

Revista de Ciencia y Tecnología

Educación Científica y Tecnológica, Ingeniería, Tecnología e Informática,

Genética y Biología, Salud

AÑO 16 / Nº 21 / 2014

ÍNDICE

- 5 Los conocimientos matemáticos en el umbral de la universidad / Silvia Caronía, Marta Rivero, Roxana Operuk, Cristina Mayol.
- 12 Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxosporapustulata* sobre *Rhizoctonia Solani* / Daymara I. Vaillant Flores, Carlos R. Romeu Carballo, Marlene Gómez Peralta, Rebeca Ramírez Ochoa.
- 15 Selección de condiciones de cultivo óptimas para la secreción de endoglucanasas por cepas de *Trichoderma* nativas de Misiones / María L. Castrillo, Gustavo A. Bich, Pedro D. Zapata, Laura L. Villalba.
- 20 *Enterococcus* en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad / Amada B. Pucciarelli, Alberto Tessari, Martha H. von Specht.
- 27 Efecto de cultivos lácticos sobre el desarrollo a bajas temperaturas de microorganismos causantes de ETA / Silvia G. Ortiz, Laura B. Duverne, Oscar C. López, Silvia Raffellini, María C. Mans.
- 33 Efecto del almacenamiento congelado sobre panificado de fécula de mandioca: propiedades físicas, texturales y sensoriales / Laura B. Milde, Fernando A. Cabral, Romina Ramírez.
- 40 Internet del futuro. Desafíos y perspectivas / Eduardo O. Sosa, Diego A. Godoy / Trabajo de Revisión.
- 47 Propiedades eléctricas de metilésteres obtenidos de aceites vegetales entre 20Hz y 2MHz / Julián Corach, Patricio A. Sorichetti, Silvia D. Romano.
- 53 Análisis de la cadena de ricino para la producción de biodiesel / Fernando Putti, Nayeley Macini, Rafael Ludwig.
- 58 Caracterización de desechos de fundición arqueológicos: la metalurgia colonial en fundiciones 2, Rinconada, Jujuy / M. Florencia Becerra, Nicolás Nieva, Carlos I. Angiorama.
- 65 Estudio de la morfología y calidad cristalina de Zn Se monocristalino / Javier L. M. Núñez García, Adriano Geraci, Alfredo J. Tolley, María Cristina Di Stefano, Edgardo Cabanillas, Ana María Martínez, Raúl D'Elía, Eduardo Heredia, Alicia B. Trigubo.
- 70 Impacto en el presupuesto de medicamentos para el tratamiento de la cardiopatía isquémica, debido al aumento de camas en la unidad de terapia intensiva de un Hospital Provincial. Comparación entre los Años 2009 y 2011 / Carina S. Chichalof, Roberto Bagnasco, Carolina B. Romañuk.
- 75 Instrucciones a los autores.
- 78 Instructions to authors.
- 81 Instruções aos autores.
- 84 Confirmación de Autoría y Derechos de Publicación. / Confirmation of Authorship and Publication Regulations. / Confirmação de Autoria e Direitos de Publicação.

• **SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO. FCEQyN-UNaM**

Secretario: Dr. Dardo A. Martí.

• **REVISTA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

COMITÉ EDITORIAL

Editor principal: Dra. Alicia E. Ares. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Misiones. Argentina.

Editor adjunto: Dr. Miguel E. Schmalko. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Misiones. Argentina.

CONSEJO DE EDICIÓN

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. UNaM. Argentina.

Dr. Alberto S. Fenocchio.

Dr. Dardo A. Martí.

Dra. Laura A. Ramallo.

Dra. Marina Quiroga.

Dra. Laura L. Villalba.

Dr. Pedro D. Zapata.

Dra. Ana María Zoppi.

Dr. Eduardo O. Sosa (Invitado).

Dra. Claudia Mendez (Invitada).

Instituciones de la Argentina

Mgter. Nilda Josefa Corral. Facultad de Humanidades. UNNE. Resistencia. Chaco.

Dra. Silvia Di Genaro. Universidad Nacional de San Luis. San Luis. Argentina.

Dr. Roque Hours. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Dr. Rodolfo Mascheroni. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. La Plata. Argentina.

Dr. Jorge E. Monzón. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. UNNE. Corrientes. Argentina.

Dra. Silvia Resnik. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

Dr. José G. Seijo. Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura. UNNE, Corrientes. Argentina.

Instituciones del Exterior

Dra. María Sol Brassesco Annichini. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Brasil.

Dr. Rafael A. Auras. Michigan State University, Michigan, Estados Unidos.

Dra. Marusia Stefanova. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).

Dr. Andre Luiz Ferraz. Departamento Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Brasil.

Mgter. Mirtha Lucía Abraham Nazif. Univ. Academia de Humanismo Cristiano. Providencia, Santiago de Chile.

Dra. Pilar López Ruiz. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid. España.

Dr. José Ignacio Paláez Sánchez. Universidad de Málaga. España.

Revista de Ciencia y Tecnología on line: www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt. Hecho el depósito de la Ley 11723. Impreso en Argentina. ISSN de la revista impresa: 0329-8922. ISSN de la revista electrónica: 1851-7587.

Esta Revista es un servicio de la SECIP. 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 de la Fundación Fac. Cs. Ex. Qcas. y Naturales.

Toda correspondencia relacionada a la Revista debe ser dirigida a: Revista de Ciencia y Tecnología. Félix de Azara 1552, 3300, Posadas, Misiones, Rep. Argentina. Teléfono: 54-376-4422186, Fax: 54-376-4425414, E-mail: recyt@fceqyn.unam.edu.ar.

Revista de periodicidad semestral.

EQUIPO EDITORIAL

Armado de interior y tapa: Javier B. Giménez.

Revisión de texto: Julia E. Renaut.

Revisión de texto en inglés: Responsable: Lic. María C. Benassi; Docentes: Prof. María E. Sobrero, Lic. Silvia Flores, Lic. Martha S. Godoy, Prof. María L. Stefañuk, Prof. María F. Picasso.

Revisión de texto en portugués: Prof. Cristina S. Pastori.

Colaboradores técnicos: ASC. Mónica R. Mounier, ASC. Víctor R. Narvaez.

COMITÉ DE REVISIÓN EXTERNO INGENIERÍA, TECNOLOGÍA E INFORMÁTICA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA, SALUD

Bqca. Beatriz Lerman. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Dr. Alberto Acevedo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA.

Dr. Alejandro Raul Trombert. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Dr. Edgardo Cabanillas. Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA).

Dr. Eduardo Acosta. Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires.

Dr. Héctor Nelson Acosta. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

Dr. Luís Roberto Almeida Gabriel Filho. Campus Experimental de Tupã – CET/UNESP (Brasil).

Dr. Sérgio Silva Braga Júnior. Campus Experimental de Tupã – CET/UNESP (Brasil).

Dra. Analía Abraham. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata.

Dra. Bertalina Muñio García. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal - INISAV (La Habana, Cuba).

Dra. Cristina Gaudio de Allori. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Dra. Ester Chamorro. Facultad Regional Resistencia de la Universidad Tecnológica Nacional.

Dra. Gabriela Diosma. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata.

Dra. Laura López de Bellesi. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Dra. María Luz Traverso. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Dra. Marta Vattuone. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Dra. Marta Yasem de Romero. Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de Tucumán.

Dra. Martha Medvedeff. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones.

Dra. Nebel Silvana Moscoso. Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales del Sur de la Universidad Nacional del Sur.

Dra. Sylvia Fernández Pavia. Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo (Michoacán, México).

Dra. Viviana O. Salvadori. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) - Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Mgter. Margarita del Valle Veliz. Universidad Nacional de Tucumán.

Mgter. María Teresa Alcalá. Universidad Nacional de Tucumán.

Los conocimientos matemáticos en el umbral de la universidad

Mathematical knowledge on the university threshold

Silvia Caronía^{1,*}, Marta Rivero¹, Roxana Operuk¹, Cristina Mayol¹

1- Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: silvca2@gmail.com

Resumen

Esta investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Se inscribe en la teoría de las Situaciones Didácticas de Brousseau, en la que se trabajó sobre los errores considerados como obstáculos para el aprendizaje. Se trató de ver su emergencia en los conocimientos matemáticos de ingresantes de las cohortes 2003-2004. Para ello se analizaron respuestas dadas a evaluaciones tomadas en el curso de ingreso. Además, para el análisis de su persistencia se administraron las mismas o similares pruebas luego de un año de cursado como alumno regular de la Facultad. Se constató la existencia de estos errores que pudieron ser tipificados. Además se advirtió que responden a patrones de comportamientos estabilizados y permanentes. Por ende, resistentes a las modificaciones que supondría el aprendizaje.

Palabras clave: Examen de ingreso; Obstáculos epistemológicos; Errores.

Abstract

A research study was carried out at the School of Exact, Chemical and Natural Sciences at the State University of Misiones. It is in line with Brousseau's Didactic Situations, where errors are considered as obstacles for learning. This theory was used to analyze the mathematical knowledge of entrant students of cohorts 2003-2004. We analyzed answers given to assessment during the Entry Course. The same or similar tests were given after one year of attendance as regular students. Occurrence of learning errors was detected and categorized. They followed stable and permanent behavior patterns, therefore they were resilient to the learning process.

Keywords: Entry exam; Epistemological obstacles; Errors.

Justificación de la investigación

Los alumnos ingresantes a una carrera universitaria, luego de su paso por los niveles E.G.B. 3 y Polimodal, llegan con conocimientos que según Tenti Fanfani, y Gomez Campo, (1989) [1] están conformados por “un conjunto amplio de competencias que se encarnan en forma unitaria en el sujeto”, creencias y habilidades determinadas que inciden en sus maneras de proceder.

Por otra parte, estos niveles de educación suponen la preparación de ciudadanos con capacidades y competencias suficientes para, por ejemplo, iniciar estudios a nivel Universitario. Sin embargo, el ingreso y la permanencia en el nivel referido presentan dificultades.

El examen de ingreso, en general, se percibe como un instrumento de medición para “conocer” el estado inicial de saberes que poseen los ingresantes y dar cuenta, en algunos casos, de quiénes están en condiciones de comenzar el cursado de las materias del primer año de la

carrera elegida. Hasta el momento informa un “estado”, ¿pero después, qué se hace o se puede hacer? La evidencia empírica es que, aún después de superarlo, se siguen presentando obstáculos en el aprendizaje. ¿Cuáles son los errores detectados más frecuentes?

En el caso de la Universidad Nacional de Misiones se implementan prácticamente en todas sus Unidades Académicas, acciones que se corresponden con una diversidad de modalidades de ingreso. A continuación describimos el que corresponde a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, tomada como ámbito empírico de esta investigación.

Esta Unidad Académica cuenta con carreras de Profesores en Matemática, Física y Biología, carreras de Ingeniería Química, Bioquímica, Farmacia, Genética, Enfermería, e Informática. La duración del “Curso de Ingreso” es de aproximadamente 4 semanas. La totalidad de los alumnos deben acreditar el módulo de “Matemática”,

además de otros módulos específicos según la carrera. A partir del año 2001, se incorporó el módulo de “Estrategias de Aprendizaje” para todas las carreras.

En esta Unidad Académica hasta el año 2003 el examen de ingreso era obligatorio, pero no restrictivo, es decir, la evaluación se transformaba sólo en una prueba diagnóstica.

A partir del año 2004 el examen fue obligatorio, restrictivo y eliminatorio. Es por ello que se les otorgó a los alumnos un mayor número de oportunidades para lograr su ingreso.

El problema o las preguntas de esta investigación

Una vez que los alumnos ingresan a la facultad surgen nuevos problemas. Las dificultades detectadas en las materias de primer año señalan serios problemas de aprendizaje que obstaculizan la continuación de los estudios, produciéndose en el inicio del dictado una importante deserción.

El aprendizaje implica necesariamente rupturas cognitivas, acomodaciones, cambio de modelos implícitos (concepciones), de lenguajes, de sistemas cognitivos. No obstante algunas ideas resisten y persisten. Constituyen eso que llamamos obstáculos en el proceso del conocimiento. Esos obstáculos, ¿están en el modo en que los alumnos incorporan, elaboran, transforman y aplican esos saberes?, ¿se estudia en qué medida incide y si se modifican los conocimientos básicos de los alumnos, en el transcurso del cursado de las asignaturas correspondientes?, ¿los errores más frecuentes que se detectan, se mantienen a lo largo de los cursados o van sufriendo transformaciones?, ¿se van superando esos errores?

Por todo lo manifestado, este proyecto de investigación pretendió ir más allá de la “medición” del porcentaje de alumnos que ingresan a una determinada carrera. Se ha conjeturado que el tiempo de preparación y puesta a punto de niveles de conocimientos como de capacidades, aptitudes, no pueden ser resumidas en un instante (la evaluación); y aún si los alumnos logran el ingreso, tampoco es garantía de inicio en la mejor de las condiciones ni de preparación para el entendimiento de las materias.

Se hizo entonces necesario el análisis de los conocimientos matemáticos de los ingresantes en búsqueda de respuesta a las preguntas planteadas.

Objetivos del proyecto

Los objetivos del proyecto fueron:

ANALIZAR los logros y los obstáculos en los aprendizajes matemáticos de alumnos en las etapas de ingreso y permanencia en el primer año de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. (UNaM).

