos y se demostró que el pH juntamente con los Ácidos Orgánicos Volátiles y cualesquiera de los siguientes parámetros, Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda Química de

Oxígeno, Sólidos Totales o Sólidos Fijos Totales, pueden ser utilizados para caracterizar a los lixiviados generados en las condiciones del desarrollo del trabajo. El parámetro seleccionado, estará sujeto a la disponibilidad de los equipamientos y materiales necesarios, al grado de confiabilidad y de reproductibilidad del método adoptado, además de los costos involucrados.

PALABRAS CLAVES: lixiviado; digestión anaeróbica; residuos sólidos domiciliarios; residuos biodegradables.

INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos urbanos (RSU), si no son eliminados en forma apropiada, constituyen fuentes seguras de contaminación.

En la mayoría de los municipios de la Provincia de Misiones, la disposición final de los residuos sólidos domiciliarios (RSD) generados, aún se realiza a cielo abierto, con las consecuencias ambientales que ello involucra: contaminación de aguas superficiales y subterráneas por los lixiviados producidos que llegan a ellas, del aire como consecuencia de la quema de los mismos y del suelo por la acción de los percolados infiltrados.

Asimismo, dichos basurales constituyen ambientes propicios para la proliferación de vectores y roedores, involucrando el conjunto de efectos negativos, un grave peligro para la salud de la población.

Las técnicas más comunes de disposición final de los residuos sólidos urbanos son las siguientes: compostaje, incineración y relleno sanitario. De las tres mencionadas y de acuerdo con los estudios realizados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), el relleno sanitario es el más utilizado en América Latina y el Caribe por las ventajas que presenta frente a los otros métodos (1).

Sobre la base de la información señalada, en un estudio realizado acerca de la situación de la disposición de los RSU de la ciudad de Posadas que fuera encomendado por la OPS, se sugirió la técnica del relleno sanitario como la disposición más adecuada para los mismos.

El objetivo del presente trabajo es determinar las características del lixiviado producido por la descomposición de la fracción orgánica de los residuos sólidos domiciliarios, en condiciones anaeróbicas; como etapa previa para el análisis y adopción del tratamiento más adecuado para su estabilización; analizar el patrón de variación de los principales contaminantes en función del

tiempo y contribuir a seleccionar los parámetros más representativos para la elaboración de un plan de monitoreo de dichos líquidos en las condiciones de desarrollo del trabajo.

Con el fin de cumplir dicho objetivo se instaló un reactor discontinuo a escala piloto de 69 litros, teniendo en cuenta que un relleno sanitario puede ser convenientemente descrito mediante un ensayo de fermentación anaeróbica de tipo batch, en el que las variables involucradas se van modificando con el tiempo hasta que sea alcanzado el estado estacionario (2).

MATERIALES Y MÉTODOS

La operación se inició el 18/4/95 y concluyó el 2/7/96, totalizando 434 días.

Para llevar a cabo la experiencia de fermentación biológica de residuos sólidos domiciliarios, se utilizó como sustrato una muestra extraída de la Base Operativa Zaimán (Estación Provisoria de Transferencia de Residuos) de la Municipalidad de la ciudad de Posadas. La muestra representativa del total de los residuos depositados en el lugar, fue obtenida siguiendo la técnica descrita por Tchobanoglous (3); para ello se seleccionaron en forma aleatoria tres camiones volcadores con Residuos Sólidos Urbanos de diferentes zonas de la ciudad, la cantidad separada de cada uno de ellos fue alrededor de 100 Kg., por lo cual la muestra inicial consistió en aproximadamente 300 Kg., se procedió a romper las bolsas y mezclar los contenidos sobre una lámina de polietileno (área de trabajo), luego mediante cuarteos sucesivos se logró una muestra de 99 Kg. la cual fue trasladada al Laboratorio del Programa Efluentes Industriales y Urbanos (PEIU) de la FCEQyN.

Se efectuó una clasificación de los componentes contenidos en los residuos y se determinó el porcentaje en peso de cada uno, los que figuran en Tabla N° 1.

Tabla N° 1: Composición porcentual de la Basura

Fracción	% (base seca)
Orgánica	82,93
Papeles	2,69
Plásticos	4,08
Pañales	5,75
Metales varios	1,12
Vidrios	1,27
Maderas	0,16
Piedras	0,49
Cueros y gomas	0,05
Huesos	1,32
Trapos	0,14

Se separó la fracción orgánica, con un peso de 33 Kg. resultante de la operación anterior, compuesta principalmente de restos de alimentos y follaje. Dicho material fue desmenuzado en trozos de 50 mm. aproximadamente -empleando una barra provista de un sistema de cuchillas en su parte inferior- y nuevamente a través de cuarteos adicionales se extrajo 300 gr. de muestra para los análisis fisicoquímicos y el resto fue inoculado con efluente generado por un biodigestor rural que opera con estiércol vacuno, situado en la loca-

lidad de Candelaria, Provincia de Misiones, con el propósito de asegurar un desarrollo satisfactorio del proceso de digestión [4, 5]. La mezcla de ambos materiales se efectuó en una proporción en peso de 3:1 (residuos sólidos: efluente biodigestor); relación generalmente utilizada en ensayos anaeróbicos de producción de biogas a partir de residuos sólidos (5). La caracterización fisicoquímica de los residuos orgánicos, del inóculo y de la mezcla de ambos que constituyó la carga inicial del digestor, se presenta en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2: Características fisicoquímicas de los residuos orgánicos, inóculo y mezcla de ambos

Parámetros	Inóculo	Basura	Mezcla
pH (u pH)	6,27	4,57	5,14
Humedad relativa a 60°C (%)	92,27	22,21	22,21
Humedad a 100°C (%)	92,53	53,51	55,24
Sólidos Totales (%)	6,08	59,76	70,61
Sólidos T. Fijos (%)	1,87	13,79	16,89
Sólidos T. Volátiles (%)	4,21	45,97	53,72
Sólidos Suspendidos Volátiles (%)	0,021	—	—
Sólidos Suspendidos Fijos (%)	0,05	—	—
Demanda Química de Oxígeno (mg O ₂ /g)	903,24	963,49	1023,21
Carbono Orgánico Total (%)	38,24	42,68	42,15
Carbono Orgánico Fácilmente Degradable (%)	31,58	36,14	38,38
Carbono Orgánico Resistente a la Degradación (%)	6,66	6,54	3,77
Materia Org. Total (%)	68,91	76,88	75,98
Materia Org. Fácilmente Degradable (%)	64,09	65,05	69,08
Materia Org. Resistente a la Degradación (%)	4,82	11,82	6,87
N.T.K. (%)	1,87	2,04	2,18
N-Orgánico (%)	1,85	1,74	1,86
N-Amoniacal (%)	0,026	0,300	0,323
Fósforo Total (%)	1,52	2,15	2,96
C/N	20,45	20,92	19,33
C/P	25,15	19,85	14,24
Peso Específico (g/cm ³)	1,023	—	—

Se empleó una columna de PVC de 2,25 m de altura y 0,20 m de diámetro interior, cerrada en ambos extremos, provista de válvula para extracción de lixiviado en la parte inferior; válvulas para entrada de agua de lluvia, agregado de solución de álcali y salida de gases en el extremo superior. En un punto intermedio del cuerpo del reactor se instaló un termómetro encamisado para medición de temperatura de la masa contenida en el reactor.

Todo el equipo fue aislado con membrana de espuma de polietileno de 5 mm dispuesta en dos capas y membrana de fibra de vidrio de 40 mm de espesor, con el fin de proteger al sistema de posibles variaciones bruscas de la temperatura ambiente.

El agua de lluvia, almacenada en un tanque calefaccionado eléctricamente y con termostato, fue incorporada al reactor por gravedad en cantidades equivalentes a las precipitaciones pluviales, que fueron registradas durante el período de estudio por el Servicio Meteorológico Nacional - Aeropuerto Posadas.

Se instaló un sistema para captación y medición de los gases que pudieran generarse durante el proceso, consistente en la medición del volumen de líquido por desplazamiento de los gases, conjuntamente con un manómetro de rama abierta para las medidas de presión.

El material sólido fue cargado al reactor en forma manual por el extremo superior, lográndose el grado de compactación por simple acción de la gravedad. El valor del peso específico alcanzado, resultó ser consistente con valores similares informados por otros investigadores (6).

Las condiciones iniciales de operación del reactor, son las que se presentan en la Tabla N° 3.

Una vez concluida la operación de carga, se procedió al cierre de la columna y a los 2 (dos) días de la puesta en marcha, se abrió parcialmente la válvula de extracción de lixiviado para eliminar los primeros líquidos producidos (fase aeróbica de

la digestión). Se mantuvo en esa condición hasta que el valor del pH presentó una pequeña tendencia a aumentar y la concentración de ácidos volátiles a disminuir.

ORIGEN DE LOS DATOS Y CONTROL DEL PROCESO

Durante el período de estudio se realizaron controles de diversos parámetros del sistema. Las variables controladas diariamente fueron la temperatura interna del reactor y la temperatura ambiente, mientras que semanalmente se midieron conductividad y pH sobre muestras de lixiviado y con una frecuencia mensual se procedió a la caracterización fisicoquímica del mismo. Los parámetros analizados fueron: DBO₅, DQO, Sólidos Totales, Sólidos Totales Fijos y Volátiles, Nitrógeno Total Kjeldahl, Nitrógeno Orgánico y Ammoniacal, Ácidos Orgánicos Volátiles, Alcalinidad, Conductividad y pH.

Al mismo tiempo fueron registradas las precipitaciones pluviales ocurridas, según informaciones del Servicio Meteorológico Nacional, Estación Aeropuerto de la ciudad de Posadas.

Periódicamente, se efectuó el aforo de lixiviados, empleándose el método volumétrico para su cuantificación, mediante apertura de la válvula de salida de los mismos.

Las técnicas empleadas para las distintas determinaciones son las que se describen a continuación.

Las temperaturas del ambiente y del reactor fueron medidas con sendos termómetros de mercurio.

Tanto el pH como la conductividad de las muestras de lixiviados fueron determinadas en forma inmediata a la extracción de las mismas, mediante un peachímetro y un conductímetro respectivamente, este último provisto de celda de conductividad del tipo electrodo de níquel plati-

Tabla N° 3: Datos de operación del reactor

Masa total de residuos más inóculo (gr)	42.700
Humedad a 105°C (%)	55,24
Altura ocupada por los residuos (cm)	184
Volumen de la columna (cm ³)	69.000
Peso específico de los desechos inoculados (gr/l)	712

no, efectuándose las correcciones cuando la temperatura difería de 25°C, según se describe en el Manual de Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales (7).

Los demás parámetros DBO₅, DQO, Sólidos Totales, Sólidos Totales Fijos y Volátiles; Nitrógeno Total Kjeldahl, Nitrógeno Orgánico y Amomiacal; Ácidos Orgánicos Volátiles; Alcalinidad y Fósforo Total, fueron analizados aplicando las técnicas descriptas en el Manual indicado en el párrafo anterior (7).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un Test de Correlación, entre los parámetros determinados, utilizando el programa Estadístico STATGRAPHICS Plus, 1993 [8].

Las variables correlacionadas fueron: Demanda Bioquímica de Oxígeno, Demanda Química de Oxígeno, Sólidos Totales, Sólidos Totales Fijos, Ácidos Orgánicos Volátiles y pH.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El caso en estudio es un proceso de descomposición anaeróbica con sólidos en alta concentración, por lo que la influencia ejercida por los parámetros ambientales sobre el mantenimiento del equilibrio adecuado de la población microbiana involucrada en la generación de biogas, es mucho mayor que durante el proceso con sólidos en baja concentración [3].

Esto justifica los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el que el proceso de descom-

posición de los residuos sólidos ha sido lento, no superándose las primeras fases del desarrollo de la degradación biológica, evidenciada por los bajos valores de pH del lixiviado y la presencia de trazas de metano en la composición de los gases producidos, detectadas por el método de Cromatografía Gaseosa-Espectrometría de Masas Modo SIM y, cualitativamente, por sus características organolépticas.

Con relación a las características del lixiviado generado y de acuerdo con los valores obtenidos de los parámetros seleccionados, se observa que concuerdan de manera general con los que figuran en la literatura especializada [2, 4, 9].

El pH, uno de los factores esenciales de la fermentación anaeróbica, registró los valores que se grafican en la Figura N° 1; fluctuó entre 4,30 y 6,00, mientras que en la etapa final el valor de 5,26 muestra una leve tendencia a disminuir. No se ha observado, por consiguiente, el valor indicativo del inicio de la fase metanogénica, superior a 6,5 [3, 4, 10].

En la Figura N° 2 se indican los valores de DBO₅, DQO y la relación DBO₅/DQO, en función del tiempo. Como puede apreciarse, la DBO₅ y la DQO alcanzan altos valores de: 90.000 mg/lit y 98.060 mg/lit respectivamente, correspondiendo a una elevada carga orgánica del lixiviado, para luego presentar una tendencia a decrecer con el transcurso del tiempo.

La razón DBO₅/DQO, indicativa del carácter orgánico de un lixiviado, al inicio de la experiencia fue de 0,9, (correspondiendo a una alta biodegradabilidad de la materia orgánica) decre-

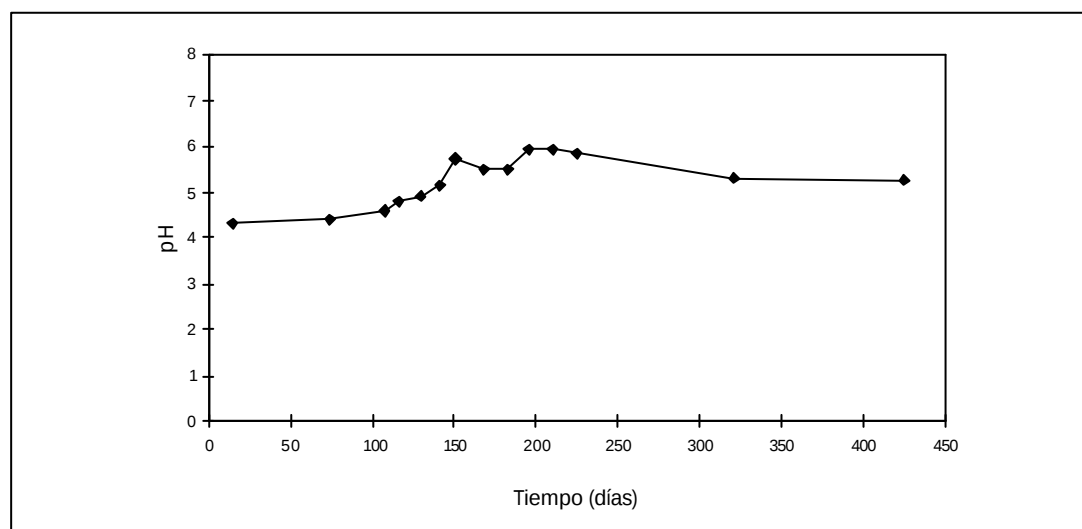


FIGURA N° 1: Evolución del pH en función del tiempo.

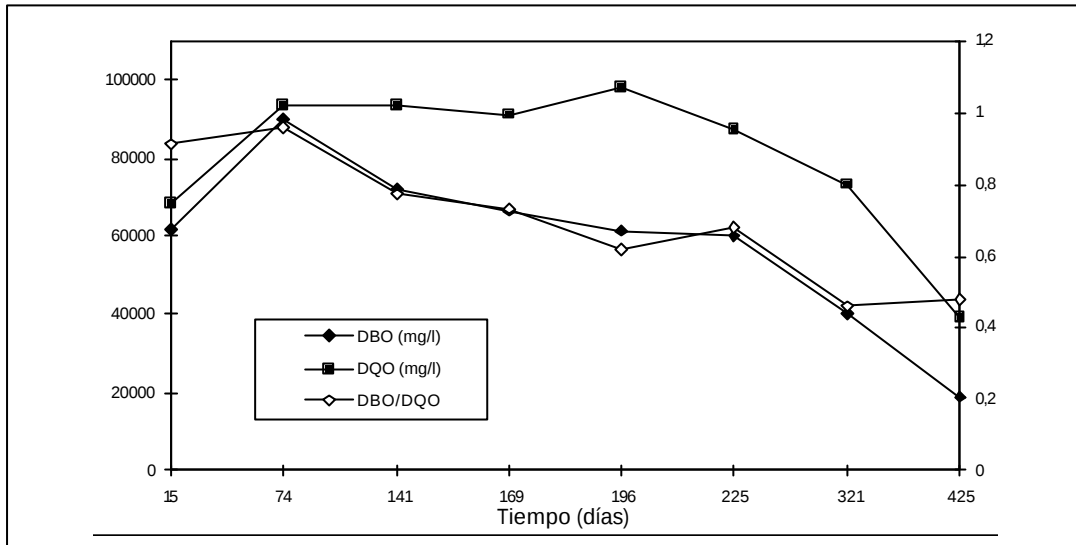


FIGURA N° 2 Evolución de DBO5, DQO y razón DBO5/DQO en función del tiempo.

ciendo posteriormente con el tiempo hasta un valor de 0,48 al finalizar los ensayos (característica de un lixiviado de biodegradabilidad media) [9].

Los valores mencionados concuerdan con los resultados encontrados para lixiviados y percolados de rellenos sanitarios y de ensayos de producción de biogas a escala laboratorio [2, 9].

En la Figura N° 3, se representan los datos de Sólidos Totales, Sólidos Totales Fijos y Volátiles obtenidos en la experiencia.

Los mayores valores, se registraron a los 108 días de iniciada la experiencia, (72.160 mg/l para ST; 22.220 mg/l y 49.940 mg/l para STF y STV respectivamente); disminuyendo con el transcurso del tiempo hasta alcanzar los valores mínimos,

de 15.944 mg/l (ST); 5.948 mg/l (STF) y 9.996 mg/l (STV) al final del ensayo.

Los valores de alcalinidad presentaron su máximo valor de 10.153 mg/l a los 196 días, coincidente con el máximo valor del pH observado en la Figura N° 1, para luego disminuir con el tiempo hasta la finalización de los estudios; como puede apreciarse en la Figura N° 4.

En concordancia con esta tendencia decreciente de los valores de alcalinidad, se ha verificado igual comportamiento para los valores de pH, lo que podría indicar que el tenor de alcalinidad fue insuficiente para evitar que aquéllos decayeran, impidiendo alcanzar los niveles mínimos necesarios para iniciar la etapa metanogénica.

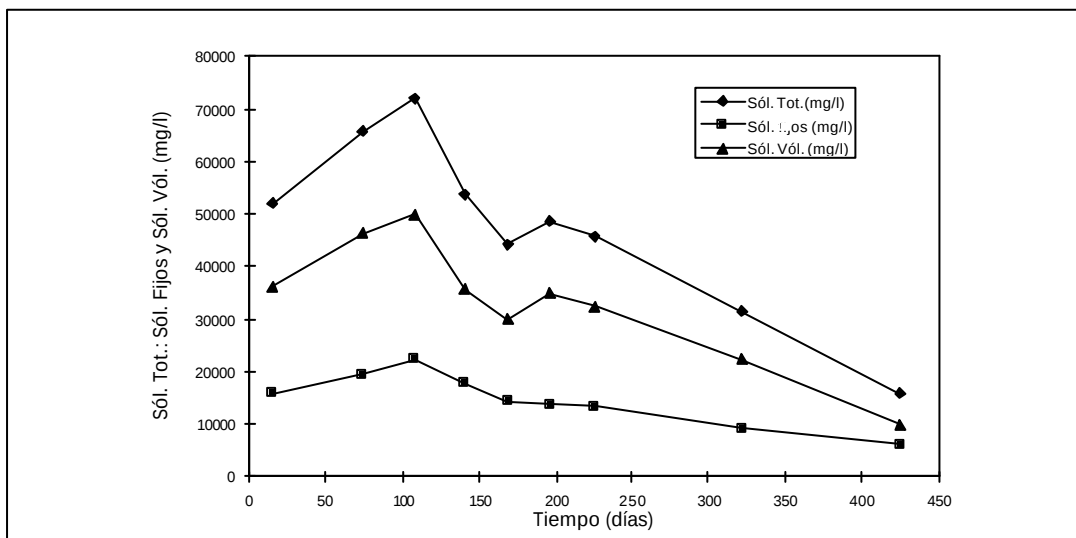


FIGURA N° 3 Evolución de Sólidos Totales; Sólidos Totales Fijos y Sólidos Totales Volátiles en función del tiempo.

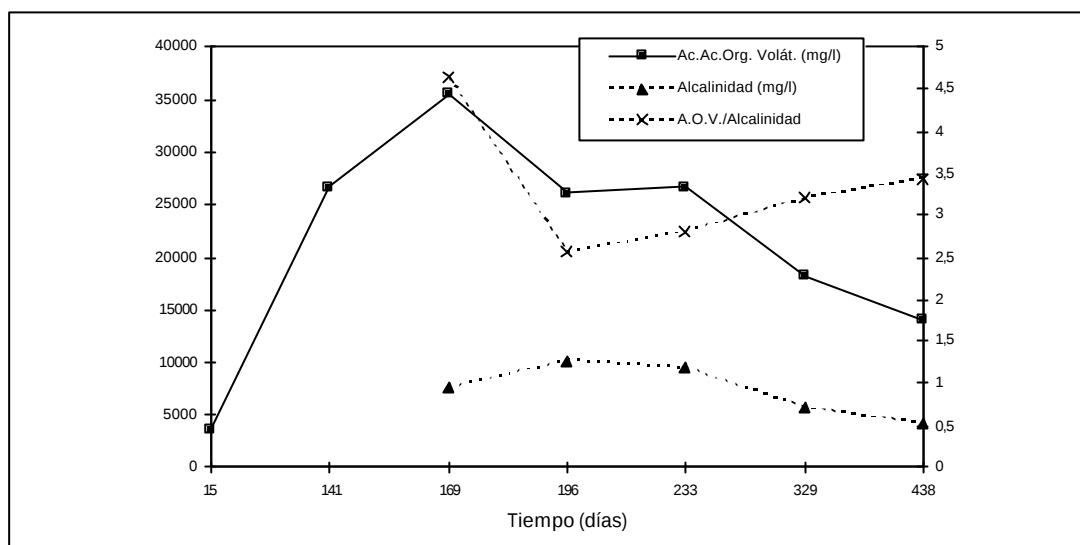


FIGURA N° 4: Evolución de la alcalinidad, del contenido de Ácidos Orgánicos Volátiles y la razón Ácidos Orgánicos Volátiles/Alcalinidad en función del tiempo.

Los valores de Ácidos Orgánicos Volátiles y de la razón Ácidos Orgánicos Volátiles/Alcalinidad en función del tiempo, también se grafican en la Figura N° 4.

Como puede observarse, el mayor valor alcanzado fue de 35.652 mg/l a los 169 días de iniciados los ensayos, mostrando posteriormente una tendencia a disminuir.

Para la relación de ácidos orgánicos volátiles/alcalinidad se obtuvieron valores que varían en el rango de 4,65 a los 169 días de la digestión y 2,57 a los 196 días, siendo éste el mínimo obtenido; incrementándose a 3,43 al finalizar los ensayos.

Ehrig, H.J. [2] menciona que la fase meta-nogénica se inicia con una relación ácido acético/

alcalinidad $\geq 0,8$ de acuerdo con mediciones efectuadas en rellenos sanitarios en operación, correspondiéndose con aumento de los valores de pH a partir del mencionado valor.

En la Figura N° 5, se presenta la evolución de NTK; N-NH₄ y N-Orgánico en función del tiempo, donde se observan valores máximos de 2.198 mg/l para NTK y 1.414 mg/l para N-Orgánico a los 141 días de la puesta en marcha del digestor con posterior disminución de los mismos.

En cambio para N-NH₄ se observa un máximo de 889 mg/l a los 329 días de operación, período en que coincidentemente se verifica leve disminución del pH.

En la Figura N° 6, se representan los valores de

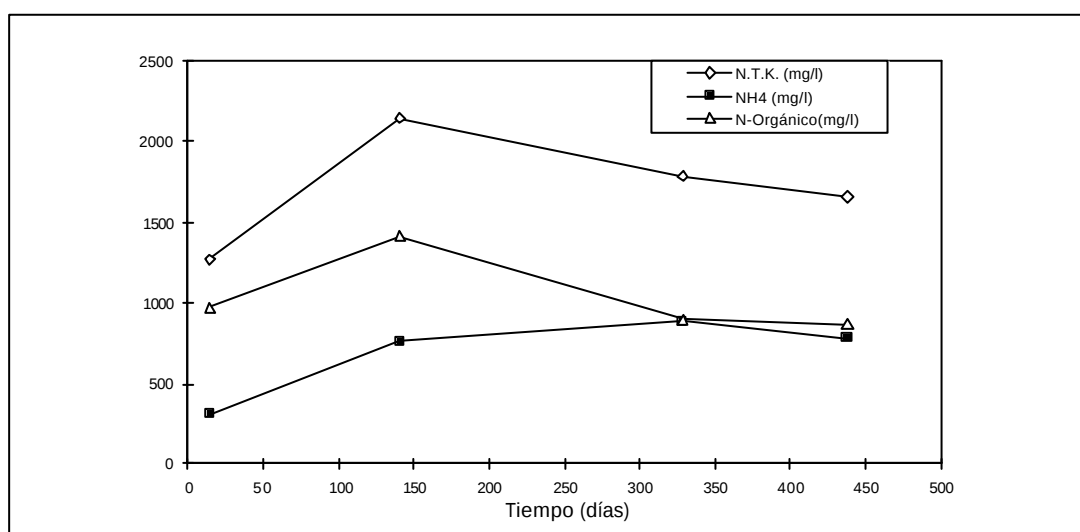


FIGURA N° 5: Evolución del contenido de Nitrógeno Total Kjeldahl, Nitrógeno amoniacal y Nitrógeno orgánico en función del tiempo.

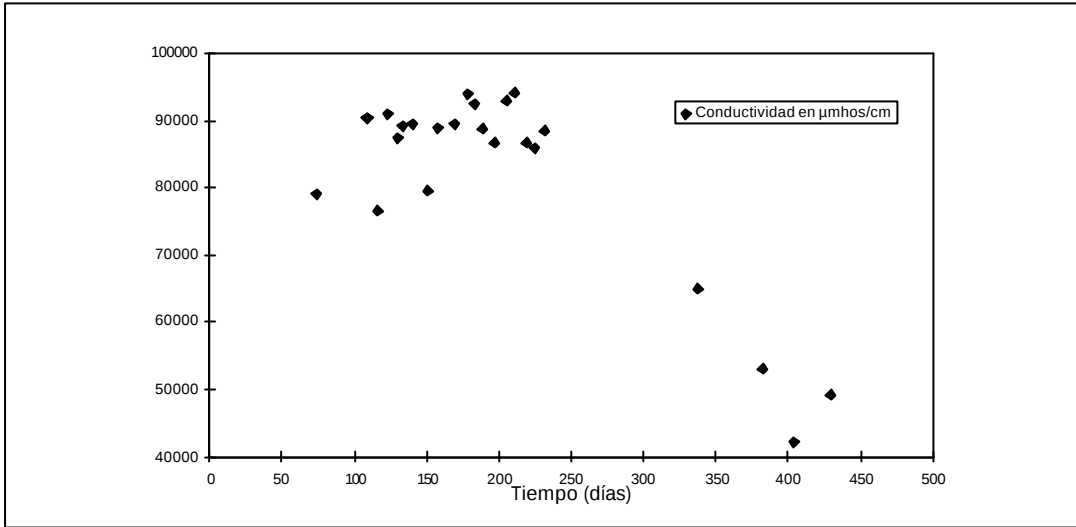


FIGURA N° 6: Evolución de la conductividad en función del tiempo.

conductividad -corregida a 25°C- y su evolución en el tiempo y en la Figura N° 7, los valores registrados de las temperaturas del digestor y del ambiente.

Puede observarse que la temperatura del reactor sólo alcanzó valores $\geq 30^\circ\text{C}$, el 5,3% de los valores totales medidos, notándose que en ningún caso se registró una temperatura de 35°C correspondiente al valor óptimo para la obtención de biogas en un proceso de digestión anaeróbica (2, 10).

ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE ALGUNOS PARÁMETROS

A partir de los datos obtenidos para los parámetros determinados sobre muestras de lixivia-

dos, en el período considerado, se realizó un análisis de posibles correlaciones entre los mismos.

Los parámetros correlacionados fueron: Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5), Demanda Química de Oxígeno (DQO), Sólidos Totales (ST), Sólidos Fijos Totales (SFT), Ácidos Orgánicos Volátiles (AOV) y pH. Los valores de dichos parámetros figuran en la Tabla N° 4.

En la Tabla N° 5 se transcribe la matriz de coeficientes de correlación calculada para un nivel de significación del 95% de confianza.

De la matriz se deduce que existe correlación significativa ($P < 0.05$) entre DBO_5 , DQO, Sólidos Totales y Sólidos Totales Fijos, no exhibiendo correlación con el contenido de Ácidos Orgánicos Volátiles ni con los valores de pH.

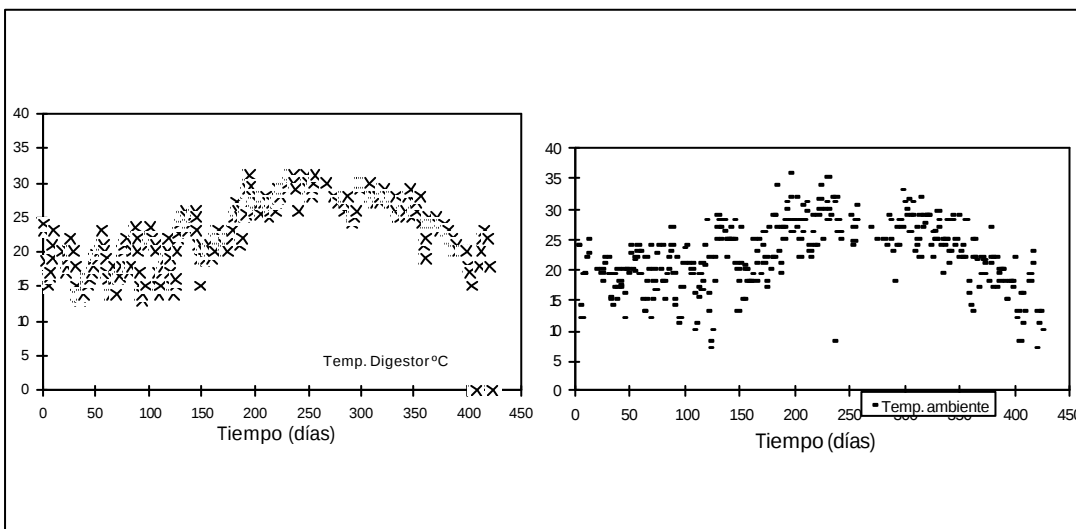


FIGURA N° 7: Evolución de las temperaturas del digestor y del ambiente en función del tiempo.

Tabla N° 4					
DBO ₅ (mg/l)	DQO (mg/l)	Sólidos Totales (mg/l)	Sólidos Fijos Totales (mg/l)	Acidos Orgánicos Volátiles (mg/l)	PH (u pH)
62000	68417	52026	15718	3666	4.31
72316	93600	53780	17870	26742	5.13
66492	91200	44157	14341	35652	5.50
61240	98060	48452	13682	26105	5.92
59880	87544	45809	13332	26645	5.86
39962	73206	31408	9067	18190	5.29
18670	39053	15944	5948	14000	5.26

Tabla N° 5: Matriz de correlación entre parámetros de lixiviado de la fracción orgánica de residuos sólidos (*)						
	DBO ₅	DQO	ST	SFT	PH	AOV
DBO ₅	1.0000 (0.0000)	0.8761 (0.0097)	0.9693 (0.0003)	0.9689 (0.0003)	0.0122 (0.9792)	0.4301 (0.3355)
DQO		1.0000 (0.0000)	0.8109 (0.0269)	0.7572 (0.0487)	0.4318 (0.3333)	0.6861 (0.0888)
ST			1.0000 (0.0000)	0.9709 (0.0003)	-0.0953 (0.8389)	0.2279 (0.6231)
SFT				1.0000 (0.0000)	-0.1751 (0.7073)	0.2621 (0.5702)
pH					1.0000 (0.0000)	0.7556 (0.0495)
AOV						1.0000 (0.0000)

(*) Los números entre paréntesis corresponden a los niveles de significación; mientras que los otros a los coeficientes de correlación.

Por otro lado el tenor de Ácidos Orgánicos Volátiles y los valores de pH presentan correlación significativa ($P < 0.05$) únicamente entre ambos.

CONCLUSIONES

El estudio realizado permite arribar a las siguientes conclusiones:

Del análisis de correlación efectuado entre los parámetros utilizados para determinar la calidad del lixiviado, puede inferirse que deben ser medidos el pH y el contenido de Ácidos Orgánicos Volátiles juntamente con uno de los siguientes parámetros: DBO₅, DQO, ST o STF, quedando la selección de cualquiera de ellos, sujeta a la disponibilidad de equipos y materiales, a la estandarización de la técnica empleada, como también de los

costos que involucren el desarrollo de la misma.