CARACTERIZAR el examen de ingreso, según el nivel de cognición y capacidades en Matemática que demanda.

COMPARAR niveles de aprendizaje en el examen de

ingreso y en el examen al final del primer año, de acuerdo con aspectos de la cognición, resolución de problemas, aptitudes, tipos de instrucción, otras.

Enfoque y ámbito de la investigación

Esta investigación se enmarcó dentro de los paradigmas Descriptivo como así también Hermenéutico, Interpretativo, Reflexivo. Con las informaciones que se obtuvieron en los distintos momentos, se describieron y realizaron interpretaciones.

Se centró en la observación y estudio de dificultades comunes en el estado cognitivo de los conocimientos matemáticos en el ingreso así como la transformación que hubieran podido tener esos conocimientos, durante el transcurso del primer año de permanencia en la universidad.

Por la amplitud de la temática, en una primera instancia, se hizo necesario el primer recorte a una de las Unidades Académicas de la Universidad Nacional de Misiones: se focalizó el análisis, estudio y desarrollo en la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales¹.

El segundo recorte consistió en elegir algunas de las carreras de esta Unidad Académica, estimándose una población aproximada de 1200 alumnos, estas fueron: Profesorado en Matemática, Licenciatura en Genética e Ingeniería Química. La selección de las mismas se hizo teniendo en cuenta dos criterios: la relación más estrecha con el campo disciplinar en estudio (la Matemática)² y segundo, la Lic. Genética con una población estudiantil proveniente de distintas partes del país, cuestión que podrían aportar información más generalizada, en cuanto al grado de conocimientos con que llegaban al ingreso a la universidad.

El tercer recorte consistió en la cantidad de exámenes analizados. En el caso del Ingreso 2003³ como se efectuó una sola evaluación, se tomaron la totalidad de los mismos. En cambio en el Ingreso 2004, el examen fue obligatorio y restrictivo. Es por ello que se otorgó un mayor número de oportunidades. Se tomaron dos evaluaciones parciales durante el cursado, los que no aprobaron pasaron a un examen Integratorio. Luego, se les concedió dos recuperatorios más. Al ser un número elevado de exámenes a analizar, la decisión de este grupo de investigación fue la de considerar solamente los exámenes del Integratorio.

Marco Teórico

¿Qué se piensa del significado del error? ¿Cómo lo conciben algunos investigadores?

1- Se toma esta facultad como prueba piloto además porque los docentes involucrados en el proyecto pertenecen a la misma.

2- Se ha considerado que las materias de “matemática” del 1º año, son compatibles, aunque las del Profesorado se estudian con mayor profundidad. No se las observó por la troncalidad, sino como “herramientas”, ya que por ejemplo, en el área del álgebra compatibilizan las carreras planteadas, de acuerdo a los contenidos mínimos básicos considerados.

3- Fue obligatorio, pero no restrictivo, es decir la evaluación se transformó solo en una “prueba diagnóstica”.

Según Charnay. y Mante (1990-1991) [2], los errores se consideran significativos, y poseen las características de ser “reproducibles”, cuando se manifiesta una cierta persistencia. Por lo tanto no son considerados al azar, o por distracción. Además sostienen que estos hechos no son aislados pueden ponerse en relación con otros, formando una suerte de red o de sistema de errores.

El análisis y la interpretación de los errores y su origen suponen la referencia a un marco teórico, que está influido por las concepciones del aprendizaje y de la matemática. De acuerdo con las lecturas realizadas se observó que las miradas e interpretaciones difieren según la perspectiva conductista o la influida por el constructivismo.

En la concepción conductista, la responsabilidad del error se atribuye al alumno. Para este pensamiento conductista los errores se encaran volviendo a aprender sus lecciones y para los errores de “saber-hacer”, se proponen ejercicios de entrenamiento graduales.

En la perspectiva constructivista, el error es la expresión de una forma de conocimiento. Señala Brousseau (1983) [3].

El error no es sólo el efecto de la ignorancia, de la incertidumbre, del azar como se cree en las teorías empiristas o conductistas del aprendizaje, sino el efecto de un conocimiento anterior, que tenía su interés, su éxito, pero que, ahora, se revela como erróneo, o simplemente inadaptado. Los errores de este tipo no son erráticos, ni imprevisibles; están constituidos como obstáculos. Tanto en el funcionamiento del maestro como en el del alumno, el error es constitutivo del sentido del conocimiento adquirido. (P. 166).

Este investigador distingue tres orígenes fundamentales de esos obstáculos que se encuentran en la enseñanza de las matemáticas:

- Un origen ontogenético, correspondiente a los obstáculos unidos a las limitaciones de las capacidades cognitivas de los estudiantes.
- Un origen didáctico, para los obstáculos ligados a las opciones del sistema de enseñanza.
- Un origen epistemológico, los que están intrínsecamente relacionados con el concepto.

Así mismo, Artigüe, (1990) [4], se refiere a la noción de obstáculo diciendo:

Por nuestra parte, retendremos dos aspectos de la noción de obstáculo epistemológico según (Bachelard, 1938):

- La aparición de los obstáculos tienen un carácter inevitable [...].
- La repetición de su aparición en la filogénesis y la ontogénesis de los conceptos.

Algunas de nuestras preguntas se fueron precisando en los siguientes términos: ¿cuáles son los errores más frecuentes detectados?, ¿qué características tienen?, ¿cuál

es su consistencia interna en los procesos de pensamiento que revelan?, ¿existe una cierta regularidad? referida, por ejemplo, a la transferencia de tipo algebraico, argumentativo, simbólico, etc.

De todos los conocimientos matemáticos evaluados en las pruebas de ingreso, el estudio se centró en el análisis de las respuestas a los protocolos relacionadas con el Álgebra y algunas cuestiones referidas a la Aritmética, siendo ésta una decisión operativa del grupo de investigación, para realizar un recorte del problema.

Se analizaron en forma individual cada una de las pruebas a fin de: identificar y tipificar los errores cometidos, y a partir de ellos inferir en “qué estuvo pensando cada alumno” cuando respondió las consignas dadas. Además, se detectaron las regularidades y coherencias en esos procesos considerados erróneos.

Transcurrido un año del cursado se diseñó una 2ª evaluación para analizar el “estado” en el que se encontraban los conocimientos de la población en estudio. Se partió para dicha confección, de los mismos contenidos evaluados en el ingreso, con el fin de analizar por ejemplo si cometió el mismo error, si lo pudo superar o si tuvo “nuevos errores”.

Cabe aclarar que para las comparaciones de las dos evaluaciones surgieron dos sucesos: respecto a los ingresantes 2003 no se presentaron inconvenientes, se pudo tomar la segunda evaluación coincidente con la primera.

En el caso de la cohorte 2004, debido a que algunos estudiantes aprobaron en instancias distintas de evaluación para la comparación no se analizaron “los mismos ejercicios”; pero al ser éstos de la misma naturaleza, no se advirtió imposibilidad de continuar con dicho análisis.

Resultados

1.- ¿Cuáles fueron los errores detectados?

Para el análisis de los errores que se manifestaron en los exámenes de los ingresantes, se tomaron como referencia las investigaciones realizadas por autores como: Kieran (1989) [5]; Berté (1999) [6]; Panizza, Sadovsky y Sessa (1997) [7], Engler (2004) [8] con el fin de cotejar si las cuestiones tratadas por los mismos, son similares a las que se pudieron advertir en esta población de ingresantes. Siguiendo la tipificación efectuada por estos autores, realizamos una nueva clasificación, que presentamos a continuación.

La aplicación de propiedades: los alumnos estiman posible la aplicación de la propiedad distributiva en los casos de: la raíz, la potencia, el cociente, respecto de la suma, entre otros. Estos tipos de errores están asociados a un pensamiento lineal, lo cual obstaculiza implícitamente a otros modelos no lineales. Por ejemplo: $(a + b)^2 = a^2 + b^2$

Los manejos operatorios adecuados: otros autores lo identifican como: “errores al operar algebraicamente, [...]

empleo incorrecto de propiedades y definiciones”. Confunden no solo las aplicaciones de las propiedades sino también, las reglas de las operaciones.

El orden en que efectúan las operaciones: los estudiantes consideran que el orden del cálculo que deben realizar es de izquierda a derecha, de la manera como se presentan los términos. Vale explicitar desde la aritmética, dificultades relacionadas con la jerarquía de las operaciones, cuestiones éstas que influirán cuando operen algebraicamente. A errores de este tipo, algunos autores los consideran como: “errores técnicos”.

La forma de ver el signo igual: los alumnos visualizan al signo igual como un simple separador de las secuencias de operaciones que realizan para llegar al resultado. Además lo conciben como la “señal de hacer algo”. Esta dificultad es un obstáculo a la hora de trabajar algebraicamente, porque produce la violación de las propiedades de simetría y transitividad de la igualdad.

La no-aceptación de la falta de cierre: los alumnos tienen arraigada la aritmetización en los problemas algebraicos, ostentan la necesidad de arribar a un número concreto, igualan a un número, en general a cero, “no se dan cuenta que el procedimiento es a menudo la respuesta”. Los alumnos “tratan las letras en expresiones y ecuaciones como incógnitas específicas más que como números generalizados o como variables”.

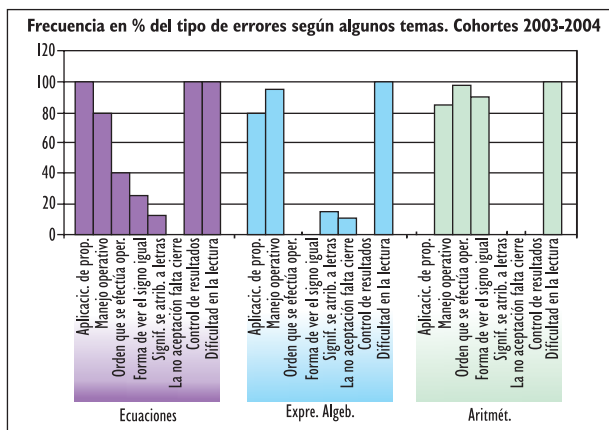
La posibilidad de “control” de sus resultados, tan pronto los estudiantes de álgebra aprenden a manejar un método formal de resolución de ecuaciones tienden a abandonar el uso de la sustitución para la verificación. A este tipo de error otros autores lo consideran como: “falta de verificación en la solución”.

La dificultad en la lectura y comprensión de los enunciados y consignas de trabajo “las pruebas de matemática también son, en alguna medida, prueba de lectura”. Otros autores lo traducen como la “interpretación incorrecta del lenguaje”.

El significado que le atribuyen a las letras: los alumnos revelan el uso de las letras como etiquetas. Esta consideración obstaculiza, por ejemplo, el significado de los términos variables en las ecuaciones algebraicas. En tal sentido los variables, por ejemplo la “X” es identificada como objeto: 5x representan 5 manzanas. En otros casos las letras son “forzadas” y son tomadas como variables, recurriendo a la sustitución por tanteo o la suposición de que pueden “reemplazar” por “algo”. Con este “significado violan la simetría”.

2.- Los errores tipificados ¿son frecuentes?

En el estudio de los errores cometidos en la prueba de ingreso, correspondiente a algunos temas básicos se analizó la frecuencia con que se produjeron, según el tipo de error encontrado. Lo expresado se observa en el siguiente gráfico:



3.- Esos errores ¿son consistentes para cada alumno?

Se toma en esta presentación un caso para analizar la coherencia interna del pensamiento del estudiante: es decir, si los errores cometidos se vinculan internamente entre sí.

- Resolver la ecuación: $3 + \sqrt[3]{8x+1} = 5$

$$3 + \sqrt[3]{8x+1} = 5$$

$$3 + \sqrt[3]{8(1)+1} = 5 \rightarrow$$

$$3 + \sqrt[3]{9} \rightarrow 3 + 2 = 5$$

Supone la “x” como variable por eso le otorga un valor igual a 1 (sustitución por tanteo). El “reemplazar” por “algo” viola la propiedad de simetría. Dificultad en “el significado que le atribuyen a las letras”.

“Error en el manejo operatorio adecuado”, confunde la definición de radicación, considera “la base 3” y busca el número al que hay que elevar para obtener 9.

- En la siguiente expresión $\frac{a^4+81}{a-3}$ determine si el cociente es exacto o no

Para $a = 0 \Rightarrow$ el cociente es exacto

$$\frac{a^4+81}{a-3} = -27 \rightarrow$$

Cuando efectúa la “simplificación” considera implícitamente la propiedad distributiva del cociente respecto de la suma. Error en “la aplicación de propiedades: modelo lineal”

Para $a = -2 \Rightarrow$ el cociente no es exacto

$$\frac{(-2)^4+81}{(-2-3)} =$$

Para $a = 2 \Rightarrow$ el cociente es exacto, porque dividimos por 1 y el resultado es el numerador

$$\frac{(2)^4+81}{(2-3)} =$$

Al no tener en claro el cociente entre polinomios y la divisibilidad de los mismos, se supuso que este alumno interpreta que: para analizar la exactitud del cociente debe arribar necesariamente a un “número”, es por ello

que sustituye la “letra” por tanteo. Comienza el análisis otorgando distintos valores, considerando a la misma como variable “a” y de acuerdo con los resultados que le ofrecen los mismos, determina la exactitud o no de la expresión.

En resumen, en este caso, se observó consistencia del error en el significado que el estudiante atribuye a las letras, como así también falta de manejos operatorios adecuados tanto en el empleo de propiedades como en el uso de las definiciones.

4.- Los errores tipificados: ¿son persistentes para el mismo alumno?

Con las dos evaluaciones realizadas, se pretendió observar y comparar la evolución en el pensamiento de cada estudiante.

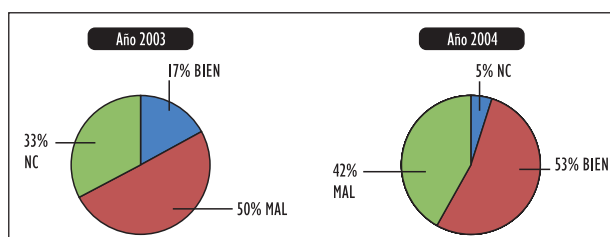
A continuación, a modo de referencia del tipo de análisis realizado se presenta el caso de un examen respondido en dos oportunidades por el mismo estudiante, luego de

2004	2005
Ejercicio Nº 3: Halle el valor de x: a) $\sqrt{4x^2 + 5} - 1 = 2x$ <i>Desarrolla bien</i> b) $1 + 2^x 5^x = \left(\frac{1}{11}\right)^{-1}$ $1 + 2^x 5^x = \left(\frac{1}{11}\right)^{-1}$ $1 + 2^x \cdot 5^x = \frac{11}{1}$ $2^x \cdot 5^x = 11 - 1$ $10x^2 = 10$ $x^2 = \frac{10}{10}$ $x = \sqrt{1}$ $x = 1$ c) $x = \frac{1}{3} \log_3 \frac{1}{9} - \log_3 \sqrt[3]{3} + \frac{1}{2} \log_3 27$ $3^{\frac{1}{3}} = \frac{1}{2}$ $x = \frac{1}{3} (-2) - \frac{1}{2} + \frac{1}{2} 3$ $x = -\frac{2}{3} - \frac{1}{2} + \frac{3}{2}$ $x = \frac{1}{3}$	Ejercicio Nº 1: Encontrar la incógnita de cada ecuación presentada. Detallar los pasos realizados y justificarlos. a) $-1 + \sqrt{4x + 1} = x$ <i>Desarrolla bien</i> b) $3^{2x-1} = 9$ Notamos variación en el procedimiento efectuado respecto a la resolución de ecuaciones exponenciales planteada en el 2004, utiliza logaritmo natural en sus procedimientos. c) $\log_a x = \log_a 9 - \log_a 4$ $\log_a x = \frac{\log_a 9}{\log_a 4}$ $x = \ln \frac{9}{4}$ $x = \ln 2.25$ $x = 0.81$ Incorpora logaritmo natural en sus procedimientos, supone que puede sustituir el logaritmo de cualquier base por el logaritmo natural. Además en el 1º miembro suprime el logaritmo de base a. (uso incorrecto de propiedades y definiciones).

un año de cursado en la facultad de asignaturas del campo de la matemática

Los conceptos involucrados fueron ecuaciones con radicales, exponenciales y logarítmicas con distintos grados de dificultad, evaluándose también el manejo de propiedades y definiciones de potencia, logaritmos, propiedades de los números reales, etc.

Gráfico Nº 2: Porcentaje de alumnos ingresantes según resultados de las evaluaciones sobre expresiones algebraicas y casos de factorio. Años 2003- 2004.

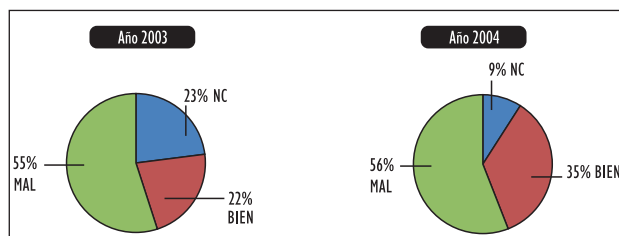


5.- Comparaciones de algunos resultados de los exámenes de ingresantes 2003-2004

Se hizo una comparación de los resultados de las evaluaciones de los ingresantes 2003 y 2004, en referencia a algunos ejercicios del álgebra. En líneas generales podemos decir que, en el año 2004 los resultados mejoraron. Se piensa que una de las causas podría haber sido el cambio en la modalidad de ingreso (restrictivo).

De los ejercicios analizados, aquellos que estuvieron relacionados con: expresiones algebraicas y casos de factorio (Gráfico N° 2), se observó que, en el 2004, hubo una importante mejora: se incrementó un 34%, en relación del año 2003, el porcentaje de respuestas correctas.

Gráfico N° 3: Porcentaje de alumnos ingresantes según resultados de las evaluaciones sobre ecuaciones y aplicación de propiedades. Años 2003 – 2004.



En los ejercicios referidos a ecuaciones y aplicación de propiedades en el año 2004 se aprecia una mejora de un 13% con respecto al año anterior. A pesar del pequeño incremento manifestado, continúa manteniéndose en los mismos valores porcentuales de los alumnos que resolvieron mal (Gráfico N° 3).

En el análisis realizado sobre algunos de los conceptos trabajados en forma general se advirtió, con referencia a:

Ecuaciones: la mayoría de los estudiantes ingresantes 2004, no pudieron interpretar las propiedades distributivas de la potencia y de la raíz. Como así también tuvieron dificultades en la definición y propiedades de los logaritmos.

Al año siguiente se observó que la mayoría de los estudiantes reconocieron y pudieron trabajar con el logaritmo, pero como logaritmo natural. La dificultad observada es que suponen que, al estar el logaritmo con una base “a”, lo pueden transformar a una base “e”, lo cual ha producido errores conceptuales, y en algunos casos no tener en claro aún las propiedades de los mismos. Suponemos que este “cambio de base” se deba a la influencia del análisis como materia que están o han cursado.

De este modo, se puede constatar que como lo sostiene Brousseau (2007) [9].

El obstáculo no desaparece con el aprendizaje de un nuevo conocimiento. Por el contrario, opone resistencia a su adquisición, a su comprensión, frena su aplicación, subsiste en estado latente y reaparece de

forma imprevista, en especial en su ámbito anterior, cuando las circunstancias lo permiten. (P. 46).

Consideraciones finales

Acorde con lo previsto, esta investigación tuvo una intención descriptiva y buscó enmarcarse en un paradigma interpretativo-reflexivo. Creemos haber sostenido esta perspectiva, tanto en el proceso de trabajo como en los productos alcanzados, en la medida en que nos permitieron una mejor comprensión del problema estudiado.

A pesar de que la comparación con otras investigaciones no estaba prevista dentro de nuestros objetivos, de todas maneras la labor de indagación teórica nos facilitó tomar como referencia sistemas de clasificación y categorías que han sido construidas por autores reconocidos en el tema, tales como Kieran (1989) [5]; Berté (1999) [6]; Panizza, Sadovsky y Sessa (1997) [7], Engler (2004) [8]. Hemos encontrado que los errores tipificados se corresponden, en líneas generales, con los errores detectados por estos autores.

Esos errores atañen a “patrones de comportamientos” que resultan consistentes y se manifiestan, por consiguiente, en distintas situaciones operatorias. No son independientes y se presentan habitualmente, como partes de una misma estructura de pensamiento.

El análisis de las frecuencias detectadas mostró que algunos de ellos deberían ser considerados “muy especialmente” por su generalización en los temas sobre ecuaciones, expresiones algebraicas, como así también en cuestiones relacionadas con la aritmética. De los errores hallados, un 100% estuvieron vinculados con “las aplicaciones de propiedades”, seguido entre un 80% y 90% en los “manejos operatorios adecuados”. Otro error recurrente (100%) fue “la dificultad en la lectura y comprensión de los enunciados y consignas de trabajo”.

La importancia que tiene la “dificultad en la lectura” que se ha detectado debería advertir además, acerca de los riesgos que conlleva la misma presentación de las consignas. Probablemente el leer e interpretar consignas debería ser en sí mismo un objetivo de aprendizaje.

Con respecto a las comparaciones de los alumnos ingresantes 2004 con su 2° evaluación (2005), se detectaron en algunos casos: persistencia en los errores; no contestaban algunos de los ítems de ejercicios que anteriormente realizaban correctamente; presentaban “nuevos” errores y en otros casos evolucionaron en sus procedimientos.

El aporte que consideramos importante en este estudio, independientemente de sus corroboraciones, es que pudimos reconocer procesos operatorios que subyacen como errores en el razonamiento de estos estudiantes. Así, esperamos contribuir a una mejor comprensión de la actividad intelectual desplegada en situaciones como ésta que

seguramente, al ser más analíticamente conocidas, podrán ser mejor tratadas desde una perspectiva pedagógica.

Pensamos que este conocimiento más exhaustivo acerca de los errores en las resoluciones matemáticas, debe ser una cuestión explícitamente considerada en la formación de los futuros docentes, además de contribuir a desnaturalizar la concepción dominante, según la cual: “el alumno es el que no estudia” o “con más ejercitación (de la misma clase) podrán saber”.

Referencias Bibliográficas

1. Tenti Fanfani E. y Gómez Campo V. (1989). “*Universidad y profesiones: crisis y alternativas*”. 1ra edición Ed. Miño y Dávila.
2. Charnay R y Mante, M. (1990-1991). “*Del análisis de los errores en matemáticas a los dispositivos de remediación: algunas pistas*”. Equipo de Investigación en didáctica de la Matemática INRP. del IREM de LYON. En: GRAND N., N° pp. 37-64.
3. Brousseau, G. (1983). “*Les obstacles épistémologiques et les problèmes en mathématiques*”. Recherches en: Didactique des Mathématiques, 4(2), pp. 165-198.
4. Artigue, M. (1990). “*Épistémologie et Didactique*”. Recherches en didactique des mathématiques. Vol. 10, N° 23. Traducción de un texto escrito en francés. MARIA, Librairie Philosophique J. Vrin, París, (1938).
5. Kieran C. (1989). “*El aprendizaje del álgebra escolar desde una perspectiva psicológica*”. Centro de Investigación y Estudios avanzados del IPN. Universidad de Québec Montreal, Canadá. F. Filloy Yagüe. México. University of London Institute of Education, Inglaterra.
6. Berté Annie. “*Matemática Dinámica*”. (1999). Buenos Aires. Editorial AZ (p. 120).
7. Panizza, M Sadosky, P. Sessa, C. (1997). “*Los primeros aprendizajes algebraicos: el fracaso del éxito*”. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires.
8. Engler, A.; Gregorini, M.; Müller, D.; Vrancken, S. y Hecklein, M. (2004). “*Los errores en el aprendizaje de matemática*”. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Agrarias. Santa Fe.
9. Brousseau, G. (2007). “*Iniciación al estudio de la teoría de las situaciones didácticas*”. Editorial el Zorzal. Buenos Aires.

Recibido: 06/08/2012

Aprobado: 30/09/2012

Actividad fungicida del hongo liquenizado *Loxospora pustulata* sobre *Rhizoctonia solani*

Fungicide activity of lichen-forming fungi *Loxospora pustulata* above *Rhizoctonia solani*

Daymara I. Vaillant Flores^{1,*}, Carlos R. Romeu Carballo², Marlene Gómez Peralta³, Rebeca Ramírez Ochoa¹

1- Laboratorio de Micología, Área de Fitopatología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. 110 #214 / 5 taB y 5 taF, Miramar, Playa. Código Postal 11600. La Habana, Cuba.

2- Laboratorio de Control de la Calidad de Plaguicidas, UCTB Química, INISAV. 150 #2125 / 21A y 25, Cubanacan, Playa. La Habana, Cuba.

3- Colección de Líquenes del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM), Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Ciudad Universitaria. Francisco J. Mújica S/N, Col. Felicitas del Río, Morelia, Michoacán, México.

*E-mail: dvaillant@inisav.cu

Resumen

Los líquenes son hongos que establecen una relación de simbiosis con uno o varios organismos fotosintéticos (algas o cianobacterias). En esta relación el hongo (micobionte) produce un determinado número de metabolitos secundarios con actividad antibiótica. De acuerdo a esta afirmación se propone: comprobar el efecto fungicida de los metabolitos secundarios producidos en medio de cultivo por el micobionte del líquen *Loxospora pustulata*, sobre *Rhizoctonia solani* aislado de papa. El micobionte se cultivó en medio agar papa dextrosa (PDA), posteriormente se fermentó en caldo de papa por cultivo agitado y los metabolitos se extrajeron con acetato de etilo. Se prepararon concentraciones de 0,01; 0,03; 0,07% p/v del extracto líquénico en PDA donde se sembraron discos de *R. solani* y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. El extracto líquénico mostró 100% de inhibición del desarrollo de *R. solani* a las tres concentraciones.

Palabras clave: Líquen; Sustancias líquénicas; Actividad fungicida.