Posible inhibición de metanogénesis por elevada concentración de Ácidos Orgánicos Volátiles.

El rango de temperaturas del digestor estuvo por debajo de las temperaturas mesofílicas, favorables para alcanzar la etapa metanogénica caracterizada por alto porcentaje de metano en la composición del biogas. •

PETTRI FLORES, M. D.; RETA, M. R.; ACUÑA, M. G.; BARBOZA, O. M.; RUSSO, H. R. / Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por los Ingenieros Químicos: C. Kruzolek en la construcción e instalación del digestor, M. Schmalko en el análisis estadístico de los resultados, y al personal del laboratorio del PEIU en las determinaciones analíticas efectuadas. Se hace mención al aporte de la Fundación Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la UNaM.

REFERENCIAS

1. ZEPEDA, F. El Manejo de Residuos Sólidos Municipales en América Latina y El Caribe. OPS/OMS - División de Salud y Ambiente. Serie Ambiental N° 15. Washington D.C. 1995.
2. EHRIG J. Quality and Quantity of Sanitary Landfill Leachate; Waste Management & Research. I, p. 53-68. 1983.
3. TCHOBANOUGLOUS, G.; THEISEN, H. y VIGIL, S. Gestión Integral de Residuos Sólidos; McGraw-Hill-Interamericana de España S.A. II; p. 755 - 806. 1994.
4. MANSUR AISSE, M. y BOLLMAN, H.A. Estudo do Potencial Energético (Biogás) dos Resíduos Sólidos Urbanos. Relatório Final. Instituto de Saneamento Ambiental. PUCA. Curitiba. PR. Brasil. Agosto 1987.
5. SCHMIDELL, W.; CRAVEIRO, A. M.; SCHVARTZ PERES, C.; et al. Digestão Anaeróbica de Resíduos Sólidos Urbanos. Escola Politécnica da U.S.P. Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. São Paulo, SP. Brasil. 1986.
6. CHLEBNICEK T.; SANCHÁ, A. M.; CASTILLO, G. et al. Líquidos Percolados de Rellenos Sanitarios Simulados. Informe Preliminar. XV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria. Buenos Aires, Argentina. 1976.
7. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales. Ed. Díaz de Santos S.A., Madrid, España. 1992.
8. STATGRAPHICS PLUS (VERSIÓN 7 FOR DOS). STATGRAPHICS User Manual. Manugistics, Inc. Rockville, Maryland. U.S.A. 1993.
9. ARELLANO J.; ALEGRÍA O. X. y RIHM S. A. Estudio de Generación y Manejo de Líquido Percolado Aplicado a una celda tipo del relleno

sanitario Lo Errazuriz en Santiago de Chile. XXIV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Buenos Aires, Argentina. 1994.

10. TAIGANIDES, E. P. BIOGAS, recuperación de energía de los excrementos animales. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Montevideo, Uruguay. 1980.



EL EXTRACTO ACUOSO COMO UNA MEDIDA DEL CONTENIDO DE PALOS EN LA YERBA MATE

Escalada, M. A. / Schmalko, M. E. / Känzig, R. G.

WATER EXTRACT AS A MEASURE OF TWIG CONTENT IN YERBA MATE

ABSTRACT

Water extract was determined in leaves and twigs of yerba mate (*Ilex paraguariensis* saint hilaire) in order to look for differences between them and to find correlation between this variable and leaves content.

AOAC method with certain modification was used as analytical technique.

Eight samples from different places in the Province of Misiones (Argentina) and with different degrees of seasoning were employed.

High differences between water extract in leaves and twigs were found. A linear equation of first order was fitted, but this equation can not be used as an unique technique to estimate twig content because confidence limits of the estimation are relatively high ($\pm 4.62\%$ to estimate water extract and ± 0.135 to estimate twig fraction).

KEY WORDS: water extract, yerba mate, twig content.

RESUMEN

Se realizaron determinaciones de extracto acuoso en hojas y palos de yerba mate (*Ilex paraguariensis* saint hilaire) con el objeto de conocer si existen diferencias entre los mismos y buscar una relación entre esta variable y el contenido de hojas.

La técnica de análisis utilizada para la determinación del extracto acuoso fue la de la AOAC con ciertas modificaciones.

Se realizaron determinaciones en 8 muestras provenientes de diferentes puntos de la Provincia de Misiones (Argentina), y con diferentes grados de estacionamiento.

Se encontró que existen grandes diferencias de valores de extracto acuoso en las hojas y los palos y que existe una relación dada por una ecuación lineal de primer orden. Sin embargo esta ecuación no puede ser utilizada como único método para estimar el contenido de palos debido a los relativamente elevados límites de confianza de la estimación ($\pm 4,62\%$ para estimar el extracto acuoso y $\pm 0,135$ para estimar la fracción de palos).

PALABRAS CLAVES: extracto acuoso, yerba mate, contenido de palos.

INTRODUCCIÓN

Los parámetros de calidad de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* saint hilaire), se pueden dividir en cuatro aspectos [1]:

- a) Genuinidad del producto.
- b) Aptitud microbiológica y toxicológica.
- c) Composición físico-química.
- d) Calidad organoléptica.

En los países del MERCOSUR, los análisis que requieren sus códigos alimentarios, respecto a la composición físico-química, son los siguientes: contenido de cafeína, cenizas, extracto acuoso, fibra bruta, humedad y contenido de palos [2, 3, 4].

Este último análisis (contenido de palos), se realiza comúnmente por la técnica de zarandeo. Un problema común es la adición exagerada de palo molido, que no puede detectarse con esta técnica. Se está discutiendo hace varios años, establecer valores máximos de fibra bruta para corregir esta adulteración [1]. Pero la técnica de determinación de fibra bruta es dificultosa y consta de varias etapas, lo que hace que el error de determinación sea muy elevado. Además cuando se necesita realizar un control en serie se requieren equipos muy costosos.

Por otra parte, se encontró que el contenido de humedad de equilibrio de la yerba mate era muy diferente en las hojas y en los palos y por lo tanto era de esperar que el contenido de compuestos solubles en agua en los dos materiales fueran diferentes [5, 6].

Es objetivo del presente trabajo determinar el extracto acuoso en hojas y palos de yerba mate y buscar una relación entre el mismo y el contenido de palos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

El proceso de elaboración de la yerba mate, comprende cinco etapas: 1) el sapecado, que consiste en un tratamiento térmico con gases de combustión de madera a 300-400°C durante 2 a 5 min., con el fin de inactivar enzimas que podrían provocar el pardeamiento de la hoja en las etapas posteriores; 2) el secado, a 80-120°C y de 1 a 5 horas, para obtener un producto con contenido de humedad del 3-5%; 3) el canchado o molienda gruesa; 4) el estacionamiento, que se puede realizar en forma acelera-

da en cámaras (aproximadamente 30 días) o en forma natural (hasta 1 año) y 5) la molienda.

Para el presente trabajo se utilizaron muestras seleccionadas antes y después de la etapa 4, es decir estacionada y sin estacionar, todas provenientes de diferentes molinos de la Provincia de Misiones.

Se separaron en forma manual las hojas de los palos y se molieron en un molino de cuchillas con tamiz de abertura 1.5 mm.

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD

El contenido de humedad se determina por el método de la pesada constante en estufa de vacío a 80°C y aproximadamente 10 mm. de Hg durante 5 hs [7].

DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Se utilizó el método de la A.O.A.C. para el extracto acuoso en té, con modificaciones [8, 9].

Se pesan 2 gr. de la muestra y se agregan 200 ml. de agua destilada. Se hierve a reflujo durante 1 h. Se filtra utilizando un filtro seco y se transfiere el total del filtrado a un cristizador previamente pesado. Se evapora en estufa a 100°C hasta sequedad (aproximadamente 24 hs). Se enfría y se pesa. El porcentaje se refiere a peso seco.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico utilizando el programa STATGRAPHICS Plus, 1993 [10]. Se utilizó un análisis de regresión lineal, con varios valores de la variable dependiente (Extracto Acuoso) para cada valor de la variable independiente (% de hojas). También se utilizó el test de las diferencias para comparar las muestras estacionadas y sin estacionar [11].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXTRACTO ACUOSO EN HOJAS Y PALOS

Se realizaron las determinaciones para 8 muestras en hojas y palos por separado y por triplicado. En cada caso se consideró una muestra de yerba sin estacionar (Nº 1-3-5-7) y la correspondiente estacionada de cada una de ellas (Nº 2-4-6-8).

En la Tabla 1 se dan los valores medios y el

error *standard* para hojas y palos en las diferentes muestras.

Como se puede observar, los valores de extracto acuoso difieren en forma apreciable en las hojas y los palos. Comparando éstos con un Análisis de Varianza, se encuentra un valor de $p < 10^{-5}$. Además se pueden considerar relativamente bajos los valores de la desviación *standard* al considerar las diferentes muestras.

COMPARACIÓN DE LAS MUESTRAS ESTACIONADAS Y SIN ESTACIONAR

Con el objeto de saber si existen diferencias entre los valores de extracto acuoso entre muestras estacionadas y sin estacionar (por ejemplo: entre 1 y 2), se realizó el denominado Test de las Diferencias, encontrándose que no existen diferencias en el extracto acuoso entre los dos tipos de muestras ($p < 0,19$).

EXTRACTO ACUOSO PARA DIFERENTES MEZCLAS DE HOJAS Y PALOS

Se prepararon mezclas con diferentes proporciones de hojas y palos con el objeto de determinar el extracto acuoso. Para cada una de las muestras se prepararon tres mezclas, que correspondieron a las fracciones en peso de hojas de 0,75; 0,5 y 0,25 y las determinaciones de extracto acuoso se realizaron por triplicado.

En la Figura 1, que se representa como ejemplo,

se puede observar la recta de regresión que se obtuvo con la Muestra 1. En la misma se consideraron los puntos para las fracciones en peso de hojas igual a 1; 0 (palos) y las mezclas citadas anteriormente (0,75; 0,5; 0,25).

Se puede observar que existe muy buen ajuste entre las dos variables ($p < 10^{-5}$). La recta de regresión para este caso resultó:

$$Y = 22,16 + 21,25 X \quad (1)$$

Siendo:
Y= valor de extracto acuoso % base seca.
X= fracción en peso de hojas.

Quando se consideran todos los datos obtenidos (muestras 1 a 8), se obtiene la siguiente ecuación por regresión lineal:

$$Y = 20,96 + 20,79X \quad (p < 10^{-5}) \quad (2)$$

Con el objeto de poder utilizar esta ecuación para estimar el extracto acuoso a partir de la fracción de hojas, se determinaron los límites de confianza al 95% (LC) de la recta de regresión:

$$LC \text{ ? } Y \text{ ? } t^{0,05} \sqrt{s_{yx}^2 \text{ ? } \frac{1}{N} \text{ ? } \frac{(X \text{ ? } \bar{X})^2}{\sum x^2}} \quad (3)$$

TABLA 1: Valor Medio de Extracto Acuoso (% base seca) ± Desviación <i>Standard</i> (DS) para hojas y palos		
Muestra	Hojas (valores medios ± DS)	Palos (valores medios ± DS)
1	44,29 ± 0,26	22,72 ± 0,77
2	41,21 ± 0,04	20,16 ± 1,10
3	42,44 ± 1,53	19,14 ± 1,34
4	41,42 ± 0,66	21,46 ± 0,25
5	42,55 ± 0,67	23,19 ± 0,80
6	40,39 ± 0,04	19,16 ± 0,38
7	41,21 ± 0,17	21,56 ± 0,40
8	42,85 ± 0,76	21,50 ± 0,57
Valores medios de E.A.	42,05	21,11
Valores medios de DS	1,23	1,51

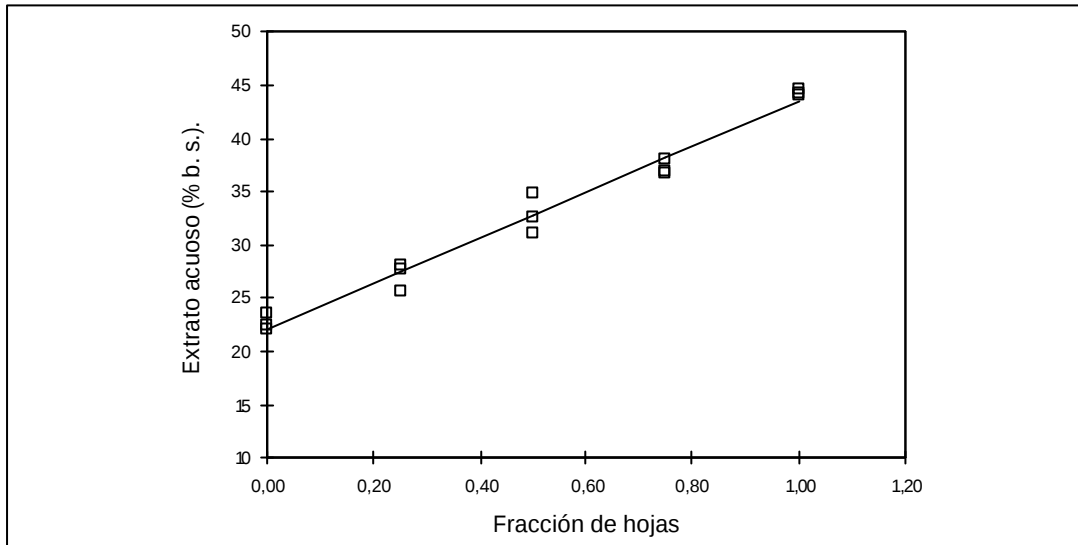


FIGURA 1: Recta de regresión de extracto acuoso (% b.s.) en función de la fracción de hojas de yerba mate para la muestra 1, de acuerdo con la ecuación $Y=22,16+21,25 X$.

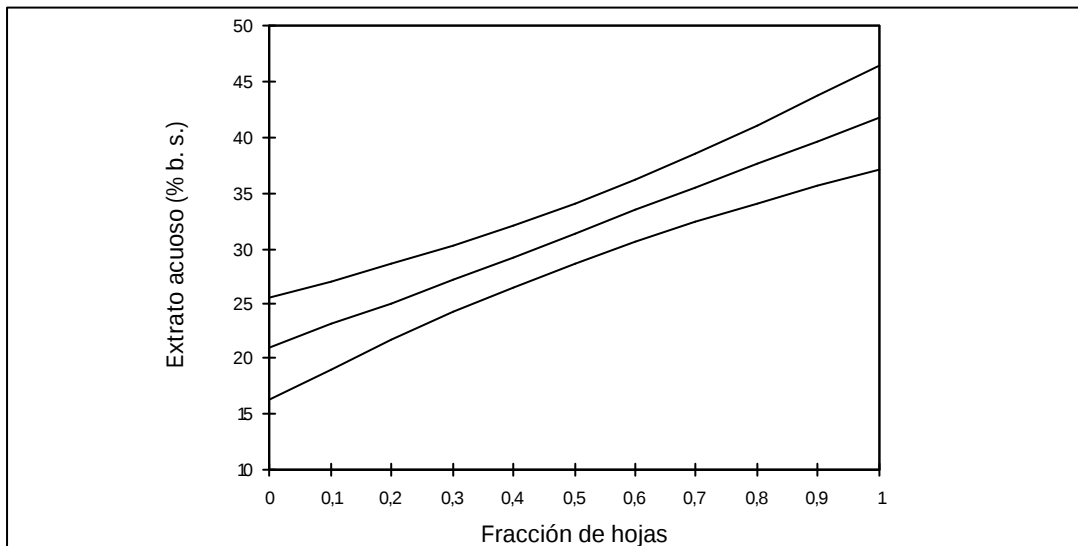


FIGURA 2: Recta de regresión y límites de confianza de extracto acuoso (% b.s.) en función de la fracción de hojas para todas las muestras, de acuerdo con la ecuación: $Y=20,96+20,79 X$.

siendo:

S^2_{yx} = Suma de cuadrados residual = 217,44

N = Número total de datos = 120

$t_{0,05}$ = Valor crítico de la distribución de student = 1,98

$\bar{X}$ = Valor medio de $X = 0,5$

$\sum x^2 = \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 = 15$

De acuerdo con esta ecuación los valores mínimos de los límites de confianza (para $X=0,5$) serían de $Y \pm 2,67\%$ y los máximos (para $X=0$ y 1) de $Y \pm 4,62\%$. Si se utiliza esta ecuación para estimar la fracción de palos a partir del extracto acuoso se tendrían errores de determinación de $\pm 0,135$. Esta alta dispersión de los valores se debería principal-

mente a la variabilidad que presenta la materia prima por sus diferentes orígenes. De aquí que este método no puede ser utilizado como un único método para estimar la fracción de palos de una materia prima de origen desconocido.