Abstract

The lichens are fungi that establish a symbiotic relation with one or various photosynthetic organisms (algae or cyanobacterium). In this relation the fungi (mycobiont) produce secondary metabolites with antibiotic activity. For this reason the fungicide effect of metabolites produced in culture media by the lichen's mycobiont *Loxospora pustulata*, above *Rhizoctonia solani* isolated from potato was verified. The mycobiont was cultivated in media potato dextrose agar (PDA) and it was fermented in potato broth by shaken culture. The metabolites were extracted with ethyl acetate. A solution in PDA at 0,01: 0,03: 0,07% w/v concentrations was prepared from the lichens extracts. *R. solani* discs were placed in the solution and the mycelial growth inhibition percentage was measured. The lichen extract showed 100% of inhibition of the *R. solani* mycelial growth to all concentrations.

Keywords: Lichens; Lichens substances; Fungicide activity.

Introducción

Los líquenes son los hongos que establecen una relación simbiótica con uno o varios organismos fotosintéticos (algas o cianobacterias) y de cuya interacción se origina un talo estable con estructura, ecología y fisiología específicas y diferentes a las que tienen los hongos o algas por separado (1). El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol y brindarle agua y sales mine-

rales. El alga a su vez realiza fotosíntesis y proporciona al hongo hidratos de carbono y vitaminas; para producir lo que se conoce como sustancias líquénicas (2).

Estas sustancias se definen como productos del metabolismo secundario y tienen disímiles propiedades; entre las que se destacan la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias, (3). Por esta razón representa una alternativa más para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de importancia económica. Entre estos hongos

fitopatógenos se encuentra *Rhizoctonia solani* Kühn, causante de la rizoctoniasis o costra negra en el cultivo de papa, con daños severos en el rendimiento y la producción (4).

Con este criterio se propone comprobar el efecto inhibitorio de los metabolitos producidos en medio de cultivo del líquen *Loxospora pustulata* (Brodo&Culb.) R.C. Harris a diferentes concentraciones sobre un aislado de *R. solani* en papa.

Materiales y métodos

El líquen fue colectado en el Jardín Botánico de Cienfuegos (provincia de Cienfuegos, Cuba) sobre la corteza de *Spathodeanilotica* (Tulipanero africano) y fue identificado como *Loxospora pustulata*. El espécimen mostraba crecimiento crustáceo con un promedio de desarrollo de 8 cm de ancho.

Se cortaron pedazos de 1 cm de ancho de corteza de árbol donde había crecimiento del líquen y se lavaron con abundante agua corriente por una hora. Luego se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por 1 minuto y se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril. Luego se sembraron pequeños fragmentos en medio de cultivo PDA preparado naturalmente, en placas Petri de 9 cm de diámetro empleando 10 réplicas. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante una semana. Pasado este período de tiempo, las colonias obtenidas fueron transferidas a PDA fresco e incubadas a las mismas condiciones. Una vez que crecieron en toda la placa se cortaron ponchetes de 1 cm de diámetro; los que fueron colocados en erlenmeyers de 500 ml con 300 ml de caldo de papa estéril con tres réplicas y se situaron en zaranda durante siete días. Una vez que hubo crecimiento, se filtró el caldo de papa y la biomasa fue desechada. Al caldo de papa se le agregó 5 ml de acetato de etilo (p.a. Merck) para realizar la extracción de las sustancias líquénicas con tres repeticiones, luego se rotoevaporó y el extracto obtenido fue colocado en balones previamente pesados y se preparó con dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%. Partiendo de una concentración de 5% de extracto, se prepararon concentraciones en medio PDA fundido como muestra la tabla 1. El PDA fundido se aplicó sobre placas de 5 cm de diámetro y se colocaron en el centro ponchetes del hongo *R. solani* con tres réplicas por concentración y dos testigos; uno con el hongo creciendo en medio PDA sin el blanco y otro con PDA con DMSO a la mayor concentración probada. Se incubaron a 25 °C durante una semana. Transcurrido este periodo se evaluaron los ensayos calculando el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición } = [(DCC - DCT) / DCC] \times 100.$$

DCC: diámetro de la colonia control

DCT: diámetro de la colonia tratada

Tabla 1: Concentraciones de extracto líquénico al 5% en PDA.

Concentración	Cantidad de producto	Cantidad de PDA para 50 ml
0,07%	0,7 ml	49,3 ml
0,03%	0,3 ml	49,7 ml
0,01%	0,1 ml	49,9 ml

Resultados y discusión

El extracto obtenido del hongo liquenizado *L. pustulata* mostró 100% de inhibición del crecimiento de *R. solani* a todas las concentraciones estudiadas como muestra la Fig. 1. Es significativo el resultado mostrado a la menor concentración donde con cantidades mínimas del extracto el crecimiento del hongo fue nulo (Fig. 2).

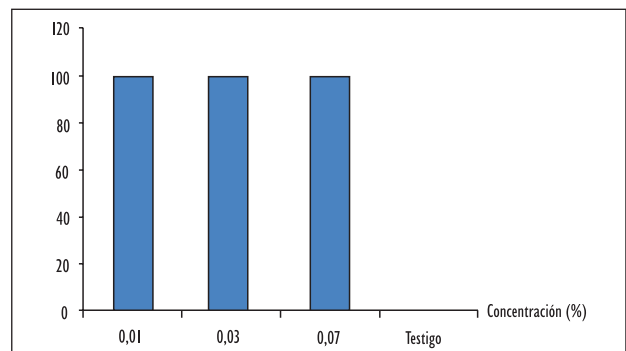


Figura 1: Porcentajes de inhibición de cada una de las concentraciones

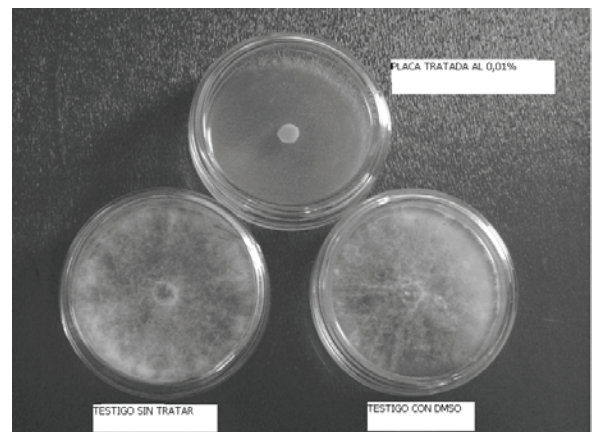


Figura 2: Inhibición al 100% del crecimiento de *R. solani* al 0,01% de concentración.

En la literatura no se encontraron trabajos donde se haya empleado *L. pustulata* para el control de hongos fitopatógenos; sin embargo algunos autores demostraron el efecto antifúngico de otras especies de hongos liquenizados. Tal es el caso de Suberu (2004), que logró inhibir el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus flavus* con los extractos de los líquenes *Hypogymnia physodes* y *Ramalina farinacea* a concentraciones mayores a las probadas (5). También Seoun *et al.* (2003) obtuvieron

sustancias líquénicas de *Heterodermia* sp a partir del cultivo del micobionte, mostrando valores significativos en un número determinado de hongos fitopatógenos entre los que se destaca *Bipolaris coicis*, *Collectotrichum orbiculare* y *Fusarium graminearum* (6). Otros géneros con marcado efecto antifúngico son: *Cladonia*, *Myelochroa*, *Parmelia*, *Usnea*. y *Ramalina* este último con una marcada actividad fungicida. Algo similar ocurre con la especie *Parmelia laevis* la cual inhibió completamente el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp y *Sclerotium cepivorum* (7).

El método empleado en este trabajo para el cultivo de *L. pustulata* no ha sido descrito por otros autores. Generalmente se realiza la metodología referida por Yamamoto *et al.*, 1987; en la cual se cultiva el micobionte a partir de la maceración de una porción del talo líquénico y posteriores filtraciones, donde se siembra la fracción obtenida en la última filtración (8). Esta técnica fue utilizada por Wei *et al.* 2008 para probar la actividad fungicida de 100 aislados de hongos liquenizados contra *Colletotrichum acutatum*, causante de la antracnosis en pimiento. Estos autores lograron más de un 50% de inhibición con los extractos de las especies *Lecanora argentata*, *Cetralia braunsiana*, *Ramalina litoralis*, *Parmelia simplicior* entre otras (9). En cambio la metodología empleada en este ensayo permitió el cultivo del micobionte en un corto período de tiempo además que disminuyó el número de contaminantes.

Conclusiones

Mediante este estudio preliminar se concluye que: la metodología utilizada para el cultivo del micobionte de *L. pustulata* permitió un crecimiento efectivo de este líquen en medio de cultivo. Así como; el extracto líquénico obtenido presentó un marcado efecto fungicida sobre *R. solani* a las tres concentraciones probadas, manifestando la actividad antimicrobiana que presentan los metabolitos secundarios producidos por esta especie.

Referencias Bibliográficas

1. Ranković, B. y Marijana, M. *The antimicrobial activity of substances derived from lichens Physcia aipolia, Umbilicaria polyphylla, Parmelia caperata and Hypogymnia physodes*. World J Microbiol Biotechnol 24: p. 1239-1242. 2008.
2. Coutiño, B. y Montañez, A. L. *Los líquenes*. Ciencias 59: p. 64-65. 2000.
3. Toledo, F. J.; García, A.; León, F. y Bermejo, J. *Ecología química en hongos y líquenes*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. XX-VIII (109): p. 510-528. 2004.
4. Acuña, I. y Vargas, M. *Rhizoctoniasis de la papa*. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Habana, Cuba. Boletín informativo 46: p. 1-4. 2004.
5. Suberu, H. *Preliminary studies of inhibitions in Aspergillus flavus with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide*. African Journal of Biotechnology 3 (9): p. 468-472. 2004.
6. Seoun, J. H.; Hye, J. K.; Kwang, M. L. and Young, J. K. *Isolation, cultivation and antifungal activity of lichen-forming fungus Heterodermia sp.* The Plant Pathology Journal 19(2): 75-78. 2003.
7. Soon, O.; Haesook, J.; Kwang, Lim; Young, J. and Jae, H. *Anti-fungal activity of lichen-forming fungi isolated from korean and chinese lichen species against plant pathogenic fungi*. Plant Pathol. J. 22(4): 381-385. 2006.
8. Yamamoto, Y.; Mizuguchi, R.; Takayama, S. and Yamada, Y. *Effects of culture conditions on the growth of Usneaceae lichen tissue cultures*. Plant Cell Physiol 28(8): p. 1421-1426. 1987.
9. Wei, X.; Hae-Sook, J.; Keon, H.; Young, K. y Jae-Seoun, H. *Anti-fungal activity of lichen-forming fungi against Colletotrichum acutatum on hot pepper*. Plant Pathol. J. 24 (2): 202-206. 2008.

Recibido: 13/06/2013

Aprobado: 30/10/2013

Selección de condiciones de cultivo óptimas para la secreción de endoglucanasas por cepas de *Trichoderma* nativas de Misiones

Selection of optimal culture conditions for endoglucanases secretion by native *Trichoderma* strains from Misiones

María L. Castrillo^{1,*}, Gustavo A. Bich¹, Pedro D. Zapata¹, Laura L. Villalba¹

1- Laboratorio de Biotecnología Molecular (Biotecmol), Instituto de Biotecnología Misiones "Dra. María Ebe Rea" (InBioMis), Universidad Nacional de Misiones. Ruta 12 km 7½. Posadas, Misiones, Argentina.

*E-mail: biotecmol2010@gmail.com

Resumen

Algunas especies de *Trichoderma* pueden producir grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, tales como celulasas, las cuales poseen múltiples aplicaciones industriales y biotecnológicas. El objetivo del presente trabajo fue seleccionar las condiciones de cultivo en medio líquido que favorezcan la secreción de endoglucanasas por cepas del género *Trichoderma* nativas de la provincia de Misiones. Se llevaron a cabo experimentos utilizando carboximetilcelulosa 0,5% (p/v) como fuente de carbono y medio Mandels como complejo nitrogenado completo y se ensayaron diferentes condiciones de cultivo utilizando como variables el tiempo de incubación, la forma de inóculo y el sistema de control del pH del medio de cultivo. El presente trabajo permitió establecer que la inoculación en forma de suspensión de esporas y el tamponado del medio con buffer succinato de sodio pH 4,8 representan las condiciones de cultivo en medio líquido más adecuadas para la secreción de endoglucanasas por cepas nativas de *T. harzianum* y *T. koningiopsis*.

Palabras clave: *Trichoderma*; Condiciones de cultivo; Celulasas.

Abstract

Some *Trichoderma* strains produce large amounts of hydrolytic enzymes, such as endoglucanases, which have many industrial and biotechnological applications. The aim of the present work was to select the culture conditions favouring the secretion of cellulolytic enzymes of *Trichoderma* native strains from the Province of Misiones. Several experiments were done with carboxymethylcellulose 0.5% (w/v) as carbon source and Mandel's medium containing a complex nitrogen source. Inoculation method, buffer composition and incubation time were selected as independent variables. This work allowed us to establish that the inoculation as spore suspension, and the buffered medium with sodium succinate buffer pH 4.8 represent the most suitable growing conditions in a liquid medium for endoglucanases secretion by native strains of *T. harzianum* and *T. koningiopsis*.

Keywords: *Trichoderma*; Culture conditions; Cellulases.

Introducción

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, siendo capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, a su metabolismo versátil y a su resistencia a inhibidores microbianos [1]. La capacidad de algunas

especies, como *T. viride* y *T. reesei* para producir grandes cantidades de enzimas hidrolíticas, tales como celulasas, se aplica comercialmente en áreas tan diversas como en la producción de detergentes, en la industria textil, en la industria de pulpa y papel y en la producción de biocombustibles [2; 3; 4].

Todos los organismos capaces de degradar celulosa cristalina secretan un conjunto de enzimas extracelulares con diferentes especificidades y modo de acción, que intervienen en la hidrólisis de la celulosa. Dicho conjunto se denomina sistema o complejo celulasas [5] y la degradación total de la celulosa requiere la acción sinérgica de los tres componentes enzimáticos de las celulasas [6]. Las celulasas incluyen a las endoglucanasas (EGs) o endo-1,4- β -glucanasas, celobiohi-

drolasas (CBHs) o exoglucanasas y β -glucosidasas (BGLs). Estas enzimas catalizan la bioconversión de celulosa insoluble a soluble en agua con la subsecuente liberación de glucosa [7]. Las EGs inician el ataque, rompiendo los enlaces β -1,4-glucosídicos en forma aleatoria principalmente en las regiones amorfas del interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos extremos terminales no reductores. Las CBHs atacan gradualmente las moléculas de celulosa en los extremos terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa. Finalmente, las BGLs hidrolizan la celobiosa a glucosa [6].

La biotecnología pretende hacer uso de la biodiversidad del planeta para desarrollar nuevos productos y procesos claves [8], sin embargo para evaluar y seleccionar nuevas cepas microbianas nativas capaces de producir celulasas primeramente es esencial optimizar los parámetros nutricionales y de operación (medios de cultivo, tipos de sustratos, condiciones operativas, pH, temperatura, cofactores, entre otros) que garanticen los máximos rendimientos de enzimas.

Particularmente para determinar cuantitativamente la actividad celulolítica [9], es necesario hacer crecer los microorganismos en un medio de cultivo que contenga una fuente de carbono y de nitrógeno que permitan la secreción extracelular de celulasas. Varios autores consideran a la carboximetilcelulosa (CMC) como una fuente de carbono óptima para la secreción de celulasas [8; 10; 11], y al medio de cultivo Mandels como un complejo nitrogenado completo que induce dicha secreción [12; 13; 14]. Como resultado de estas observaciones algunos métodos han sido propuestos para la detección de la actividad celulolítica en diferentes microorganismos, ya sea cualitativa como cuantitativamente [9; 10; 15; 16; 17; 18]. Actualmente los métodos más empleados y citados son el método cualitativo utilizando un medio selectivo conteniendo CMC, como única fuente de carbono, y revelando la presencia de celulasas mediante el agregado de una solución del colorante azoico rojo Congo [10; 11; 19; 20; 21]; y el método cuantitativo que determina la liberación enzimática de azúcares reductores durante la hidrólisis del CMC, como sustrato, mediante la técnica del ácido dinitrosalicílico (DNS) [9; 22; 23; 24; 25]. Sin embargo, se puede observar en la literatura que existen grandes variaciones entre los diferentes autores en cuanto a la forma de inóculo utilizada, al tiempo de incubación, y a las características del medio, ya sea pH, sistemas buffers, entre otros [12; 11; 14].

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar las condiciones de cultivo que favorezcan la secreción de enzimas endoglucanasas en cepas del género *Trichoderma* nativas de la provincia de Misiones.

Materiales y Métodos

Microorganismos y condiciones de mantenimiento

Se trabajó con dos cepas pertenecientes al género *Trichoderma* aisladas a partir de suelos en ecosistemas naturales de la provincia de Misiones (Tabla 1).

Código	Lugar de aislamiento	Localización GPS	Especie
PROF-2	Profundidad, Candelaria, Mnes.	S 27° 33' 32.26" O 55° 42' 29.32"	<i>Trichoderma harzianum</i>
NAN-11	Nacanguazu, Gob. Roca, Mnes.	S 27° 06' 57" O 55° 22' 37"	<i>Trichoderma koningiopsis</i>

Tabla 1: Identificación del lugar de procedencia de las cepas evaluadas.

Los cultivos de stock fueron mantenidos a 4 °C en tubos de 1,5 mL con agar papa dextrosa (PDA) como medio de cultivo.

Composición del medio de cultivo

Los cultivos se prepararon utilizando como fuente de carbono CMC 0,5% (p/v), y como complejo nitrogenado completo el medio Mandels [12].

Se realizaron dos experimentos independientes (experimento N° 1 y experimento N° 2) para estandarizar las condiciones de cultivo utilizando como variables el tiempo de incubación, la forma de inóculo y el sistema de control del pH del medio:

EXPERIMENTO N° 1: Se prepararon medios de cultivo compuestos por 50 mL de medio Mandels [8] (p/v) + CMC 0,5% (p/v), en frascos Erlenmeyer de 250 mL. El pH del medio fue ajustado a 5 mediante la adición de ácido acético, previo a su esterilización, y fue registrado a lo largo del período de incubación mediante el control de acidez-alcalinidad en líquidos (DF Universal, *test paper*, colorímetro, pH 1-14). Como forma de inóculo fueron utilizados 5 tacos de micelio joven (10mm) a partir de medio de cultivo sólido PDA con la cepa reactivada 5 días antes. Los cultivos fueron incubados a 29 °C con luz continua durante 10 días en condiciones estáticas, y cada 3 días se extrajo una alícuota de 1 mL de sobrenadante de cultivo para determinar la cinética de su actividad enzimática. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

EXPERIMENTO N° 2: Se prepararon medios de cultivo compuestos por 50 mL de medio Mandels [8] (p/v) + CMC 0,5% (p/v) + 5 mL de buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM, en frascos erlenmeyer de 250 mL. Para corroborar el mantenimiento de las condiciones ácidas, el pH fue registrado a lo largo del período de incubación mediante el control de acidez-alcalinidad en líquidos (DF Universal, *test paper*, colorímetro, pH 1-14). La forma de inóculo utilizada fue una suspensión de esporas (107 esporas/mL), la cual se dejó incubar a 29 °C con luz continua durante 15 días en condiciones estáticas, extrayéndose una alícuota de 1mL de sobrenadante de cultivo cada 2 días para determinar la cinética de su actividad enzimática. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

La suspensión de esporas fue preparada a partir de cepas cultivadas en medio PDA durante 5 a 7 días a 29 °C con luz continua. Una vez lograda la esporulación, se preparó una suspensión de esporas en una solución de

agua destilada estéril con agregado de Tween 80 0,1% (v/v) estéril. El recuento de esporas se realizó con cámara de Neubauer utilizando como base la técnica propuesta por Alves y Farias [26]. El inóculo consistió en 1 mL de esta suspensión de esporas a una concentración de 107 esporas/mL.

Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática de EGs se realizó en espectrofotómetro Shimadzu UV-3600 a una absorbancia de 540 nm, mediante el empleo de celulosa cristalina al 2% como sustrato del ensayo. La cantidad de azúcares reducidos generados durante el ensayo se estimó mediante el método del ácido DNS, reportado por Miller [9] utilizando glucosa como estándar. La mezcla de reacción fue incubada a 50 °C por 30 min. Una unidad internacional (U/L) de actividad enzimática de EGs fue definida como la cantidad de enzima que libera un μmol de azúcares reductores por min por L.

Análisis estadístico

El análisis de ANOVA seguido por el test de Bonferroni se realizó utilizando Graph Pad Prism versión 6.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados y Discusión

En las condiciones planteadas en el experimento N° 1 (siembra con tacos de 10mm de diámetro) se observó una variable actividad enzimática EGs en el transcurso del tiempo de cultivo para las dos cepas ensayadas en los dos experimentos independientes correspondientes al experimento N° 1 (duplicados), sin mostrar diferencias significativas entre las mismas ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos en el experimento N° 1 se muestran en la Figura 1.

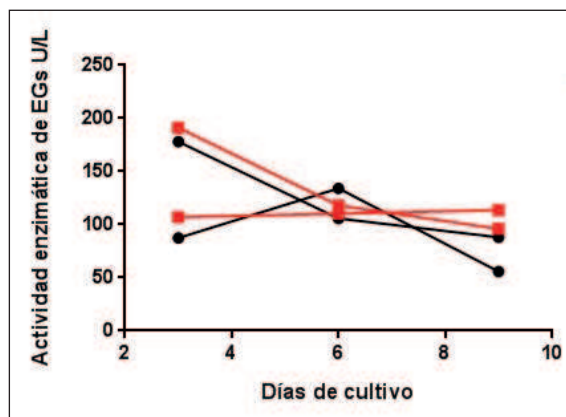


Figura 1: Cinética de la secreción de EGs por las cepas NAN-11 (■) y PROF-2 (●) cultivadas en las condiciones del experimento N° 1 (medio Mandels con CMC 0,5% (p/v), pH ajustado mediante la adición de ácido acético e incubación a 29 °C con luz continua) en dos experimentos independientes. Se grafican los valores de actividad enzimática EGs en U/L en función de los días de cultivo.

En este experimento, no fue posible determinar un patrón de secreción en las dos cepas analizadas, ni entre los duplicados del experimento, lo cual podría haber sido posible debido a la forma de inóculo utilizada, que no permite cuantificar exactamente la cantidad del mismo que fue adicionada a cada ensayo. Así mismo, a medida que pasaba el tiempo de cultivo, se observó que el pH iba incrementándose; esta alcalinización del medio podría ser la causa de un cambio en las condiciones aptas para el crecimiento fúngico, hecho que influiría en la secreción de enzimas [27] (Tabla 2).

Tabla 2: Variación del pH con los días de cultivo en las condiciones del experimento N°1.

pH del medio de cultivo		
Día de cultivo	NAN 11	PROF 2
3	7	6,5
6	6	7
9	8,5	8,5

Por tanto, de los resultados obtenidos del experimento N° 1 se pudo inferir que era necesario ensayar por un lado, otra forma de inóculo, más exacta y comparable, que permita obtener repetitividad del ensayo y esclarecer con certeza el día de máxima actividad enzimática, como podría ser la suspensión de esporas [28]. Por otro lado, era necesario ensayar alguna forma de cultivo que permita mantener el pH del medio en niveles constantes, como podría ser la adición de algún sistema buffer más eficiente para que actúe tamponando el pH de cultivo en condiciones ácidas [27; 29]. Así mismo, sería importante además realizar las extracciones de las alícuotas de sobrenadante de cultivo a intervalos más pequeños para poder observar realmente la dinámica enzimática y llegar a estandarizar el día de máxima secreción para EGs en las cepas estudiadas.

En el experimento N° 2, diseñado en función a los resultados obtenidos en el experimento N° 1, como forma de inóculo se utilizó una suspensión de esporas y un sistema de tamponado basado en el buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM para mantener el cultivo en condiciones ácidas. Este diseño permitió observar valores de actividad enzimática EGs similares entre los duplicados de cada cepa y adecuados entre las diferentes cepas ensayadas. Así mismo, fue posible inferir con este experimento que el primer pico de mayor actividad para EGs se produce al 4to día de cultivo, mostrando diferencias significativas con el resto de los días ($p < 0,001$) (Figura 2). El comportamiento zigzagueante observado para EGs puede ser explicado debido a que esta enzima forma parte del complejo “celulasas” donde actúa de manera sinérgica con las demás enzimas del mismo, para poder hidrolizar completamente los componentes celolíticos en azúcares simples fermentables [30; 31; 32].

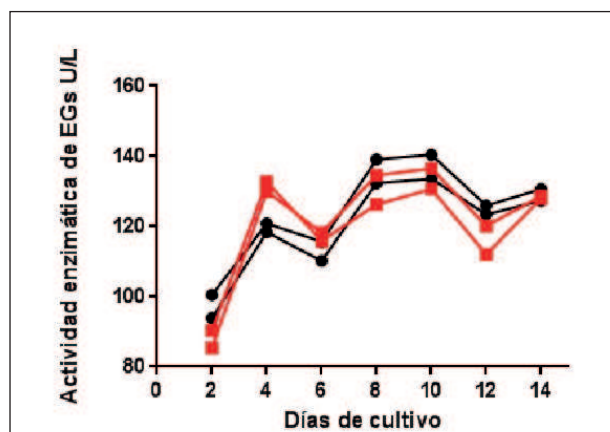


Figura 2: Cinética de la secreción de EGs por las cepas NAN-11 (■) y PROF-2 (●) cultivadas en las condiciones del experimento N°2 (medio Mandels con CMC 0,5% (p/v), pH ajustado mediante buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM e incubación a 29 °C con luz continua) en dos experimentos independientes. Se grafican los valores de actividad enzimática EGs en U/L en función de los días de cultivo.

La adición de buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM al medio de cultivo permitió mantener el pH del medio en condiciones ácidas durante el periodo de incubación correspondiente (Tabla 3).

Tabla 3: Registro de pH en las condiciones del experimento N° 2.

Día de cultivo	NAN 11	PROF 2
2	5	5
4	5	5
6	5,5	5
8	5,5	5,5
10	6	6
12	6	6
14	6	6

Por tanto, de los resultados obtenidos del experimento N° 2 se pudo concluir que la utilización de una suspensión de esporas como forma de inóculo y el agregado de buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM al medio de cultivo, fueron variantes ventajosas para estandarizar la secreción enzimática de las cepas de *Trichoderma* analizadas.