CONCLUSIONES

Se realizaron determinaciones de extracto acuoso en hojas y palos de yerba mate, dando valores promedios de 42,05 y 21,11%, respectivamente, encontrándose diferencias estadísticas significativas.

No se encontraron diferencias cuando se realizaron ambas determinaciones en yerbas estaciona-

das y sin estacionar, provenientes de un mismo establecimiento.

Cuando se intenta explicar la variación del extracto acuoso en función de la fracción de hojas con una línea recta se encuentra un buen ajuste. Sin embargo esta ecuación no puede ser utilizada como único método para estimar el contenido de palos debido a los relativamente elevados límites de confianza de la estimación ($\pm 4,62\%$ para estimar el extracto acuoso y $\pm 0,135$ para estimar la fracción de palos).

ESCALADA, M. A.; SCHMALKO, M. E. Y KÄNZIG, R. G. / Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDEt), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

9. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Precision of test methods. Determination of reproducibility for a standard test methods, by inter-laboratory test. I.S.O. Switzerland. NORMA N° 9768. Extracto acuoso en Té. 1990.
10. STATGRAPHICS PLUS (VERSION 7 FOR DOS) STATGRAPHICS User Manual. Manugistics, Inc. Rockville, Maryland. U.S.A. 1993.
11. AREA, M. C. y SCHMALKO, M. E. Estadística Aplicada. Editorial de la Universidad Nacional de Misiones. P. 19-20. 1996.

REFERENCIAS

1. KÄNZIG, R. G. Erva Mate. Biología e Cultura no cone Sul. Sección: Composição química e controle de qualidade. Pág 257-259. 1995.
2. CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (ACTUALIZADO). Capítulo 15, pág 208-209.
3. NORMA PARAGUAYA-YERBA MATE. Especificaciones. NP 3500093. 1993.
4. LEGISLACAO DE ALIMENTOS Instituto Brasileiro do Meio Abiente e dos Recursos Naturais Renovaveis (IBAMA). Portaria N° 118 (22/11/92).
5. KÄNZIG, R. G.; RETA, M. R. y ALBANI, O. A. Cromatografía en capa delgada del extracto acuoso de la yerba mate (*Ilex Paraguariensis*). Revista de la Secretaría General de Ciencia y Tecnología. Año 3. N° 5. Universidad Nacional de Misiones. p. 3-7. 1987.
6. SCHMALKO, M. E.; RETA, M. R. y KÄNZIG, R. G. Contenido de Humedad de la Yerba Mate. Influencia de diferentes variables. La Alimentación Latinoamericana. Año 21. N° 171. p. 18-21. 1988.
7. A.O.A.C. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, Methods. NORMA N° 920.104. p. 762. 1990.
8. A.O.A.C. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS, Methods. NORMA N° 925.09. p. 777. 1990.



MEMORIA MOLECULAR DE CETOAMINAS PLASMÁTICAS Y HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS PARA INDAGAR EL ESTADO DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO*

*

Trabajo presentado en la 2ª Reunión Latinoamericana de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNRC, Río Cuarto (Córdoba), diciembre de 1996.

Coppo, J. A. / Coppo, N. B.

MOLECULAR MEMORY OF PLASMATIC KETOAMINES AND GLYCATED HAEMOGLOBINS TO INQUIRE THE CARBOHYDRATE METABOLISM STATUS

ABSTRACT

A bibliographical review about the diagnostic utility of glycated haemoglobin (HbA1c) and fructosamine, was made. Haemoglobin and seric proteins can receive a non-enzymatic glycation; so they reflect retrospectively the average glycaemia from the last 2-3 months (HbA1c) or 8-12 days (fructosamine). The obtained values of glycated proteins from various species of healthy animals, as well as normal human samples used as reference, were reported. "Batch" chromatography and nitroblue tetrazolium were the methods used to measure HbA1c and fructosamine, respectively. No statistically significant differences between sexes and ages ($p < 0.05$) have been found.

HbA1c and fructosamine increases in samples from both diabetic human beings and animals, were detected. In hyperglycaemic non-diabetic canines, fructosamine stayed in normal values, but this parameter significantly decreased on a lot of normoglycaemic hypoproteinaemic dogs. The obtained results from both healthy and non-healthy subjects, were compared with the published by other authors, which used the same or different laboratory method. Coincidences and discrepancies are found. The apparent low prevalence rate for canine diabetes mellitus in our region, perhaps attributable to complementary diagnosis failure, was discussed. For the diagnosis improvement, glycated proteins determination is recommended. These parameters are independent to the actual glycaemia and evaluate the carbohydrate metabolism for long term (HbA1c) or moderate term (fructosamine). Moreover, glycated proteins are useful in the animal hypo/hyperglycaemia differential diagnosis.

KEY WORDS: fructosamine, glycated haemoglobin, glycaemia, domestic animals.

Se efectúa una actualización bibliográfica sobre la utilidad diagnóstica de glucoproteína (HbA1c) y fructosamina, proteínas que al glicosilarse en forma no enzimática, reflejan retrospectivamente la glucemia correspondiente a los últimos 2-3

meses y 8-12 días respectivamente. Se narran los valores obtenidos para ambos analitos en animales sanos de distintas especies, así como en personas normales utilizadas como referencia, empleando las técnicas de cromatografía "batch" (HbA1c) y azul nitrotetrazolio (fructosamina). No se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre sexos y edades. Se destacan los incrementos de HbA1c y fructosamina hallados en personas y animales diabéticos. En caninos hiperglucémicos no-diabéticos constatan normalidad en las concentraciones de fructosamina, parámetro que disminuyó significativamente en un grupo de perros normoglucémicos hipoproteinémicos. Se comparan los resultados hallados en sujetos sanos y enfermos, con los reportados por otros autores para la misma o distinta técnica de laboratorio, surgiendo coincidencias y discrepancias. Se discute la aparentemente baja tasa de prevalencia de diabetes mellitus canina en nuestro medio, quizás atribuible a falencias del diagnóstico complementario, aconsejándose el dosaje de proteínas glicosiladas para subsanarlas. Por ser independientes de la glucemia actual, evalúan a largo plazo (HbA1c) o mediano plazo (fructosamina) el metabolismo hidrocarbonado y son útiles en el diagnóstico diferencial de las hipo/hiperglucemias animales.

PALABRAS CLAVE: fructosamina, glucohemoglobina, glucemia, animales domésticos.

INTRODUCCIÓN

LA GLICOSILACIÓN PROTEICA

Cualquier proteína del organismo (hemoglobina, albúmina, colágeno, mielina, elastina, apolipoproteínas, factores de la coagulación, etc.) posee la capacidad de adicionar moléculas de aldosas en forma lenta pero continua; esta glicosilación será tanto más intensa cuanto más elevada y persistente sea la concentración de glucosa en el medio interno [1, 2, 3].

La *Figura 1* ilustra la síntesis de las proteínas glicosiladas, proceso no-enzimático que se inicia cuando el grupo aldehído del monosacárido se une a un grupo epsilon-amino de residuos de lisina o valina de una proteína (reacción de Maillard), produciendo una aldimina inestable (Base de Schiff). Esta última sufre una redistribución (reordenamiento de Amadori), constituyéndose una cetoamina (fructosilamina) estable. Así glicosilada, la proteína "informa" sobre los niveles glucémicos de manera retrospectiva e independiente del valor actual de la aldosa ("memo-

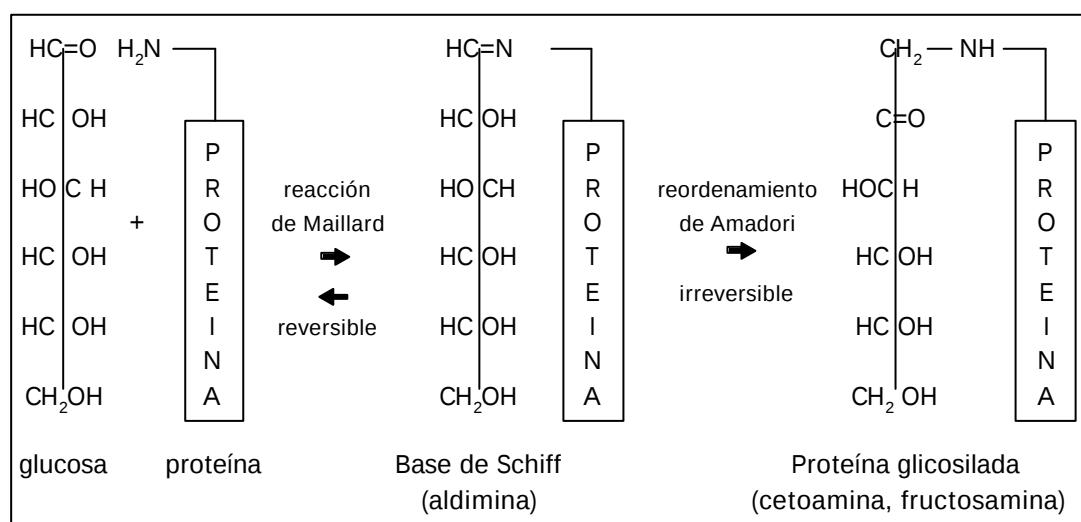


FIGURA 1: Mecanismo de la glicosilación no enzimática de una proteína. La glucosa se fija lentamente a grupos amino libres de una proteína formando aldminas inestables, las que sufren un reordenamiento y se tornan estables.

ria molecular”), con la única limitación que le impone la vida media de la proteína [4, 5].

Las proteínas glicosiladas serían responsables de varias alteraciones propias de la diabetes mellitus y del envejecimiento humano [6], tales como desmielinización, modificación del colágeno intercelular y opacidad del cristalino [7]. Las proteínas séricas sufrirían anomalías funcionales al glicosilarse: las albúminas perderían afinidad por bilirrubina/ácidos grasos, las LDL serían captadas en menor grado por los fibroblastos, el colesterol de HDL disminuiría, la fibrina sería degradada escasamente por la plasmina, decrecerían ciertas inmunoglobulinas y muchas enzimas se inactivarían [2, 8, 9]. La acumulación de proteínas glicosiladas en los tejidos de animales viejos y/o diabéticos produciría complicaciones tales como retinopatías y cataratas [10], y trastornos glomerulares con alteración de la función renal [1, 11, 12].

GLICOSILACIÓN DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina (Hb) es una proteína conjugada formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globina), cada una de las cuales posee un grupo prostético (hem). Este último es idéntico en hombre y animales, residiendo las diferencias en los polipéptidos. La Hb está contenida en los eritrocitos, células donde el pasaje de glucosa es insulino-independiente. En seres humanos la Hb más abundante es la HbA (dos cadenas alfa y dos cadenas beta); las hemoglobinas glicosiladas representan un pequeño porcentaje de la HbA (0.4% de HbA1a, 0.5% de HbA1b y 3-6% de HbA1c) [5,13]. La HbA1c se conoce comúnmente como “hemoglobina glicosilada” o “glucohemoglobina”, aunque algunos prefieren englobar las tres fracciones: HbA1(a+b+c) [5].

La glicosilación de la Hb ocurre en el extremo aminoterminal de las cadenas beta a lo largo de la vida del eritrocito (130 días en el hombre, 140-150 días en equinos y bovinos, 100-120 días en caninos, 35 días en la gallina) [14]. En los perros el único tipo de Hb es “A” ($\alpha_2\beta_2$), donde la secuencia de los últimos cuatro aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena b es idéntica a la del ser humano; el hecho de que los caninos posean HbA1c, sumado a una similar vida media de Hb e idéntica tasa de glucosa sanguínea, implica que su glicosilación responde al mismo mecanismo fisiopatológico y refleja el promedio de la glucemia de los últimos 2-3 meses [10] o las últimas 5-7 semanas [4].

mia de los últimos 2-3 meses [10] o las últimas 5-7 semanas [4].

GLICOSILACIÓN DE LAS SEROPROTEÍNAS

Así como la Hb intraeritrocitaria, las proteínas séricas también pueden glicosilarse. Genéricamente se denomina “fructosamina” al compuesto resultante de la fijación no-enzimática de moléculas de glucosa a grupos amino libres de proteínas plasmáticas, principalmente albúminas. Dado que la magnitud de glicosilación depende de los niveles promedio de glucosa, la fructosamina es una excelente indicadora de hiper o hipoglucemias crónicas en seres humanos [3], caninos [15, 16], felinos [17] y roedores [18]. Su concentración también se afectaría ante hiper e hipoproteinemias prolongadas [19], aunque la variación proteica debería ser grande para llegar a afectar la concentración de fructosamina [20].

Las seroproteínas glicosiladas permiten discriminar entre perros hiperglucémicos diabéticos y no-diabéticos, con altas sensibilidad y especificidad [21]. Su determinación es útil para el diagnóstico de la toxemia gestacional de la oveja [22], la cetosis subclínica del bovino [23] y el carcinoma pancreático secretor de insulina del canino [24].

Fructosamina representa el nivel promedio de la glucemia de las últimas 1-2 semanas [4], o 1-3 semanas [15] u 8-12 días [16].

OBJETIVOS

El propósito de esta comunicación es brindar una breve actualización sobre la utilidad diagnóstica de las proteínas glicosiladas, así como relatar los trabajos que desde hace dos décadas venimos llevando a cabo en nuestro grupo.

En la década de 1980, ante la aparición de las primeras técnicas para el dosaje de HbA1c, obtuvimos sus valores de referencia en seres humanos y diferentes especies animales [25], constatamos su elevación en la diabetes canina [26] y su utilidad en la evaluación de la insulino-terapia [27].

En la década de 1990 se incorpora al laboratorio clínico la determinación de fructosamina, ante lo cual procedimos a obtener su intervalo de referencia en seres humanos [28] y caninos [29], abocándonos luego a relacionar este parámetro con los niveles hemáticos de glucosa y proteínas tota-

les en ejemplares sanos y pacientes afectados por diabetes mellitus y otras enfermedades.

MATERIALES Y MÉTODOS

SUJETOS EXPERIMENTALES

Se recopilan, a manera de controles de referencia, valores obtenidos en 66 personas (50% de cada sexo, edades: 2 a 70 años) incluidas en una investigación tendiente a determinar índices aterogénicos en población del nordeste argentino (47 sanas + 19 diabéticas) [30], así como 359 seres humanos (50% de cada sexo, edades: 60 a 92 años) involucrados en una búsqueda de intervalos de referencia en geriatría (335 sanos + 24 diabéticos) [31].

Ciento setenta caninos de distintas razas, ambos sexos y edades de 1 a 12 años fueron incorporados al estudio (126 sanos, 7 diabéticos, 11 hiperglucémicos no-diabéticos y 26 normoglucémicos hipoproteinémicos).

El muestreo incluyó 16 bovinos, 12 equinos, 20 gallinas y 5 gatos, en todos los casos clínicamente sanos. Una alícuota de la sangre venosa extraída fue anticoagulada con EDTA y con el resto se obtuvo suero.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

HbA1c fue determinada por cromatografía "batch", donde la sangre hemolizada con un tensioactivo a base de azida se contacta con resinas de intercambio catiónico, las que fijan la Hb nonglicosilada, separable por sedimentación. En el sobrenadante queda la HbA1c, cuantificable espectrofotométricamente a 415 nm [32].

Fructosamina fue valorada por la técnica de reducción alcalina del azul nitrotetrazolio hasta formazano, cuantificándose fotocolorimétricamente a 546 nm utilizando calibradores y sueros

patrones de control de calidad (normales y patológicos) provistos por la empresa elaboradora [33].

Para el resto de las determinaciones se utilizaron técnicas clásicas: Hb (cianmetahemoglobina), proteínas totales (biuret) y glucosa (O-toluidina y glucosa-oxidasa) [32, 33], efectuándose las lecturas en un fotómetro Labora Mannheim 4010 digital, provisto de microprocesador y termostatizador, con cubetas de cuarzo semimicro de 1 cm de paso de luz.

MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los valores de individuos sanos fueron estudiados a efectos de constatar si mostraban distribución gaussiana de las frecuencias mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; las estadísticas descriptivas y el análisis de la varianza paramétrica (ANOVA) se calcularon acorde con los métodos convencionales [34].