La determinación del pico de máxima actividad combinado al menor tiempo de incubación permite que el ensayo de selección (screening) pueda ser realizado de una manera rápida, lográndose obtener resultados fiables en corto tiempo [10; 11; 19; 20; 24]. Por esta razón, y en función de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se analizó la secreción de EGs de las cepas en estudio a través del tiempo, siguiendo las condiciones del experimento N°2.

Los resultados obtenidos (Figura 3) indican que el día de mayor actividad enzimática para EGs corresponde al 4to día de cultivo; por tal motivo posteriormente se decidió ensayar y determinar las mismas condiciones hasta el 5to día de cultivo.

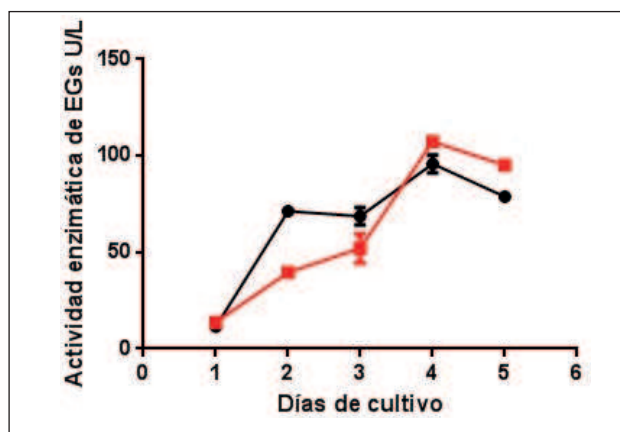


Figura 3: Cinética enzimática EGs por las cepas NAN-11 (■) y PROF-2 (●) cultivadas en las condiciones del experimento 2 (medio Mandels con CMC 0,5% (p/v) y pH ajustado mediante buffer succinato de sodio pH 4,8 100 mM e incubación a 29°C con luz continua). Se muestra el promedio de dos experimentos independientes. Se grafican los valores de actividad enzimática media de EGs en U/L en función de los días de cultivo. Las barras verticales continuas corresponden al desvío estándar entre los valores.

El presente trabajo permitió establecer que la inoculación en forma de suspensión de esporas y el tamponado del medio con buffer succinato de sodio pH 4,8 representan las condiciones de cultivo en medio líquido más adecuadas para la secreción de EGs por cepas de *T. harzianum* y *T. koningiopsis*.

Bibliografía

- Infante, D.; Martínez, B.; González, N. y Reyes, Y. *Mecanismos de acción de Trichoderma frente a hongos fitopatógenos*. Rev. Prot. Vegetal. 24: 14-21, 2009.
- Griffin, D. *Fungal physiology*. 2nd Edition John Wiley y Sons, New York. 1994.
- Kubicek-Pranz, E. *Nutrition, cellular structure and basic metabolic pathways in Trichoderma and Gliocladium*. En: Kubicek C.P. y Harman G.E. (Eds). *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor y Francis, London, p. 95-119, 1998.
- Schuster, A. y Schmoll, M. *Biology and biotechnology of Trichoderma*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 787-799, 2010.
- Macarron Larumbe, R. *Purificación y caracterización de endoglucanasa III de Trichoderma reesei (Tesis doctoral)*. Departamento de Bioquímica y Biología molecular. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. P. 203, 1992.
- Vilches Paz, L. *Determinación de la actividad de endoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz (Tesis de grado)*. Departamento Microbiología y Parasitología. Facultad Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor San Marcos. p.153, 2002.
- Jahangeer, S.; Khan, N.; Jahangeer, S.; Sohail, M.; Shahzad, S.; Ahmad, A. y Khan, S. A. *Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source*. Pakistan J. Bot. 37: 739-748, 2005.

8. Venegas, J. y Suárez, D. *Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas*. Rev. Colomb. Biotecnología. 6: 58-71, 2004.
9. Miller, G. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Anal. Chem. 31: 426-428, 1959.
10. Sazci, A.; Radford, A. y Erenlerr, K. *Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method*. J. Appl. Bacteriol. 61: 559-562, 1986.
11. Doolotkeldieva, T. y Bobusheva, S. *Screening of Wild-Type Fungal Isolates for Cellulolytic Activity*. Microbiol. Insights. 4: 1-10, 2011.
12. Mandels, M. y Reese, E.T. *Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon source and metals*. J. Bacteriol. 73: 269-278, 1957.
13. Mandels, M. *Microbial sources of cellulose*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 5: 81-105, 1975.
14. Guerra, G.; Casado, M.R.L.G.; Arguelles, J.; Sanchez, M.I.; Manzano, A.M. y Guzman T. *Cellulase production with sugarcane straw by Trichoderma viride on solid bed*. Sugar Technol. 8: 30-35, 2006.
15. Mandels, M.; Andreotti, R. y Roche, C. *Measurement of saccharifying cellulase*. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6: 21-33, 1976.
16. Hankin, L. y Anagnostakis, S. *Solid media containing Carboxy methyl cellulose to detect cellulase activity of Microorganisms*. J. Gen. Microbiol. 98: 109-115, 1977.
17. Smith, R. *Rapid tube test for detecting fungal cellulase production*. Appl. Environ. Microbiol. 33: 980-981, 1977.
18. Mahasneh, A.M. y Stewart, D.J.A. *Medium for detecting B-(1-3) glucanase activity in Bacteria*. J. Appl. Microbiol. 3: 457-458, 1980.
19. Magnelli, P.; Martinez, A. y Mercuri, O. *Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos*. Rev. Argent. Microbiol. 29: 210-214, 1997.
20. Yoon, J. y Kim, Y. *Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete Fomitopsis palustris*. J. Microbiol. 43: 487-492, 2005.
21. Kasana, R.C.; Salwan, R.; Dhar, H.; Dutt, S. y Gulati, A. *A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine*. Curr. Microbiol. 57: 503-507, 2008.
22. Wood T. *Preparation of crystalline, amorphous and dyed cellulase substrate*. Methods Enzymol. 160: 19-45, 1988.
23. Andersen, N.; Johansen, K.; Michelsen, M.; Stenby, E.; Krogh, K. y Olsson, M. *Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel*. Enzym. Microb. Technol. 42: 362-370, 2008.
24. Dashtban, M.; Maki, M.; Leung, K.; Canquan, M. y Wensheng, Q. *Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison*. Crit. Rev. Biotechnol. 30: 302-309, 2010.
25. Jurick, W.M.; Vico, I.; Whitaker, B.D.; Gaskins, V.L. y Janisiewicz, W.J. *Application of the 2-Cyanocetamide Method for Spectrophotometric Assay of Cellulase Enzyme Activity*. Plant Pathol. J. 11: 38-42, 2012.
26. Alves, R. y Faria, M. *Pequeno manual sobre fungos entomopatogénicos*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Cerrados Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010.
27. Ferreira, S.M.P.; Duarte, A.P.; Queiroz, J.A. y Domingues, F.C. *Influence of buffer systems on Trichoderma reesei Rut C-30 morphology and cellulase production*. Electronic J. Biotechnol. 12: 1-9, 2009.
28. Domingues, F.; Queiroz, J.; Cabral, J. y Fonseca, L. *The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by Trichoderma reesei Rut C-30*. Enzym. Microb. Technol. 26: 394- 401, 2000.
29. Dhiman, S.; Sharma, J. y Battan, B. *Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review*. BioRes. 3: 1377-1402, 2008.
30. Montenecourt, B. y Eveleigh, O. *Production and characterization of high yielding cellulose mutants from Trichoderma reesei*. TAPPI J. 28: 101-108, 1979.
31. Gómez, F. *Métodos secuenciales de pretratamiento químico y enzimático de residuos agrícolas para la producción de metano (Tesis de grado)*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. San Luis de Potosí, México. p. 78, 2008.
32. Sanchez, C. *Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi*. Biotechnol. Adv. 27: 185-194, 2009.

Recibido: 20/06/2013

Aprobado: 28/11/2013

***Enterococcus* en aguas del arroyo Vicario: recuento, identificación y perfil de sensibilidad**

***Enterococcus* spp in water Vicario stream: Counts, identification and sensibility profiles**

Amada B. Pucciarelli^{1,*}, Alberto Tessari¹, Martha H. von Specht¹

1- Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología "Dr. F. Benassi", Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: mima@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen

Enterococcus spp. es uno de los microorganismos indicadores de contaminación fecal de aguas y alimentos. Puede causar infecciones oportunistas en el hombre, y adquirir resistencia a antimicrobianos. El objetivo del estudio fue evaluar la presencia de enterococos en aguas del arroyo Vicario de la ciudad de Posadas, Misiones, y conocer sus características microbiológicas. La detección, caracterización y perfil bioquímico se realizó según normas estándares americanas de aguas. Los ensayos de sensibilidad a quimioterápicos (Glucopéptidos, Aminoglucósidos y β -lactámicos), según metodología de Clinical Laboratory Standards Institute. Se aislaron 54 cepas: *Enterococcus faecalis* (86%), *E. faecium* (9%), *E. hirae* (1%), *E. gallinarum* (1%) y otros cocos grampositivos no *Enterococcus* (3%). Se observó amplia sensibilidad a antibióticos, salvo tres *E. faecalis*, dos con alto nivel de resistencia a aminoglucósidos y uno con resistencia intermedia a vancomicina. La contaminación provendría de efluentes cloacales considerando el origen intestinal de las cepas aisladas. Los hallazgos de este estudio son relevantes para el control de la resistencia a antibióticos en el medio ambiente.

Palabras clave: Enterococos; Arroyo; Detección; Sensibilidad a antibióticos.

Abstract

Enterococcus genus is a microorganism considered an indicator of fecal contamination of water and food; their presence in food is due to their ability to survive and their high resistance to different processes and treatment conditions. *Enterococcus* genus has relevance due to its high incidence in nosocomial illnesses and its property to acquire resistance to antimicrobials agents. The presence of *Enterococcus* species from Vicario stream water of Posadas City, Misiones, was studied. Detection, characterization and the biochemical profile was done according to the standard methods for water and streams, and sensibility assays to chemotherapeutic (Glucopéptids, Aminoglucosides and β -lactamics) were done by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The strains were: 86% *Enterococcus faecalis*; 9% *E. faecium*; 1% *E. hirae*; 1% *E. gallinarum*; and 3% no *enterococcus*. A high sensibility towards antibiotics was observed, except three *E. faecalis* of which two presented high resistance to aminoglucosides and one with a medium resistance to vancomicine. These contaminants came from waste water considering the intestinal origin of isolated strains. The findings of this study are important for the control of antibiotic resistance in the environment.

Keywords: Enterococci; Stream; Detection; Sensibility antimicrobials.

Introducción

Se investigó la presencia del género *Enterococcus* en aguas del arroyo Vicario, cuya cuenca hídrica recorre importantes zonas de la ciudad de Posadas, Misiones. Desde el punto de vista epidemiológico constituye una severa advertencia la detección de enterococos en cuencas hídricas en contacto con asentamientos humanos, no solo por su origen en el tracto intestinal. La llegada al ambiente de bacterias antibiótico-resistentes compromete su calidad

higiénico-sanitaria, no habiéndose documentado en nuestra región la vigilancia de la resistencia a antibióticos en enterococos de este origen. (1).

Los enterococos se caracterizan por presentar resistencia natural o intrínseca a las cefalosporinas, aminoglucósidos (bajo nivel de resistencia) clindamicina, cotrimoxazol (in vivo) y por su capacidad para adquirir nuevas resistencias (2).

Desde el punto de vista clínico, es de especial interés la resistencia transferible a glicopéptidos (vancomicina

o teicoplanina) y estreptograminas (por ejemplo, quinupristina / dalbopristina) en los enterococos (3). No debe descartarse la posibilidad de transferencia *in vivo* de estas resistencias al género *Staphylococcus*, hecho que ya se ha logrado *in Vitro*, lo que plantea graves dificultades terapéuticas sobre todo en las infecciones causadas por *S. aureus* Resistentes a Meticilino (2, 4, 5).

Estos microorganismos forman parte de la flora nativa gastrointestinal del hombre y animales, aislándose en más del 90% de individuos sanos. Si bien presentan escasa patogenicidad para el hombre, son agentes causales de infecciones oportunistas, algunas de suma gravedad como endocarditis bacteriana subaguda, y diversas infecciones relacionadas al ámbito hospitalario (6). *E. faecalis* (antes *Streptococcus faecalis*), también llamado enterococo por la frecuencia con que se encuentra en las vías digestivas del hombre, es un organismo resistente a la temperatura, soporta 62° C durante 30 minutos; además, muchas cepas halladas en la clínica son muy resistentes a los medicamentos antimicrobianos y hacen especialmente difícil el tratamiento de las endocarditis por esta bacteria (4).

Morfológicamente, los enterococos, son células esféricas u ovoides, Gram positivas, catalasa negativos, que se presentan de a pares o en cadenas cortas en medio líquido. Algunos son móviles por escasos flagelos, anaerobios facultativos y no forman endosporas ni cápsulas y de requerimientos nutricionales complejos (2,7).

Las características fisiológicas que distinguen al género *Enterococcus* son la habilidad para crecer en presencia de 6.5% de cloruro de sodio; a temperaturas de 10 °C y 45 °C y rango de pH entre 4,6 y 9.6-10; además, en presencia de azida de sodio al 0,04%. Son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de 40% de bilis y poseen la enzima pirrolidonyl arylamidasa (8, 9).

Por otra parte, no existe una característica de las mencionadas que sea única para este género; las cepas de bacterias en forma de cocos, Gram positivas y catalasa negativas de los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* pueden mostrar una o más de las características típicas del *Enterococcus* (10).

Con la excepción de *E. cecorum* todas las especies crecen a 10 °C, la mayoría de las especies desarrolla a 45 °C, algunos como *E. faecalis* y el *E. faecium* crecen a 50 °C. Todas las cepas de *E. gallinarum* y *E. flavescens* son móviles, *E. casseliflavus* y *E. malodoratus* producen H₂S (sulfuro de hidrógeno) (11, 12).

Se conocen en la actualidad 48 especies, clasificadas en siete grupos según los estudios de secuencia de ADN y la fracción de 16S de ARN (Tabla 1). Ellos son: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. dispar*, *E. faecalis*, *E. faecium*, y *E. saccharolyticus* (8).

Tabla 1: Especies incluidas en el género *Enterococcus*

Grupo	Especie
<i>E. avium</i>	<i>E. avium</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>E. psuedoavium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. raffinosus</i> , <i>E. casseliflavus</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>E. cecorum</i> , <i>E. columbae</i>
<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i> , <i>E. asini</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. haemoperoxidus</i> , <i>E. moraviensis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i>
<i>E. saccharolyticus</i>	<i>E. saccharolyticus</i> , <i>E. sulfureus</i>
Otras especies (aún no clasificadas)	<i>E. aquimarinus</i> , <i>E. azikevi</i> , <i>E. caccae</i> , <i>E. canis</i> , <i>E. anintestini</i> , <i>E. devriesei</i> , <i>E. gilvus</i> , <i>E. italicus</i> , <i>E. hermanniensis</i> , <i>E. inusitatus</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>Epallens</i> , <i>E. phoeniculicola</i> , <i>E. rattus</i> , <i>E. rottae</i> , <i>E. silesiacus</i> , <i>E. termitis</i> .

Fuente: Adaptado de Klein, G (2003) (9).

Como agentes oportunistas de infecciones relacionadas al ámbito hospitalario, son considerados el segundo patógeno responsable de infecciones hospitalarias en los Estados Unidos de América (infecciones urinarias, quirúrgicas, endocarditis, bacteriemias y raras veces meningitis), solo superado por *Escherichia coli* como causa de infección urinaria y tercero, luego de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativos, como agente de bacteriemia (4, 13).

Las especies de mayor importancia clínica son *Enterococcus faecalis* (80-90% de los aislamientos) y *E. faecium* (5-10%), mientras que *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae* y *E. casseliflavus* ocupan el tercer lugar, con una frecuencia en conjunto, menor del 10% (12). En nuestro país, según el programa VIHDA, los enterococos constituyen el cuarto microorganismo en orden de importancia en infecciones primarias de sangre, de sitio quirúrgico e infección urinaria en adultos internados en áreas no críticas (14,15). Factores de virulencia de *Enterococcus*, como hemolisinas, sustancias de agregación, bacteriocinas, proteasas y aglutininas, son los que favorecen las infecciones en huésped, especialmente en el anciano y en el paciente inmunocomprometido (2, 3, 16).

Clásicamente se consideraba que la infección enterocócica era de origen endógeno, pero la infección exógena, por transmisión cruzada a través del personal de salud, así como de paciente a paciente, o por consumo de agua o alimentos contaminados, está claramente demostrada en la actualidad, y es en este tipo de infecciones donde se han aislado cepas multiresistentes (2). En el año 1988 se publicaron los primeros casos de enterococos con alto nivel de resistencia a la vancomicina (ERV) en Reino Unido y Francia. A partir de allí se implementaron distintos protocolos de vigilancia para detectar pacientes portadores en servicios cerrados, lo que permitió caracterizar a los ERV como emergentes, productos de la presión de selección del medio hospitalario (17).

Sin embargo, a pesar de las medidas implementadas, se observó un ascenso exponencial de las tasas de portación en relación a las cifras de registros anteriores, por el empleo extensivo de la vancomicina (VAN) que ha provocado un aumento de enterococos resistentes a este antibiótico.

Hasta la fecha se han descrito seis fenotipos de resistencia a glicopéptidos en enterococos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE y VanG. Los fenotipos VanA y VanB son en el mundo los más ampliamente distribuidos y se presentan especialmente en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, aunque también han sido reconocidos en otras especies (3).

El fenotipo VanA se caracteriza por un elevado nivel de resistencia a la vancomicina ($\text{CIM} \geq 64 \mu\text{g/ml}$) y por la resistencia a la teicoplanina ($\text{CIM} > 16 \mu\text{g/ml}$), mientras que los fenotipos VanB presentan resistencia variable a la vancomicina (CIM entre 4 y 1000mg/ml) y son sensibles a la teicoplanina. Los fenotipos VanC, VanD, VanE y VanG, son de menor relevancia clínica (3). La mayoría de los aislamientos de ERV se refieren a pacientes hospitalizados, ya sea en unidades de cuidados intensivos, salas de oncología o unidades de transplante. También se los ha aislado en pacientes que presentaron largos periodos de internación, algún grado de inmunosupresión o que se les había suministrado antibióticos. Estos factores fueron determinantes para que se los encontrara asociados a brotes de infección hospitalaria. Además se encontraron *Enterococcus* aislados de aguas superficiales y aguas residuales que resultaron resistentes a vancomicina (18).

El primer aislamiento fehacientemente documentado en Argentina fue una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina portador del fenotipo VanA (19). Posteriormente se comunicaron otros aislamientos de *E. faecium* VanA e incluso *E. faecalis* VanB. Dos casos clínicos en los que se obtuvo aislamiento de *E. faecium* con fenotipo VanB (resistentes a vancomicina y sensibles a la teicoplanina), fueron atendidos en el Policlínico Bancario de Buenos Aires en julio del 2000. Los pacientes provenían de la comunidad y eran de sexo femenino. No referían internaciones previas ni tratamiento antimicrobiano reciente. (19).

No existen reportes en nuestra región que aborden este problema desde el punto de vista ambiental.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de enterococos en aguas del arroyo Vicario de la ciudad de Posadas, Misiones, conocer las especies predominantes, y caracterizar sus perfiles de resistencia considerando que éstos podrían ser buenos indicadores de las consecuencias ambientales del uso intensivo y extensivo de antibióticos en medicina humana y veterinaria.

Materiales y Métodos

Se trabajó con muestras tomadas del arroyo Vicario de la ciudad de Posadas, que fueron procesadas para recuento y aislamiento.

Las tomas de muestras se realizaron en tres puntos geográficos (Fig 1): Desembocadura sobre el Río Paraná (P1), Avenida Marconi (P2) y Avenida Uruguay (P3), durante seis muestreos en cada punto. Las muestras fueron transportadas en forma refrigerada al laboratorio (entre 4-10 °C aproximadamente), procesándose antes de las 6 horas.



Figura Nº 1: Uno de los puntos de muestreo de Arroyo Vicario.

Recuento e identificación

Para el recuento se utilizó el método de fermentación de los múltiples tubos expresando los resultados como Número Más Probable (NMP/100mL). Se realizaron diluciones seriadas de las muestras con agua destilada estéril como diluyente y se inocularon series de tres tubos con caldo de enriquecimiento azida dextrosa de doble y simple concentración (20), los que se incubaron a 35 °C durante 24-48h. Los tubos que presentaron turbidez fueron confirmados en placas de agar KF para estreptococos (6, 21, 22).

Las colonias típicas (colonias rojas/rosadas con halo amarillo) fueron repicadas para su propagación, en estrías de agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA) y se incubaron a 37 °C durante 24h. Con estas cepas se efectuaron: reacción de la catalasa, tinción de Gram y las pruebas bioquímicas para la identificación de género y especies tales como: desarrollo a 45 °C y 10 °C (en BHI caldo), movilidad, actividad de la enzima pirrolidonilarilamidasa (PYR), bilis esculina, desarrollo en medio con NaCl al 6,5% y con telurito al 0,04%, hidrólisis de Arginina y producción de ácido de manitol y arabinosa, con los que se obtuvieron las distintas especies que fueron posteriormente confirmadas por el laboratorio Nacional de Referencia INEI ANLIS Malbrán (6, 12, 23).

El NMP se calculó con la densidad de enterococos a partir del número de tubos que dieron turbidez y resultado positivo (+) en Agar K-F; además, la confirmación frente a las pruebas bioquímicas catalasa, tinción de Gram, crecimiento en presencia de 6.5% de cloruro de sodio y desarrollo a 10 °C y 45 °C en BHI caldo. Con las combinaciones de tubos positivos (+) y negativos (-) se leyó el NMP/100mL según la tabla de Mac Crady (20, 24).

Perfil de Sensibilidad Antimicrobiana

Para el estudio de la sensibilidad a los antibióticos, los aislamientos fueron reactivados con caldo BHI a 35 °C

por 24h, posteriormente se prepararon suspensiones de microorganismos, ajustadas a la escala 0,5 Mc-Farland e inocularon mediante hisopos estériles sendas placas de agar Mueller Hinton (Britania, Argentina). Se trabajó con monodiscos (Laboratorios Britania) de: vancomicina (Van 30 µg), gentamicina de alta carga (GHC 120 µg), estreptomina de alta carga (SHC 300 µg), teicoplanina (TEI 30 µg), ampicilina (Am 10 µg) conforme a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute. (25).

Se efectuó la lectura con la placa invertida e iluminación directa, luego de 18-24 h. de incubación a 37 °C, y se midieron los halos de inhibición en mm (Tabla 2, Fig. 2).

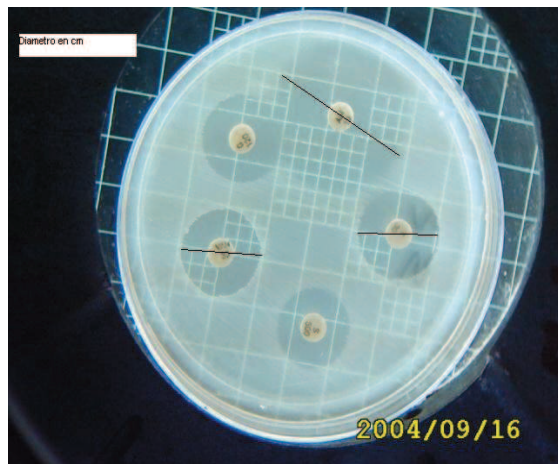


Figura 2: *Enterococcus* spp del Arroyo Vicario, Posadas Misiones. Lectura de Antibiógrama.

Las lecturas de los antibiógramas se efectuaron en base a los diámetros de corte de la Tabla 2 (25).

Tabla 2: Referencia (Diámetro de corte) CLSI 2012

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Gentamicina (Gen,M1)*	6	7-9	≥10
Estreptomina(Str)*	6	7-9	≥10
Ampicilina (Amp)	≤16	--	≥17
Vancomicina (Van)	≤14	15-16	≥17
Teicoplanina (T)	≤10	11-13	≥14

*Alta carga

Conservación y mantenimiento de cepas: Los microorganismos fueron conservados en Caldo Tripteaína Soya-Glicerina al 20%. Para ello, las cepas aisladas se repicaron en caldo Tripteaína Soya, o infusión de cerebro y corazón (BHI) y se incubaron durante 48 h a 37 °C, para obtener mayor inóculo y luego fueron repicadas (4 o 5 por cada cepa) en recipientes de plástico (Eppendorff) estériles conteniendo 1 mL del medio anteriormente mencionado y llevados a -20 °C (26).

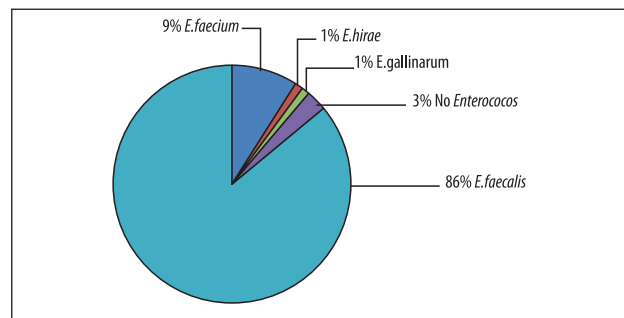
Como control del método de conservación, se tomaron 4-5 cepas (viales) al azar y se repicaron en Agar Tripteaína Soya, incubándose durante 48h a 37 °C observando el crecimiento de las mismas, y controlando con pruebas bioquímicas mínimas las características del género *Enterococcus*.

Resultados

Considerando 5 muestras en un período de 30 días, se obtuvieron las medias geométricas: (P1: 706,6±438,3; P2: 716±529,6 y P3: 702,8±544,7) NMP/100mL. Los recuentos de *Enterococcus* fueron similares en los 3 puntos con un promedio de 708,8±7,1NMP/100mL. El sexto muestreo tomado después de 15 días no fue considerado debido a las precipitaciones en la zona; con valores de 1100 NMP/100 mL en cada uno de los puntos.