En las muestras de sujetos enfermos se empleó media aritmética ($\bar{X}$) $\pm$ desviación estándar (DE). La significación estadística fue considerada a partir de $p < 0.05$. El intervalo de referencia (rango que comprende el 95.44% de los valores estudiados) fue calculado a partir de $\bar{X} \pm DE$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HbA1c: la *Tabla 1* permite deducir que el intervalo de referencia de este analito en perros clínicamente sanos fue del 6.99 al 11.15% de la Hb total. No podemos discutir esta cifra por no haber hallado trabajos sobre HbA1c dosada por cromatografía "batch" en perros, pero sí podemos comparar los valores que obtuvimos en personas sanas (5.08 a 9.60%) con el rango humano reportado para dicha técnica: 6.60 a 8.60% [32] y 5 a 8% [4], los que resultaron muy aproximados entre sí.

Tabla 1: Valores obtenidos para HbA1c, hemoglobina total (Hb) y glucosa sérica ($\bar{X} \pm DE$)				
población	n	HbA1c (%)	Hb (g/dl)	glucosa (g/l)
caninos sanos	37	9.07 $\pm$ 1.04	14.58 $\pm$ 0.32	0.86 $\pm$ 0.12
ref : humanos sanos	47	7.34 $\pm$ 1.13	15.10 $\pm$ 0.26	0.85 $\pm$ 0.09
ref : humanos diabéticos	19	13.64 $\pm$ 2.61	15.33 $\pm$ 0.29	2.41 $\pm$ 1.02
caninos diabéticos	4	19.48 $\pm$ 8.30	15.92 $\pm$ 0.41	12.98 $\pm$ 0.27

Por cromatografía de intercambio iónico otros autores obtuvieron en perros sanos niveles de HbA1c = $7.1 \pm 1.1\%$ (rango: 5.1 a 9.7%) y en perros diabéticos: 14%, guarismos muy semejantes a los aquí obtenidos [35]. Otros reportaron niveles más bajos de HbA1c dosada por cromatografía en columna: $4.35 \pm 0.82\%$ en sujetos sanos y $8.4 \pm 1.73\%$ en diabéticos [5]. Las diferencias entre sexos y edades fueron no-significativas en nuestro ensayo.

Glucemias y hemoglobinemias totales de personas y caninos sanos encuadraron en rangos normales [36, 37], excluyendo probabilidades de hipo/hiperglucemias, así como anemia/hemoconcentración [5, 9].

En personas diabéticas la glucemia promedió 2.41 ± 1.02 g/l y la HbA1c se elevó a $13.64 \pm 2.61\%$, en consonancia con las cifras de 8.4 a 16.0% citadas para estos casos [32]. Perros con diabetes mellitus arrojaron valores de glucemia de 2.98 ± 0.27 g/l con incrementos de HbA1c a niveles de $19.48 \pm 8.30\%$ y hemoglobina total ligeramente elevada, quizás por efecto de la deshidratación propia de esta afección [11, 36].

En gatos normales obtuvimos HbA1c = $8.58 \pm 0.79\%$ y en gallinas aparentemente sanas = $9.02 \pm 0.98\%$ (para glucemias de 1.41 ± 0.20 g/l). Llama la atención que las aves, cuya glucemia es más elevada que la de los mamíferos [38], obtuvieran tasas de HbA1c similares a las del ser humano y los caninos; quizás ello pueda relacionarse a la escasa vida media de sus eritrocitos [14]. En seres humanos la HbA1c decrece cuando se reduce la vida media del glóbulo rojo [39]. En la diabetes mellitus ello sucedería por pérdida de la elasticidad de su membrana [1].

Fructosamina: la *Tabla 2* posibilita calcular el intervalo de referencia de este parámetro en suero de caninos normales, que resultó de 192.6 a 357.4 $\mu\text{mol/l}$ (distribución normal, kurtosis = -0.75, asimetría = 0.07). No hubo diferencias significativas entre sexos ($p = 0.76$) ni edades ($p = 0.27$). Proteinemias y glucemias fueron normales.

Nuestro intervalo de referencia resultó algo más amplio que el reportado para perros Beagle utilizando otro método de valoración de fructosamina (258.6 a 343.8 $\mu\text{mol/l}$) [22], diferencia quizás atribuible a la heterogeneidad de nuestra población. El límite máximo admisible citado por otros (350 $\mu\text{mol/l}$) [24] se acerca bastante al aquí obtenido (357.4 $\mu\text{mol/l}$). Con el mismo método de laboratorio, recientes investigaciones [16] permitieron constatar distribución no-paramétrica de los valores de fructosamina en una población heterogénea de caninos europeos, con niveles individuales entre 187 y 386 $\mu\text{mol/l}$ (mediana = 312 $\mu\text{mol/l}$), los que resultan similares a los emergentes de este trabajo (198 a 351 $\mu\text{mol/l}$).

La media aritmética de fructosamina obtenida en seres humanos sanos (283.1 ± 78.1 $\mu\text{mol/l}$) coincide con el límite máximo estipulado por la medicina humana (285 $\mu\text{mol/l}$) [33], e indica que nuestros valores resultaron sensiblemente más altos y dispersos, efecto quizás debido a que se trataba de una población de ancianos, donde las seroproteínas glicosiladas podrían ser más elevadas por la deficiente regulación glucémica propia de la senectud [40]. Contrariamente, los valores de fructosamina parecen ser más bajos en la infancia y en el embarazo humanos [3, 41], aunque en algunos trabajos no se hallaron diferencias debidas a la edad (15 a 35 años) ni al sexo [42].

Tabla 2: Valores obtenidos para fructosamina, proteínas totales y glucosa sérica ($\bar{X} \pm \text{DE}$)

población	n	fructosamina ($\mu\text{mol/l}$)	proteínas totales (g/dl)	glucosa (g/l)
caninos sanos	89	275.0 ± 41.2	7.22 ± 0.26	0.89 ± 0.07
ref: humanos sanos	335	283.1 ± 78.1	7.13 ± 0.46	0.90 ± 0.12
ref: humanos diabéticos	24	564.9 ± 100.2	7.63 ± 0.35	2.04 ± 0.49
caninos diabéticos	3	550.7 ± 93.9	7.36 ± 0.19	2.62 ± 0.61
caninos hiperglucémicos	11	279.2 ± 48.6	6.89 ± 0.21	1.26 ± 0.10
no - diabéticos				
caninos normoglucémicos	26	183.1 ± 53.5	5.66 ± 0.13	0.92 ± 0.17
hipoproteinémicos				

Con tenores normales de proteinemia, seres humanos y caninos afectados de diabetes mellitus incrementaron sus glucemias (2.04 ± 0.49 y 2.62 ± 0.61 g/l respectivamente), con el consiguiente aumento de fructosamina, muy por encima del límite máximo del intervalo de referencia (564.9 ± 100.2 y 550.7 ± 93.9 $\mu\text{mol/l}$ respectivamente). Otros investigadores denuncian, para perros diabéticos, niveles de fructosamina con medianas de 490 $\mu\text{mol/l}$ y máximas individuales de hasta 971 $\mu\text{mol/l}$ [16], así como medias de 600 $\mu\text{mol/l}$ y máximas individuales de 1242.9 $\mu\text{mol/l}$ [10]. Por el contrario, en perros hipoglucémicos (0.25 g/l) por hiperinsulinismo, fructosamina alcanzó niveles tan bajos como 147 $\mu\text{mol/l}$ [24].

En nuestra experiencia, caninos normoproteínémicos con hiperglucemia (1.26 ± 0.10 g/l) atribuible a stress, tratamientos con ACTH / glucocorticoides, fiebre, anestesia, cirugía o infecciones agudas, ostentaron concentraciones de fructosamina (279.2 ± 48.6 $\mu\text{mol/l}$) prácticamente normales, confirmando que los cambios agudos o transitorios de la glucemia no afectan la tasa de glicosilación seroproteica, tanto en perros [15] como en gatos [17].

Perros normoglucémicos (0.92 ± 0.17 g/l) con hipoproteinemias (5.66 ± 0.13 g/dl) debidas a trastornos crónicos con albuminuria, insuficiencia hepática, desnutrición o neoplasias, mostraron concentraciones de fructosamina (183.1 ± 53.5 $\mu\text{mol/l}$) por debajo del intervalo de referencia, corroborando que la disminución sostenida de proteínas plasmáticas reduce el valor de fructosamina [20].

Los escasos gatos aquí encuestados revelaron niveles de fructosamina $m = 238.4$ $\mu\text{mol/l}$ (glucemia = 0.83 g/l), que resultan encuadrados en los intervalos de referencia reportados en otras investigaciones: 146 a 271 $\mu\text{mol/l}$ [19] y 221 a 341 $\mu\text{mol/l}$ [17]. Gatos diabéticos (glucosa media = 3.48 g/l) incrementarían la tasa de glicosilación proteica hasta niveles de 820 $\mu\text{mol/l}$ [17]. Para el bovino, otros autores reportan valores normales de fructosamina entre 213.4 y 265.0 $\mu\text{mol/l}$, sin constatar cambios atribuibles al ritmo circadiano ni a las variaciones transitorias de la glucemia [23].

CONCLUSIÓN

El diagnóstico de diabetes mellitus en medicina veterinaria continúa basándose en la triada poliuria-polidipsia-polifagia y los hallazgos de hiperglucemia, glucosuria y anormalidad de la

prueba de tolerancia a la glucosa, raramente midiendo la insulinemia [20, 21, 36, 38]. Algunos de estos signos pueden deberse a otras causas, como afecciones renales, hepatobiliares, endometritis, hipercorticismismo, stress y acciones medicamentosas [20].

En el Servicio de Análisis Clínicos anexo a la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE), tras 20 años de labor (1977-1997) y miles de animales analizados, únicamente constatamos diabetes mellitus en no más de una decena de ocasiones y siempre en perros. Esta prevalencia está muy por debajo de la reportada a nivel internacional (1.5%) [20]. La reticencia del veterinario clínico hacia las determinaciones de laboratorio, sumada a la insolvencia monetaria de los propietarios, quizás provoque que esta endocrinopatía, la más común en el perro, no sea debidamente diagnosticada y tratada.

Las proteínas glicosiladas, ya sean de mediano plazo (fructosamina) o largo plazo (HbA1c), poseen un gran potencial para evaluar retrospectivamente el metabolismo hidrocarbonado de los animales domésticos. Falta aún investigar los cambios fisiopatológicos hallados en seres humanos, como la gestación [41, 43], la raza [44], la obesidad [45], ingestión de vitamina C [10], hipertensión arterial [46] e interferencias por hemoglobinopatías [5], estableciendo luego ventajas y limitaciones de cada determinación [47, 48, 49, 50] a efectos de no descartarlas como herramientas diagnósticas. •

COPPO, J. A. / Profesor Titular, Cátedras de Fisiología General (UNaM) y Fisiología Humana (UNNE). COPPO, N. B. / Profesora Adjunta, Cátedras de Fisiología General (UNaM) y Fisiología Veterinaria (UNNE).

AGRADECIMIENTOS

A las empresas Wiener SRL y Boehringer de Argentina (División Diagnóstica) por su constante apoyo. A la Lic. Lucrecia Felquer (INICNE) por revisar el summary.

REFERENCIAS

1. REBOLLEDO, O. R. Aspectos bioquímicos de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 20: 365-393. 1986.
2. ACTIS DATO, S. M. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas en la diabetes

- mellitus y en la obesidad. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 22: 359-378. 1988.
3. ACTIS DATO, S. M.; REBOLLEDO, O. R. Avances en la valoración de fructosamina: ventajas de un nuevo equipo diagnóstico aplicado a estudios poblacionales. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 25: 391-402. 1991.
 4. BERMÚDEZ, M. C.; REBOLLEDO, O. R. Valoración de las proteínas glicosiladas del suero como índice retrospectivo del control glucémico. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 22: 279-288. 1988.
 5. GONZÁLEZ, S.; TOMIO, J. M. Separación y cuantificación de HbA. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 14: 427-434. 1980.
 6. TRETON, J. A.; COURTOIS, Y. Biomarkers of aging. *Ann. Biol. Clin.* 48: 319-322. 1990.
 7. MCCARTHY, A. D. Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 29: 173-190. 1995.
 8. ARDAWI, M. S.; NASRAT, H. A.; BAHNASSY, A. A. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diab. Med.* 11: 384-387. 1994.
 9. BORDAS FONDREDE, M.; SAUSER, E.; JARDEL, C.; JAUDON, M. C.; THERVET, F.; ROTTEBOURG, J.; DELATTRE, J. Protéines glyquées plasmatiques dans l'insuffisance rénale chronique. *Ann. Biol. Clin.* 48: 717-720. 1990.
 10. JENSEN, A. L. Glycated blood proteins in canine diabetes mellitus. *Vet. Rec.* 137: 401-405. 1995.
 11. ERRECALDE, J. O.; GIORDANI, C. Insulina: aspectos fisiológicos. *Therios* 6: 25-34. 1985.
 12. HILL, R. P.; MCKENZIE, I.; BUSHBY, P.; ORWYN, P.; LLOYD, R. H.; SANDS, K. A. Changes in fructosamine and haemoglobin A1 in patients with microalbuminuria and poor diabetic control. *Anales XV Congreso Internacional de Química Clínica, Melbourne.* 1993.
 13. PENHOS, J. C. La medición de las hemoglobinas glicosiladas en la diabetes mellitus. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 18: 3-12. 1984.
 14. JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th. edn, Lea & Febiger, Philadelphia. 1986.
 15. JENSEN, A. L. Serum fructosamine in canine diabetes mellitus. An initial study. *Vet. Res. Comm.* 16: 1-9. 1992.
 16. REUSCH, C.; HOYER-OTT, M. Zur bedeutung der fructosamin-bestimmung in der uberwachung des diabetes mellitus. I: Hunden. *Kleintierpraxis* 40: 85-94. 1995.
 17. REUSCH, C.; KIRSCH, M.; VOCHEZER, R. Zur bedeutung der fructosamin-bestimmung in der uberwachung des diabetes mellitus. II: Katzen. *Kleintierpraxis* 40: 95-100. 1995.
 18. GRONBAEK, H.; NIELSEN, B.; OSTERBY, R.; HARRIS, A.; ORSKOV, H.; FLYVBJERG, A. Effect of octreotide and insulin on manifest renal and glomerular hypertrophy and urinary albumin excretion in long-term experimental diabetes in rats. *Diabetol.* 38: 135-144. 1995.
 19. THORESEN, S. I.; BREDAL, W. P. Determination of a reference range for fructosamine in feline serum samples. *Vet. Res. Comm.* 19: 353-361. 1995.
 20. JENSEN, A. L. Various protein and albumin corrections of the serum fructosamine concentration in the diagnosis of canine diabetes mellitus. *Vet. Res. Comm.* 17: 13-23. 1993.
 21. JENSEN, A. L. Serum fructosamine as a screening test for diabetes mellitus in non-healthy middle-aged to older dogs. *J. Vet. Med. Assn.* 41: 480-484. 1994.
 22. JENSEN, A. L.; AAES, H. Reference interval and critical difference for canine serum fructosamine concentration. *Vet. Res. Comm.* 16: 317-325. 1992.
 23. JENSEN, A. L.; PETERSEN, M. B.; HOUE, H. Determination of the fructosamine concentration in bovine serum samples. *J. Vet. Med. Assn.* 40: 111-117. 1993.
 24. THORESEN, S. I.; ALEKSANDERSEN, M.; LONAAS, L.; BREDAL, W. P.; GRONDALEN, J.; BERTHELESEN, K. Pancreatic insulin-secreting carcinoma in a dog: fructosamine for determining persistent hypoglycaemia. *J. Small Anim. Pract.* 36: 282-286. 1995.
 25. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L.; TUCKEY, B. E.; REYES, A. D.; SCORZA, S. H.; TERRAES, J. C. Valores de referencia para hemoglobina glicosilada. *Rev. Fac. Vet. Maracay (Venezuela)* 32: 77-89. 1985.
 26. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L.; SCORZA, S. H.; TERRAES, J. C. Hemoglobina glicosilada en el canino normal y diabético. *Anales del X Congreso Panamericano de Veterinaria, Buenos Aires.* 1985.
 27. COPPO, J. A.; LÓPEZ, J. A.; SANDOVAL, G. L.; SCORZA, S. H. Diabetes mellitus canina: variaciones de la glucohemoglobina y evaluación bioquímica de la respuesta a la insulino terapia. *Anales IX Sesión Comunic. Científ. FCV-UNNE, Corrientes.* 1990.
 28. COPPO, J. A.; COPPO, N. B.; BÁEZ, M. C.; SERRANO, C. P.; CRISTALDO, D. O.; CARDOZO, S.

- Niveles de fructosamina en población geriátrica clínicamente sana del nordeste argentino. *Anales del III Congreso Argentino de Bioquímica Clínica*, Buenos Aires. 1995.
29. COPPO, J. A.; COPPO, N. B. Serum fructosamine: reference interval for a heterogeneous canine population (*Vet. Res. Comm.*, en prensa). 1996.
 30. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L. Índices aterogénicos en la población de las ciudades de Resistencia y Corrientes. *La Semana Médica* 174: 123-129. 1990.
 31. COPPO, J. A.; COPPO, N. B.; CRISTALDO, D. O.; SERRANO, C. P.; CARDOZO, S.; BÁEZ, M. C.; ALEGRE, H. M. Valores hematológicos y bioquímicos en población geriátrica de Resistencia y Corrientes. *Anales del II Congreso Nacional de Bioquímica*, Posadas. 1993.
 32. WIENER S.R.L. Gluco-Hb, determinación por cromatografía "batch" (Rosenthal, P.K.: *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 45-51, 1981). En: *Manual de Procedimientos Analíticos*, Rosario. 1984.
 33. BOEHRINGER MANNHEIM S.A. Fructosamina: adaptación del método NBT (Johnson, R.N.; Metcalf, P.A.; Baker, J.R.: *Clin. Chem. Acta* 127: 87-95, 1982). En: *Metódicas de Trabajo para análisis manuales*, Buenos Aires. 1991.
 34. STEEL, R. G.; TORRIE, J. H. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. 2nd. edn, McGraw-Hill, New York. 1992.
 35. EASLEY, J. R. Glycosylated haemoglobin in dogs: precision, stability, and diagnostic utility. *Vet. Clin. Pathol.* 15: 12-15. 1986.
 36. COLES, E. H. *Veterinary Clinical Pathology*, 4th. edn., Saunders, Philadelphia. 1986.
 37. PESCE, A. J.; KAPLAN, L. A. *Química Clínica, Métodos*. 1ra. edn, Panamericana, Buenos Aires. 1990.
 38. KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th. edn, Academic Press, San Diego. 1989.
 39. MARTINA, W. V.; MARTIJN, E. G.; MOLEN, M.; SCHERMER, J. G.; MUSKIET, F. A. Beta-N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age. *Clin. Chem.* 39: 2259-2265. 1993.
 40. DYBKAER, R.; LAURITZEN, M.; KRAKAUER, R. Relative reference values for clinical chemical and haematological quantities in healthy elderly people. *Acta Med. Scand.* 209: 1-9. 1981.
 41. VERMES, I.; ZEYEN, L. J.; VAN ROON, E.; BRANDTS, H. The role of serum fructosamine as a screening test for gestational diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 21: 73-76. 1989.
 42. SCOCCIA, A. E.; GARDENAL, L. M.; BALLERINI, H. D.; FERRAROTTI, N. F.; GONZÁLEZ, M. B.; LAFUENTE, D. M.; MARCOS, C. Y.; MINERVINI, M. V. Estimación de proteínas séricas glicosiladas por reducción del NBT en medio alcalino. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 25: 141-149. 1991.
 43. ROSIC, B.; JEVREMOVIC, M.; MILACIC, D.; GLIGOROVIC, S.; STOJANOV, M.; LJUBIC, A.; TERZIC, M. Correlation of glycosylated hemoglobin and fructosamine in pregnant women with diabetes mellitus. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 121: 17-19. 1993.
 44. SIMMONS, D. Differences in umbilical cord insulin and birth weight in non-diabetic pregnancies of women from different ethnic groups in New Zealand. *Diabetol.* 37: 930-936. 1994.
 45. ARDAWI, M. S.; NASRAT, H. A.; BAHNASSY, A. A. Fructosamine in obese normal subjects and type II diabetes. *Diab. Med.* 11: 50-56. 1994.
 46. BILGIN, R.; DONMA, O.; SAGLIKER, Y. Glucose, glycated haemoglobin and fructosamine levels in essential hypertension. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 1129-1133. 1993.
 47. FURUSETH, K.; BRUUSGAARD, D.; RUTLE, O.; VAALER, S. Fructosamine cannot replace HbA1c in the management of type II diabetes. *Scand. J. Prim. Health Care* 12: 219-224. 1994.
 48. ISLAM, N.; AKHTER, J.; KAYANI, N.; KHAN, M. A. Fructosamine: an alternative assessment of past glycaemic control in developing countries. *J. Pak. Med. Assoc.* 43: 238-240. 1993.
 49. SHIELD, J. P.; POYSER, K.; HUNT, L.; PENNOCK, C. A. Fructosamine and glycated haemoglobin in the assessment of long term glycaemic control in diabetes. *Arch. Dis. Child.* 71: 443-445. 1994.
 50. WOOD, P. A.; SMITH, J. E. Glycosylated hemoglobin and canine diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 176: 1267-1268. 1980.



CALENDARIO POLÍNICO PRELIMINAR CIUDAD DE POSADAS (ARGENTINA)

Paul, R. M. / Fernández, L. C. / Huk, L. H.

Preliminary Pollen Calendar of Posadas City (Argentina)

ABSTRACT

The objective of the present contribution is to make known the first results of pollen rain in Posadas City, Province of Misiones corresponding to the year 1993. The monitoring has been performed fortnightly using a Tauber type gravitational trap in a sampling site corresponding to the central area in Posadas City, at six metres over the ground.

Nineteen pollen types representing the surrounding vegetation (pavements, parks, squares, garden, unused lands) have been identified. In relation to pollen frequency in trees - shrubs, we can identify peaks in April, August and November. Herbs present a more uniform annual rhythm although their frequency increase in December- February. Poaceae, Asteraceae, Cyperaceae, *Cecropia spp.*, are noticeable for being present all the year.

A list with pollen types identified, tables and figures the annual relative frequency, as well as the corresponding annual calendar are presented.

KEY WORDS: Palinology; Aeropalynology; Pollen calendar; Posadas; Misiones; Argentina.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer los primeros resultados obtenidos durante un año de monitoreo (1993) de la lluvia polínica de un sitio de la ciudad de Posadas. Las muestras de polen se obtuvieron quincenalmente con un captador gravitacional tipo Tauber, ubicado en el área céntrica de la ciudad (calles Félix de Azara y Salta), a 6 metros de altura.

En el análisis de las muestras de lluvia polínica se identificaron hasta el momento 19 tipos polínicos, representativos de la vegetación circundante, que agrupamos en las categorías de árboles-arbustos y herbáceas para una mejor apreciación de su dinámica anual. Con respecto a la frecuencia polínica de árboles-arbustos podemos señalar picos en abril, agosto y noviembre. Las herbáceas, en cambio, presentan un ritmo anual más uniforme aunque aumentan su frecuencia en el período diciembre-febrero. Poaceae, Asteraceae, Cyperaceae y *Cecropia spp.* se destacan por estar presentes durante todo el año.

Se presenta una lista de los tipos polínicos identificados, tablas y figuras de frecuencia relativa anual y calendario polínico.

PALABRAS CLAVES: Palinología; Aeropalinología; Calendario polínico; Posadas; Misiones; Argentina.

INTRODUCCIÓN

Misiones se encuentra situada en el ángulo nordeste de la República Argentina, casi inmediatamente debajo del trópico de Capricornio. El clima es subtropical sin estación seca. Las precipitaciones son abundantes y bastante uniformes (1.500-2.000 mm anuales). Dada su posición cercana al trópico, la temperatura es elevada en promedio (entre 20° y 21°). La amplitud térmica media anual es de 11°. Los vientos predominantes son los del E. y N.E., en menor medida S. y N. La ciudad de Posadas, capital de la provincia, está situada a los 27° 23' de Lat. Sur y a 55° 53' de Long. Oeste. Desde el punto de vista fitogeográfico, pertenece al distrito de los campos, bordeado por selva fluvial. Presenta una gran diversidad florística que congrega especies autóctonas y exóticas, muchas de las cuales son anemófilas y causantes de afecciones alérgicas (polinosis).

No existen antecedentes de estudios aeropalínológicos para la provincia de Misiones; a nivel regional, se citan los realizados para Corrientes por Cuadrado [1, 2].

El objetivo del presente trabajo es dar a conocer los primeros resultados del análisis de lluvia polínica del Municipio Posadas evidenciando los tipos polínicos presentes, porcentajes, frecuencia y ritmo de aparición durante un año calendario (1993).

Los tipos desconocidos, considerados en el análisis cuantitativo, serán abordados en trabajos posteriores. Estos tipos polínicos son numerosos, pero en general no se presentan en altas concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras fueron obtenidas con un muestreador tipo Tauber de reposición quincenal, ubicado en la zona céntrica de la ciudad (calles Félix de Azara y Salta) a 6 metros de altura. Las mismas fueron procesadas usando la técnica de acetólisis de Erdtman [3] montadas en glicerina-gelatina y selladas con parafina.

A fin de realizar estudios cuali-cuantitativos, una vez obtenidos los preparados, se procedió al barrido analítico con microscopio óptico Carl Zeiss - Laboval 4 hasta totalizar 400 granos por mes, a excepción del mes de marzo (200). A partir de esta cifra se calcularon los valores relativos de los tipos identificados (porcentaje de cada uno

sobre el total de granos). No se incluye en este trabajo el estudio de las esporas.

La identificación de los granos se realizó con material bibliográfico y palinoteca de referencia de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Módulo Farmacia Laboratorio 5. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó hoja electrónica y procesador de textos.

Se confeccionó una lista de los tipos polínicos identificados, tablas y figuras de frecuencia relativa y calendario polínico.

RESULTADOS

En el análisis de la lluvia polínica de la ciudad de Posadas se han identificado 19 tipos, los que se presentan en la Tabla 1 organizados en dos categorías. La primera incluye al polen de árboles-arbustos y representa la vegetación circundante al sitio de muestreo, cultivados en veredas, jardines, plazas, etc. La mayoría de ellos son de origen exótico y de condición alergógena como por ejemplo eucaliptos, ligustros, mangos, moras, pinos y plátanos [4]; otros son representantes nativos, entre ellos lecherón, ambaú, palo pólvora y tala, siendo expresamente citadas estas tres últimas como anemófilas-alergógenas [5].

En la lista, del grupo de las Mirtáceas se separó a *Eucalyptus* spp. por su mayor representatividad a lo largo del año.

La segunda categoría comprende a las herbáceas que están abundantemente representadas en la flora urbana con especies nativas y exóticas, muchas anemófilas y alergógenas. *Parietaria debilis*, por ejemplo, identificada como especie nativa es muy frecuente en lugares húmedos de veredas, patios y jardines.

La Tabla 2 muestra los valores porcentuales como frecuencias relativas de los 19 tipos polínicos en base al total mensual (incluyendo no identificados). Los más importantes, desde el punto de vista alergogénico, se representan en la Figura 1 donde se puede apreciar la relación presencia-concentración anual de los mismos. *Cecropia* spp. y *Poaceae* tienen alta concentración y presencia constante en el año. *Asteraceae*, durante todo el año con baja concentración salvo el mes de abril donde cobra mayor importancia. *Chenopodiaceae* / *Amaranthoideae* con bajo porcentaje, está presente de modo continuo en el primer semestre del año. *Mangifera indica* con un valor importante en el mes abril, escaso en agosto-

septiembre y nulo el resto del año. *Eucalyptus* spp. y *Trema micrantha*, de registro continuo durante la mayor parte del año, con máximos valores para el primero, en abril y agosto y para el segundo, enero-febrero. Pinaceae, *Morus alba*, *Platanus acerifolia* y *Plantago* spp. están presentes entre los meses de julio a octubre, destacándose los dos primeros en agosto y los siguientes en septiembre. *Ligustrum* spp., con bajo porcentaje, discontinuamente representado en el registro.

La Tabla 3 muestra los porcentajes de frecuencia relativa mensual para las categorías árboles-arbustos y herbáceas, valores con los cuales se confeccionó la Figura 2. Su análisis permite visualizar la existencia de tres picos marcados en el año para la primera categoría; en abril por la especial contribución de *Mangifera indica* y *Eucalyptus* spp., agosto por Pinaceae, *Eucalyptus* spp. y *Morus alba*, *Platanus acerifolia* y en noviembre debido a *Cecropia* spp. y Myrtaceae. En la segunda categoría no se destacan picos como en la anterior, aunque experimentan un aumento de frecuencia en noviembre-febrero, influenciado especialmente por el aporte de Cyperaceae y Poaceae.

El calendario de los tipos polínicos identificados durante el año se presenta en la Tabla 4 donde podemos apreciar la siguiente dinámica, que consideramos de utilidad, especialmente en la diagnosis, prevención y tratamiento de alergias:

Enero: *Cecropia* spp., *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, Poaceae. Febrero: *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., Myrtaceae, Pinaceae, *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, Poaceae. Marzo: *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Ligustrum* spp., Myrtaceae, *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, Poaceae. Abril: *Celtis* spp., *Mangifera indica*, *Cecropia*, *Eucalyptus* spp., Myrtaceae, *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, Poaceae. Mayo: *Celtis* spp., *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Ligustrum* spp. Myrtaceae, *Trema micrantha*, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, Poaceae. Junio: *Celtis* spp., *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., Myrtaceae, *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, *Plantago* spp., Poaceae. Julio: *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Ligustrum* spp., *Morus alba*, Myrtaceae, Pinaceae,

Trema micrantha, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, Poaceae. Agosto: *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Mangifera indica*, *Morus alba*, Myrtaceae, Pinaceae, *Platanus acerifolia*, *Trema micrantha*, Asteraceae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, *Plantago* spp., Poaceae. Septiembre: *Celtis* spp., *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Mangifera indica*, Myrtaceae, Pinaceae, *Platanus acerifolia*, Asteraceae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, *Plantago* spp., Poaceae. Octubre: *Celtis* spp., *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Hovenia* spp., Myrtaceae, *Platanus acerifolia*, *Trema micrantha*, Asteraceae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, Poaceae. Noviembre: *Celtis* spp., *Cecropia* spp., *Eucalyptus* spp., *Hovenia* spp., *Ligustrum* spp., Myrtaceae, *Psidium* spp., *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Cyperaceae, *Parietaria debilis*, Poaceae. Diciembre: *Cecropia* spp., *Ligustrum* spp., Myrtaceae, *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Poaceae.

DISCUSIÓN

La mayoría de los tipos identificados en lluvia polínica son anemófilos y reflejan la época de floración. *Ligustrum* spp. y *Mangifera indica* son plantas de polinización entomófila, sin embargo están presentes en lluvia polínica, lo cual podría explicarse a partir de la consideración de factores meteorológicos o biológicos.

La concentración polínica de herbáceas es bastante homogénea durante el año lo que podría indicar una constante floración de las mismas; la de árboles-arbustos es más heterogénea y estaría influenciada por la floración combinada de varias especies en determinados períodos del año.

Dado que la mayoría de los tipos de árboles-arbustos identificados son alergógenos, consideramos que una forma de disminuir su aporte a la lluvia polínica podría ser seleccionando críticamente las especies a ser utilizadas en el arborizado de la ciudad.

CONCLUSIONES

Del contenido polínico atmosférico de la ciudad de Posadas -Año 1993- se identificaron a *Cecropia* spp., *Celtis* spp., *Eucalyptus* spp., *Hovenia dulcis*, *Ligustrum* spp., *Mangifera indica*, *Morus alba*, Myrtaceae, Pinaceae, *Platanus acerifolia*, *Psidium* spp., *Trema micrantha*, Amaranthaceae, Asteraceae, Chenopodiaceae/Amarantoideae, Cypera-

ceae, Parietaria debilis, Plantago spp., Poaceae; la mayoría anemófilas/alergógenas, con excepción de Mangifera indica y Ligustrum spp., consideradas entomófilas.

Durante todos los meses del año se registra presencia polínica. En los meses de julio a noviembre se destaca un predominio de árboles-arbustos respecto de herbáceas. Cecropia spp., Asteraceae, Poaceae, Cyperaceae, están presentes durante todo el año; Trema micrantha, Eucalyptus spp. y otras mirtáceas, gran parte del mismo; en cambio, Hovenia dulcis, Mangifera indica, Morus alba, Pinaceae, Platanus acerifolia, Plantago spp., Psapium spp., se limitan a cortos períodos de tiempo.

El tipo polínico que resulta más común y con la más alta concentración a lo largo de todo el año es Cecropia spp., especie nativa abundante en la flora local.

La mayoría de los tipos identificados corresponden a árboles-arbustos de condición alergógena, frecuentemente cultivados en veredas, plazas y parques.

La concentración polínica anual de herbáceas es más baja y homogénea en relación a árboles-arbustos, los que presentan altas concentraciones en determinados meses del año como abril, agosto y noviembre.

PAUL, R. M.; FERNÁNDEZ, L. C. y HUK L. H. /
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales,
Módulo Farmacia, UNaM.

AGRADECIMIENTO

A la Prof. Cristina Mayol por el asesoramiento brindado en la elaboración del Abstract.

REFERENCIAS

1. CUADRADO, G. Polen atmosférico de la ciudad de Corrientes (Argentina). Facena 2 : 55-68. 1978.
2. CUADRADO, G. Calendario polínico preliminar para Corrientes (Argentina). Facena 3:65-83. 1979.
3. ERDTMAN, G. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms (An Introduction to Palynology. I). Hafner Publishin Company. 1966.
4. ALEMANY-VALL, R. Tratado de Alergia. Polinosis- Ed. Científica médica. Cap. 15. 1960.
5. BARTH, O. M.; CORTE-REAL, S.; & GUIMARAES MACIEIRA, E Morfología do polen anemofilo y alergizante no Brasil. II. Polygonaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae, Euphorbiaceae e Myrtaceae. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 74 (3-4): 191-201. 1976.

Tabla 1: Tipos Polínicos	
Herbáceas	Árboles/ Arbustos
Amaranthaceae (amarantos)	*Cecropia spp. (ambaú)
Asteraceae (compuestas)	*Celtis spp. (tala)
Chenopodiaceae / Amaranthoideae (quenopodios y amarantos)	Eucalyptus spp. (eucalipto)
Cyperaceae	Hovenia dulcis (palito dulce)
*Parietaria debilis (paletaria)	Ligustrum spp. (ligustros y ligustrinas)
*Plantago spp. (llantén)	Mangifera indica (mango)
Poaceae (gramíneas)	Morus alba (mora blanca)
	Myrtaceae (*pitanga, * guayaba, otros)
	Pinaceae (pino, cedro)
	Platanus acerifolia (plátano)
	*Psapium spp. (lecherón)
	*Trema micrantha (palo pólvora)
* especies nativas	*especies nativas

TABLA 2: Frecuencia relativa de los tipos polínicos; Ciudad de Posadas; año 1993

TAXA	MESES												AÑO
	En.	Febr.	Mar.	Abr.	My.	Jun.	Jl.	Ag.	Sept.	Oct.	Nov.	Dic	T/%
Amaranth. T/mens. %	1 0.25	1 0.25	1 0.50	1 0.25	0.0 0.00	3 0.75	1 0.25	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	3 0.75	3 0.75	14 0.30
Asteraceae T/ mens. %	6 1.50	11 2.75	3 1.50	32 8.00	6 1.50	8 2.00	7 1.75	5 1.25	2 0.50	7 1.75	5 1.25	2 0.50	94 2.04
Chen/Amar T/mens. %	3 0.75	4 1.00	3 1.50	2 0.50	2 0.50	2 0.50	1 0.25	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	17 0.37
Cecropia T/mens. %	97 24.25	88 22.00	80 40.00	76 19.00	12 3.00	10 2.50	2 0.50	11 2.75	3 0.75	139 34.75	63 15.75	158 39.50	739 16.07
Celtis T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	1 0.25	1 0.25	3 0.75	0.0 0.00	0.0 0.00	4 1.00	25 6.25	1 0.25	0.0 0.00	35 0.76
Cyperaceae T/mens. %	65 16.25	55 13.75	4 2.00	4 1.00	3 0.75	1 0.25	1 0.25	1 0.25	6 1.50	21 5.25	34 8.50	33 8.25	228 4.96
Eucalyptus T/mens. %	0.0 0.00	9 2.25	9 4.50	54 13.50	44 11.00	17 4.25	33 8.25	45 11.25	4 1.00	3 0.75	3 0.75	0.0 0.00	221 4.80
Hovenia T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	2 0.50	17 4.25	0.0 0.00	19 0.41
Ligustrum T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	1 0.50	0.0 0.00	1 0.25	0.0 0.00	1 0.25	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	4 1.00	2 0.50	9 0.1:
Mangifera T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	99 24.75	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	2 0.50	3 0.75	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	104 2.26
Morus T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	2 0.50	15 3.75	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	17 0.37
Myrtaceae T/mens. %	0.0 0.00	1 0.25	4 2.00	1 0.25	1 0.25	1 0.25	3 0.75	11 2.75	10 2.50	2 0.50	78 19.50	1 0.25	113 2.46
Parietaria T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	1 0.25	1 0.25	1 0.25	6 1.50	11 2.75	6 1.50	18 4.50	2 0.50	0.0 0.00	46 1.00
Plantago T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	1 0.25	0.0 0.00	4 1.00	18 4.50	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	23 0.50
Platano T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	12 3.00	16 4.00	2 0.50	0.0 0.00	0.0 0.00	30 0.65
Psapium T/mens. %	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	21 5.25	0.0 0.00	21 0.46
Poaceae T/mens. %	77 19.25	63 15.75	33 16.50	43 10.75	81 20.25	44 11.00	22 5.50	34 8.50	11 2.75	28 7.00	63 15.75	86 21.50	585 12.72
Pinaceae T/mens. %	0.0 0.00	1 0.25	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	33 8.25	47 11.75	11 2.75	0.0 0.00	0.0 0.00	0.0 0.00	92 2.00
Trema T/mens. %	27 6.75	45 11.25	2 1.00	9 2.25	1 0.25	1 0.25	1 0.25	2 0.50	0.0 0.00	14 3.50	16 4.00	15 3.75	133 2.89
No identif. T/mens. %	124 31.00	122 30.50	60 15.00	77 19.25	247 61.75	308 77.00	287 71.75	200 50.00	306 76.50	139 34.75	90 22.50	100 25.00	2060 44,78

TABLA 3: Frecuencia polínica relativa de árboles - arbustos y herbáceas

Meses	Arboles-arbustos (%)	Herbáceas (%)
Enero	31	38
Febrero	36	33,5
Marzo	48	22
Abril	59,8	20,8
Mayo	15	23,3
Junio	8	15
Julio	18,8	9,5
Agosto	36,3	13,8
Noviembre	12,8	10,8
Octubre	46,8	18,5
Noviembre	50,8	26,8
Diciembre	44	31

TABLA 4: Calendario polínico preliminar, ciudad de Posadas, Misiones, año 1993.

	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Amaranthaceae	•	•	•	•		•	•				•	•
Asteraceae	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Cecropia spp.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Celtis spp.				•	•	•			•	•	•	
Chenop.-Amaranth.	•	•	•	•	•	•	•					
Cyperaceae	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Eucalyptus spp.		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
Hovenia dulcis										•	•	
Ligustrum spp.			•		•		•				•	•
Mangifera indica				•				•	•			
Morus alba							•	•				
Myrtaceae		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Parietaria debilis				•	•	•	•	•	•	•	•	
Plantago spp.						•		•	•			
Platanus acerifolia								•	•	•		
Poaceae	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Psapium spp.											•	
Pinaceae		•					•	•	•			
Trema micrantha	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•

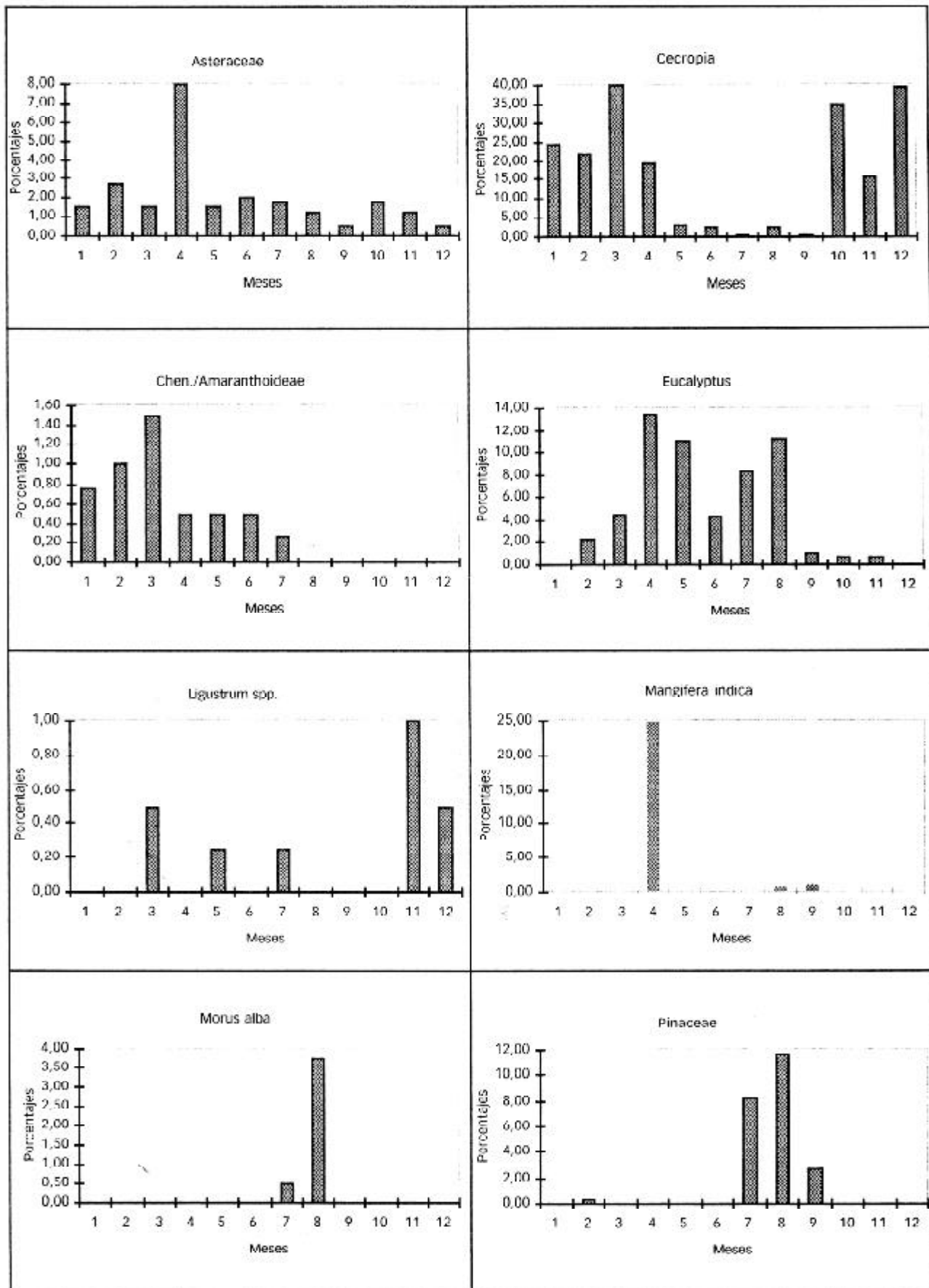


FIGURA 1: Frecuencia relativa anual de algunos tipos polínicos.

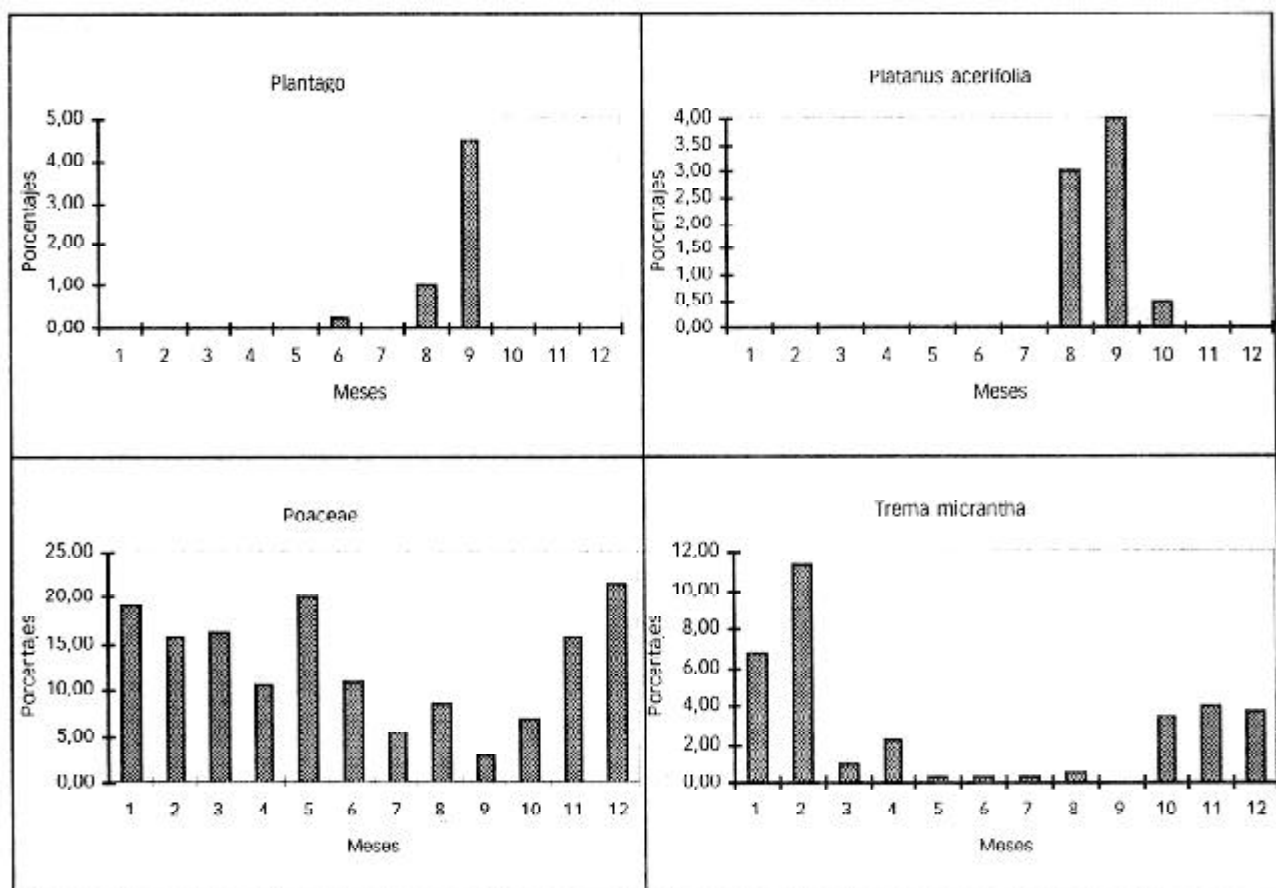


FIGURA 1: Frecuencia relativa anual de algunos tipos polínicos.

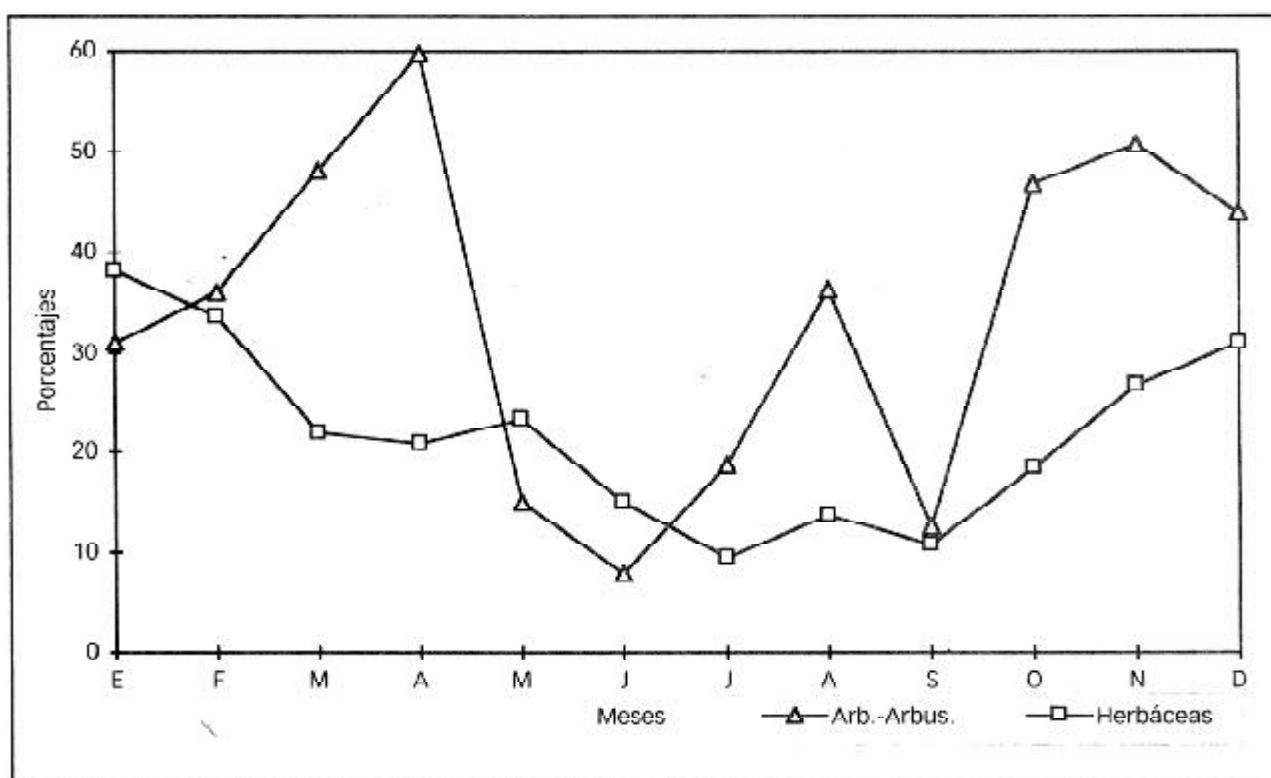


FIGURA 2: Frecuencia polínica relativa de Árboles-Arbustos y Herbáceas. Año 1993.



APORTES AL CONOCIMIENTO DE LA DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS OFIDIOS EN LA PROVINCIA DE MISIONES

Stetson, R. E. / Insaurrealde, D.R. / Benítez, P. / Pividori, N.

CONTRIBUTIONS TO THE KNOWLEDGE OF THE GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF SNAKES IN THE PROVINCE OF MISIONES

ABSTRACT

This paper presents the latest findings regarding the distribution of snakes in the Misiones provincial area. The research work was carried out from April 1988 to October 1996.

The main objective, intended to deepen the studies associated with the distribution of species and to update the data already existing in official files.

The approach selected combined, field and laboratory work with a bibliographical review of investigations done by other researchers in the provincial area.

To date, 147 specimens have been collected in 12 districts belonging to the following families Elapidae, Viperidae, Typhlopidae, Colubridae and Anomalepididae.

KEY WORDS: Ophidia, collection, identification, provincial distribution.

RESUMEN

Este trabajo, presenta las últimas novedades encontradas acerca de la distribución de la ofidiofauna en el ámbito provincial, y fue llevado a cabo desde abril de 1988 hasta octubre de 1996.

El objetivo fue profundizar y actualizar el conocimiento de la distribución de las especies en la provincia de Misiones.

Se obtuvieron los datos a través del trabajo de campo y la revisión bibliográfica de las investigaciones desarrolladas por otros investigadores en el ámbito provincial.

Hasta la fecha, se colectaron 147 ejemplares en doce Departamentos, pertenecientes a las siguientes familias: Elapidae, Viperidae, Typhlopidae, Colubridae y Anomalepididae.

PALABRAS CLAVES: Ofidios, colección, identificación, distribución provincial.

INTRODUCCIÓN

Existe diversa bibliografía referida a la fauna reptiliana de la provincia de Misiones. La mayoría son trabajos que hacen consideraciones de algunas especies en particular como novedad zoogeográfica, entre los que podemos mencionar a Cranwell (1942; 1945) (5), Barrio (1942) (2).

Otras son listados de especies para la Argentina y/o Sudamérica, como los de Serié (1936) (10), Berg C. (1899) (3), Peters J. y Oreja M. B. (1970) (9), Gallardo (1986) (7), Williams J. D. y Francini F. (1991) (13). Algunos de ellos sólo mencionan la provincia de Misiones sin precisar localidad.

También se cuenta con listados logrados en los relevamientos faunísticos de Urugua-í (1987) y del Área de influencia de la Represa Yacyretá en Misiones (1991).

Entre los autores más recientes pueden mencionarse a Acosta et al., 1994 (1); Giraudo y Abranson, 1994 (8); Chebez, 1996 (3); Stetson, 1993 (11), Stetson et al., 1994 (12). Del análisis de este material surge la necesidad de un estudio más profundo para averiguar la forma en que las especies se distribuyen actualmente, información ésta que servirá también para conocer el modo en que las modificaciones del medio ambiente, a causa del aprovechamiento de los recursos naturales, inciden en la presencia de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el logro de los objetivos, se realizaron salidas de campo a los Departamentos: Capital, Apóstoles, Oberá, Libertador General San Martín, Eldorado, Iguazú, Cainguás, Leandro N. Alem, 25 de Mayo, San Pedro, Guaraní y Candelaria, donde se procedió a la captura de ejemplares de acuerdo con normas tradicionales. Se colectaron ejemplares muertos como producto del tránsito vehicular, en las rutas de acceso a las distintas localidades, entre las que se encuentran las Rutas Nacionales N° 12; 14; 105 y las Provinciales N° 1; 5; 7; 14; 15; 17; 20; 204; 212; 220.

También se contó con la colaboración de colectores, en las localidades de General Alvear en el Departamento Oberá y Línea Mbarigüí, en el Municipio de Puerto Rico del Departamento San Martín.

El área más exhaustivamente relevada por los autores fue la ciudad de Posadas, en el Departamento Capital, debido a que es el lugar donde tiene asiento el Proyecto de Investigación.

Se confrontó la información obtenida de campo, con la existente en la bibliografía, Acosta et al., 1994 (1); Giraudo y Abranson, 1994 (2); Chebez, 1996 (3); Stetson, 1991 (4).

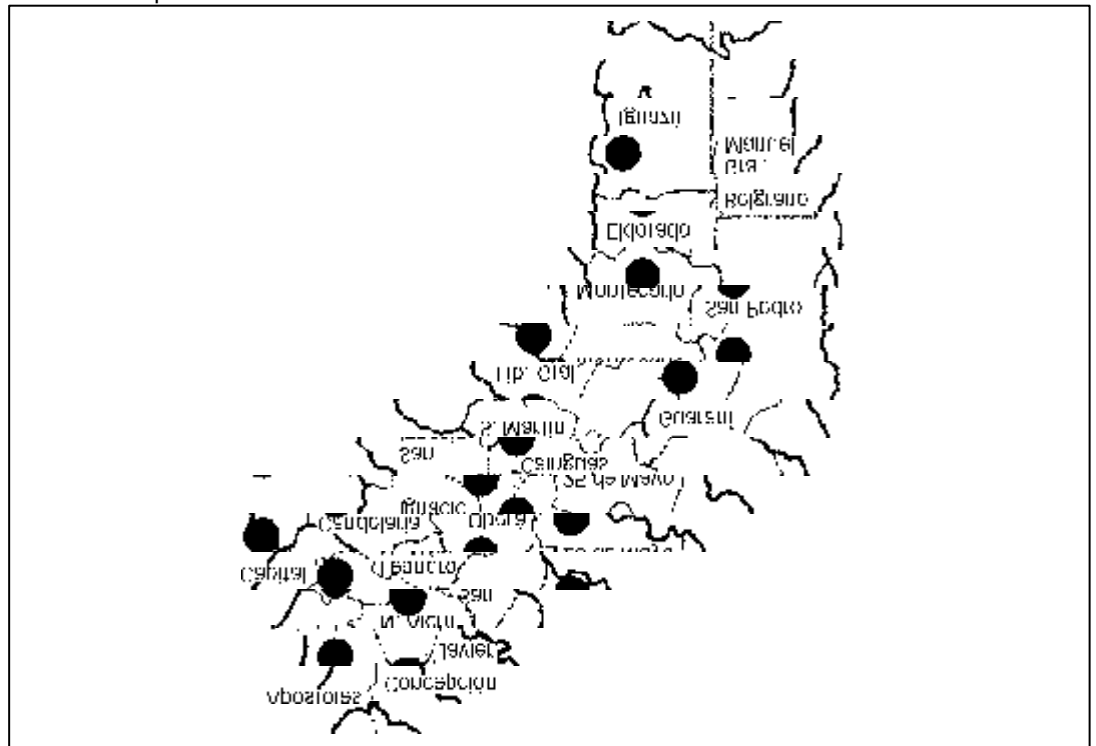


FIGURA 1 Mapa de los Departamentos Muestreados

RESULTADOS

La información obtenida, se refiere a la ofidiofauna registrada en veintidós localidades en doce Departamentos de la Provincia de Misiones.

Los sitios muestreados comprenden fundamentalmente áreas rurales (chacras y campos), en menor grado balnearios y se suma material obte-

nido en el Parque Provincial Moconá y en el Área Experimental Guaraní, perteneciente a la Universidad Nacional de Misiones, a cargo de la Facultad de Ciencias Forestales, con asiento en la ciudad de Eldorado.

La lista de especies colectadas se encuentra volcada en la TABLA N° 1, ordenada por familia y por Municipio.

TABLA N° 1: Ofidios colectados en la Provincia de Misiones (Argentina)

Municipio	Departamento	Especies colectadas
Posadas	Capital	Familia Viperidae <i>Bothrops alternatus</i> Familia Anomalepididae <i>Liotyphops ternetzii</i> Familia Colubridae <i>Apostolepis dimidiata</i> <i>Atractus reticulatus</i> <i>Boiruna maculata</i> <i>Helicops infrataeniatus</i> <i>Leptophis ahaetulla</i> <i>Liophis jaegeri coraliventris</i> <i>Liophis meridionalis</i> <i>Liophis miliaris</i> <i>Liophis poecilogyrus</i> <i>Mastigodryas bifossatus*</i> <i>Oxyrhopus guibei</i> <i>Philodryas aestivus subcarinatus</i> <i>Philodryas olfersi</i> <i>Philodryas patagoniensis</i> <i>Sibynomorphus turgidus</i> <i>Thamnodynastes hypoconia</i> <i>Waglerophis merremi</i>
Garupá	Capital	Familia Viperidae <i>Bothrops alternatus</i>
Colonia Gral. Alvear	Oberá	Familia Viperidae <i>Bothrops neuwiedii diporus</i> Familia Elapidae <i>Micrurus corallinus</i> <i>Micrurus frontalis altirostris</i> Familia Colubridae <i>Atractus taeniatus</i> <i>Atractus reticulatus</i> <i>Liophis poecilogyrus</i> <i>Philodryas olfersi</i> <i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>
B. Santa Rita	Oberá	Familia Colubridae <i>Oxyrhopus guibei</i>
Los Helechos	Oberá	Familia Colubridae <i>Liophis poecilogyrus</i>

Línea Mbarigüí (Puerto Rico)	Lib. Gral. San Martín	Familia Colubridae <i>Mastigodryas bifossatus</i> <i>Oxyrhopus guibei</i>
Puerto Rico	Lib. Gral. San Martín	Familia Viperidae <i>Crotalus durissus terrificus</i> Familia Elapidae <i>Micrurus corallinus</i> <i>Micrurus frontalis altirostris</i>
Eldorado	Eldorado	Familia Viperidae <i>Crotalus durissus terrificus</i>
Puerto Iguazú	Iguazú	Familia Viperidae <i>Crotalus durissus terrificus</i>
Aristóbulo del Valle	Cainguás	Familia Viperidae <i>Bothrops neuwiedii diporus</i> <i>Crotalus durissus terrificus</i>
Cerro Moreno (Aristóbulo del Valle)	Cainguás	Familia Colubridae <i>Oxyrhopus guibei</i>
Cerro Azul	Leandro N. Alem	Familia Viperidae <i>Bothrops neuwiedii diporus</i> Familia Elapidae <i>Micrurus frontalis altirostris</i> Familia Colubridae <i>Oxyrhopus guibei</i> <i>Philodryas olfersi</i>
Alba Posse	25 de Mayo	Familia Elapidae <i>Micrurus frontalis altirostris</i>
Mártires	Candelaria	Familia Colubridae <i>Oxyrhopus guibei</i>
Candelaria	Candelaria	Familia Colubridae <i>Philodryas patagoniensis</i>
San Vicente	Guaraní	Familia Colubridae <i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>
Apóstoles	Apóstoles	Familia Colubridae <i>Mastigodryas bifossatus</i>
Azara	Apóstoles	Familia Viperidae <i>Bothrops neuwiedii diporus</i> Familia Colubridae <i>Sibynomorphus ventrimaculatus</i>
Reserva Forestal de la UNaM	Guaraní	Familia Viperidae <i>Bothrops neuwiedii diporus</i> <i>Bothrops jararacussu</i>
Colonia Paresida (El Soberbio)	Guaraní	Familia Colubridae <i>Atractus taeniatus</i> Familia Typhlopidae <i>Typhlops brongersmianus</i>
Parque Provincial Moconá	San Pedro	Familia Elapidae <i>Micrurus frontalis altirostris</i> Familia Typhlopidae <i>Typhlops brongersmianus</i>
San Pedro	San Pedro	Familia Colubridae <i>Thamnodynastes strigatus</i> <i>Mastigodryas bifossatus</i>

*Sólo se obtuvo la muda (camisa de serpiente), por lo que la clasificación es provisional.

Se pudo constatar la presencia de 27 especies, en las 22 localidades muestreadas, pertenecientes 2 a la familia Elapidae, 4 a la familia Viperidae, 1 de la familia Typhlopidae, 18 a la familia Colubridae, y 2 a la familia Anomalepididae.

Los resultados obtenidos hasta la fecha constituyen datos parciales, que serán enriquecidos con el desarrollo y avance de las tareas propuestas para el logro de los objetivos, para lo cual se ampliarán las áreas de muestreo y profundizarán los estudios taxonómicos poniendo énfasis en los Departamentos de los cuales se tiene menor información.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron novedades acerca de la distribución geográfica de las siguientes especies: *Oxyrhopus guibei*, para los Departamentos de Oberá, Libertador General San Martín, Leandro N. Alem y Candelaria; *Liophis poecilogyrus* para el Depto. Oberá; *Mastigodryas bifossatus* para los Deptos. Libertador General San Martín, Apóstoles y San Pedro; *Philodryas olfersi* para el Depto. Leandro N. Alem; *Philodryas patagoniensis* para el Depto. Candelaria; *Sibynomorphus ventrimaculatus* para los Deptos. Guaraní, Apóstoles y Oberá; *Atractus taeniatus*, para el Depto. Guaraní; *Typhlops brongersmianus*, para el Depto. San Pedro y Guaraní; *Atractus reticulatus* para el Depto. de Oberá; *Liotyphlops ternetzii*, Boiruna maculata y *Leptophis ahaetulla* para el Depto. Capital. Se determinó fehacientemente que existen vacíos de información acerca de numerosas especies en varios Departamentos de nuestra Provincia. •

STETSON, R. E.; INSAURRALDE, D. R.; BENÍTEZ, P.; PIVIDORI, N. / Proyecto de Relevamiento Herpetológico de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACOSTA, S.; GIRAUDO, A. Y MONTANELLI, S. Composición de la ofidiofauna (Reptilia: Serpentes) del Parque Nacional Iguazú, provincia de Misiones. Bol. Asoc. Herpetol. Arg. 10 (1):6-8. 1994.
2. BARRIOS, A., Rev. Arg. Zoogeografía 2 (2):1:1-13. 1942.
3. BERG, C. Fauna Herpetológica Argentina, An. Mus. Nac. Bs. As. Tomo VI (2-III). 1899.
4. CHEBEZ, J. C. Fauna Misionera. Editorial. L.O.L.A. Bs. As. 1996.
5. CRANWELL, J. Zoogeografía 3 (1-2): 64. 1942.
6. CRANWELL, J. Rev. Arg. Zoogeografía 5: 123. 1945.
7. GALLARDO, J. M. La diversidad de la herpetofauna en la selva subtropical misionera. An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso 17: 153-159. 1986.
8. GIRAUDO A. y ABRANSON R. Comentarios sobre los ofidios registrados en una localidad del centro de la Provincia de Misiones. Bol. Asoc. Herpetol. Arg. 10 (1): 8-10. 1994.
9. PETERS, J. A. y OREJA, M. B. Catalogue of the Neotropical Squamata: Part I. Snakes Bull. 297 Smithsonian Insst. U.S. Nat. Mus. Bull. 1-347.
10. SERIÉ, P. Distribución Geográfica de los Ofidios Argentinos. Obra Cincuentenario Inst. Mus. de la Univ. Nac. de La Plata: 33-6. 1936.
11. STETSON, R. E. Cita puntual de *Apostolepis erythronotus* Peters, Monats, Akad. Wiss, 1880; (Ophidia, Colubridae) en Argentina. Boletín de la AHA, Vol. 7 N° 1: 199.
12. STETSON, R. E.; INSAURRALDE, D.; KRAUZUK, E.; STOLAR, C. y BALATORRE, S. Estudio de vertebrados del área experimental Guaraní; Actas de la VII Jornadas Técnicas: Ecosistemas Forestales Nativos: Uso, Manejo y Conservación, Eldorado, Prov. de Misiones, Argentina. 1993.
13. WILLIAMS, J. D. y FRANCINI, F. A Checkklist of Argentine. Snake Bol. del Mus. Reg. de Cs. Nat. Torino Vol. 9 N° 1: 55-9. 1991.