Entre las 54 cepas aisladas, el 86% correspondió a *E. faecalis*, hallazgos que se ilustran en la Fig. 2.

Figura 2: Distribución de especies de *Enterococcus* detectadas en Arroyo Vicario Posadas- Misiones.



Se efectuó un antibiógrama a 32 cepas del total de aislamientos que fueron seleccionadas al azar, cuyas lecturas se exponen en la Tabla 3.

Tabla 3: Diámetros de halos de inhibición de *Enterococcus* spp frente a antibióticos. Aguas del Arroyo Vicario. Posadas Misiones.

Cepa	Vancomicina	Gentamicina	Estreptomina	Ampicilina	Teicoplanina
Diámetro del halo (mm)					
1	16	11	8	30	17
3	22	19	17	30	22
5	23	10	16	34	24
6	23	8	20	28	19
7	28	27	25	29	23
9	20	15	18	25	19
10	23	16	22	30	22
11	22	20	19	28	22
12	18	10	15	24	19
15	16	11	8	30	17
23	24	9	21	31	22
26	19	12	12	31	18
27	19	15	16	23	18
28	22	24	21	36	20
29	20	22	19	30	20
30	21	24	22	31	20
31	22	22	23	32	19
32	25	22	20	33	21
33	19	19	17	31	21
34	21	20	17	32	20
35	20	25	21	34	22
37	22	21	22	28	20
44	21	22	22	30	21
46	20	20	22	35	22
47	21	22	19	28	19
48	21	22	22	30	21
49	21	22	19	29	20
50	22	21	19	29	22
51	20	21	16	31	21
52	23	18	16	30	18
53	21	18	18	31	20
54	22	20	21	32	21

En Tabla 4 se presentan los perfiles de resistencia de *E. faecalis* y *E. faecium*. Se observa que *E. faecalis* (N = 28), mostró predominio de aislamientos sensibles a todos los ATB estudiados, aunque también resistencia intermedia en Van, resistencia de alta carga a Gen y Est. En cambio, todas las cepas estudiadas de *E. faecium* fueron sensibles a todos los ATB ensayados.

Tabla 4: Perfil de Sensibilidad de *E. faecalis* y *E. faecium* frente a ATB

	<i>E. faecalis</i> N=28 (87,5%)			<i>E. faecium</i> N=4 (12,5%)		
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Intermedio	Resistente
Amp	28	--	--	4	--	--
Van	27	1	--	4	--	--
Teico	28	--	--	4	--	--
Gen	26	2	--	4	--	--
Est	26	2	--	4	--	--

Discusión

La contaminación es un problema mundial inquietante en los lugares donde la población está creciendo rápidamente, como la ciudad de Posadas y no hay suficiente control sanitario sobre los efluentes arrojados a los cursos de aguas superficiales y profundas. Las aguas y los alimentos contaminados con microorganismos constituyen un vehículo de transmisión de enfermedades infecciosas; por otra parte, el desarrollo microbiano destruye grandes cantidades de alimentos, causando problemas económicos y una considerable pérdida de importantes nutrientes (27).

Considerando los niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación), con valores de hasta 33 NMP/100mL como aceptables, los recuentos obtenidos indican un alto nivel de contaminación en las aguas estudiadas. Esto significa un riesgo potencial de contaminación de colonización para humanos en contacto con cualquiera de los arroyos que se encuentran en la ciudad; además, los enterococos por tener una amplia distribución, gran capacidad para sobrevivir y desarrollarse bajo condiciones extremas, mayor resistencia a condiciones adversas como congelación, desecación y mayor sobrevivencia que los coliformes, estos microorganismos se han aislado de diferentes ecosistemas como agua superficiales, alimentos, plantas, suelos e insectos (1, 7, 28). También estos microorganismos se encuentran en el tracto gastrointestinal del ganado vacuno, cerdo y aves, perros, gatos (9).

La inconsciencia de la población ribereña establecida en los márgenes de este arroyo, que arrojan sus aguas residuales (y otros residuos), contribuyen a superar la lenta depuración natural del agua.

La selección y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos, es un problema creciente que limita las opciones terapéuticas. Tradicionalmente, la vigilancia de la dispersión de estas bacterias se realiza con microorganismos aislados de muestras clínicas, no habiéndose documentado en nuestra provincia en enterococos provenientes del medio ambiente.

Nuestros hallazgos, muestran amplia sensibilidad a los quimioterápicos ensayados (Tabla 4). El 100% de nuestros aislamientos mostró sensibilidad a ampicilina, si bien se reportan Enterococos productores de β -lactamasas no detectadas por el disco de ampicilina, estos aislamientos son escasos (29). La ausencia de enterococos resistentes a vancomicina en aguas, ha sido reportada por otros investigadores de Argentina (30). Este resultado contrasta con los comunicados en países europeos (6, 31) y en Cuba (32), en los que se encontró una alta prevalencia de Enterococos resistentes a vancomicina en muestras ambientales. Si bien en el presente estudio se detectó sensibilidad disminuida a esta droga en un solo aislamiento de *E. faecalis*, debe constituir una alarma y considerarse su vigilancia en el ambiente (4, 17). En cuanto a aminoglucósidos, y como se desprende de la Tabla 4, fue baja la resistencia de alta carga encontrada, y al igual que investigadores de Bahía Blanca, Buenos aires, no se aislaron cepas con resistencia simultánea a ambos antibióticos (gentamicina y estreptomina) (30).

Nuestros hallazgos, muestran la importancia de la detección temprana de estos microorganismos en los procesos de control de calidad de las aguas y los alimentos, vehículos de transmisión de microorganismos muchos de los cuales con resistencia a antibióticos y la probable transferencia horizontal de las mismas a otras bacterias que comparten el hábitat, pudiendo constituir un reservorio de las mismas.

Conclusiones

En todas las muestras se detectaron enterococos. Con un valor promedio de $708,6 \pm 7,1$ NMP/100mL, muy superior a los considerados aceptables por los niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente (Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación), que establece valores de hasta 33NMP/100mL para considerarlo apto para el baño.

La presencia importante de *E. faecalis* y *E. faecium* con una distribución uniforme a través del tiempo y de las zonas de muestreo, evidencia una contaminación fecal apreciable de origen humano, la cual puede provenir de los asentamientos poblacionales aledaños al curso de agua.

La resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos y aminoglucósidos, no constituyó un factor alarmante en nuestro estudio, siendo la totalidad de los aislamientos sensibles a ampicilina y los aislamientos resistentes a alta carga de aminoglucósidos no presentaron resistencia combinada de ambos. Sin embargo, la presencia de un aislamiento con sensibilidad disminuida a vancomicina, debe alertarnos a continuar con la vigilancia de estos perfiles en el ambiente.

Los hallazgos de este estudio constituyen una alerta sobre la posibilidad de dispersión de bacterias resistentes en el ambiente acuático, el cual se constituiría en un reservorio de las mismas, pudiendo ser diseminadas a la población en general.

Bibliografía

- Benassi, F.; Palmieri de Morey S.; Leardini N. *Investigación de Streptococos Fecales en Aguas del Arroyo Zaimán.*, Rev. Arg. de Microbiol. Vol. 18. N° 2: p. 79-82. 1986.
- Ayats Ardite J. *Resistencia a la Vancomicina en el Género Enterococcus*, Control, Calidad SEIMEC. http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/envancor.html. 2007.
- Klare, I.; Konstabel, C.; Badstübner, D.; Werner, G.; Witte, W. *Occurrence and spread of antibiotic resistances in Enterococcus faecium*. Int J Food Microbiol. Dec 1; 88 (2-3): p. 269-290. 2003.
- Facklan, R.; Sahm, D.; Teixeira, L. "Enterococcus". In: Murray, P.R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C. and Tenover, R. H. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. p. 297-305. Washington D. C.: ASM PRESS. 1999.
- Deurenberg, R.H.; Stobberingh, E.E. *The evolution of Staphylococcus aureus*. Infect Genet E. 8: p. 747-763. 2008.
- Novais, C.; Coque, T.M.; Ferreira, H.; Sousa, J.C.; Peixe, L. *Environmental contamination with vancomycin-resistant enterococci from hospital sewage in Portugal*. Appl Environ Microbiol. 71: p. 3364-3368. 2005.
- Suárez Pita, M. *Tendencia Actual del Streptococo como Indicador de Contaminación Fecal.*, Rev. Cubana Hig Epidemiol Vol. 40(1): p. 38-43. 2002.
- Giraffa, G. *Enterococci from foods*, FEMS Microbiology Reviews. 26: p. 163-171. 2002.
- Klein, G. *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract.*, Int.J.Food Microbiol., www.elsevier.com/locate/ijfood-micro. 2003.
- Ruoff, K. "Aerococcus, Abiotrophia, and other catalase-negative, gram-positive cocci". In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. p. 443-454. Washington D.C: ASM. PRESS. 2007.
- Schleifer, K.H.; Kilpper-Bälz, H. *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.*, Int J Syst Bacteriol. Vol.34: p. 31-34.1984.
- Vay, C.; Bantar C. *Identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas*. Curso de Microbiología Clínica Módulo 3, Asociación Argentina de Microbiología, Colegio de Bioquímicos. de la provincia de Entre Ríos. Fac. Bqca. y Cs. Biológicas UNL, 1997.
- Jeff, B.; Huycke, M. Gilmore, M. *Virulence of enterococci*. Clin Microbiol Rev. 7: p. 462-478, 1994.
- Togneri, A.M.; Corso, A.; González, J.; Lopardo, H.; Podestá, L.B.; Galletti, L.; Pérez, M.; Rodríguez, V.; Rodríguez, M.; Ríos, L.; Dinerstein, E. *Análisis clínico-epidemiológico de la portación intestinal de enterococos resistentes a vancomicina en una unidad de terapia intensiva*. Rev. Arg. de Microb. Vol. 35: p. 41-44. 2003.
- Programa Nacional de Vigilancia de Infecciones Hospitalarias de Argentina (VIHDA). *Estudio Nacional de Diagnóstico Institucional y Prevalencia de Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud en Áreas No Críticas de Hospitales de Argentina*. 2010. <http://www.vihda.gov.ar>. Dic. 2011.
- Acosta Gnass, S. *Enterococcus*. Buenos aires: Grupo Ase-sor Control de Infecciones y Epidemiología. p. 1-15. 2005 <http://www.codeinap.com.ar/control/Enterococcus.pdf>. Acceso Dic. 2008.
- Rice, L.B. *Emergency of Vancomycin-Resistant enterococci.*, Infect. Dis. Vol.7: p. 183-187. 2001.
- Marcinek, H.; Wirth, R.; Muscholl-Silberthorn, A.; Gaver, M. *Enterococcus faecalis gene transfer under natural conditions in municipal sewage water treatment plants*. Appl. Environ.Microbiol. 64: p. 626-632. 1998.
- Marín, E.; Mera, J.R.; Anduino, R.C.; Correa, A.P.; Coque, T.M.; Stamboulia, D.; Murria, B.E. *First Report of Vancomycin resistant Enterococcus faecium isolated in Argentina*. Clint. Infect. Dis. Vol. 26: p. 235-236. 1998.
- Standard Methods for examination of Water and Waste Water. APHA (American Public Health Association). 21th Ed. Copyright. 2005.
- Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente. Subse-cretaría de Recursos Hídricos de la Nación. Diciembre 2001.
- Morrison, D.; Woodford, N.; Cookson, B. *Enterococci as emerging pathogens of humans*. J. Appl. Microbiol. Vol. 83: p. 89-99. 1997.
- Hernández, C.; Gómez, M.; Muñoz, F.; Zamora, F.; Villaroel, M.; Medina, G. *Identificación de cepas de enterococos utilizando el método convencional y el sistema automatizado ATB – plus*. Boletín SVM. 2: 58-50. 1999.
- Mac Faddin, J. *Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica Panamericana. 1980.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing for bacterial that grow aerobically. Approved standards. 6Th edition; 13th Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2003.
- Tejedor Junco, I.M.; González Martín, M.; Pita Toledo, M.L.; Lupiolla Gómez, P.; Martín Barrasa, J.L. *Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples*. Int J Hyg Environ Health. Vol. 203 - 4: p. 363-368. 2001.
- Díaz Pérez, M.; Rodríguez Martínez, C.; Zhurbenko, R. *Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad*. Rev Cubana Hig Epidemiol v. 48, n° 2. 2010.
- Pucciarelli, A.B.; Zubreski, R.E.; von Specht, M.H.; Benassi, F.O.(†), *Estudio de Enterococcus spp. en Aguas de Arroyos de Posadas- Misiones.*, Revista de Ciencia y Tecnología-FCEQyN-Centro de Investigación y Desarrollo Tecno-

- lógico (CIDeT)-UNaM. Vol 9: p. 32-35 - 2007.
29. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty Second Informational Supplement.** *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)-M100-S22*; Vol. 32, N° 3: p. 91. Jan 2012.
 30. **Baldini, M.; Zelser, P.** *Patrones de resistencia a antibióticos de enterococos aislados de aguas estuarinas.*, Rev Arg de Microbiol Vol. 40: p. 48-51. 2008.
 31. **Iversen, A.; Kühn, I.; Franklin, A.; Möllby, R.** *High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage*, *Appl Environ Microbiol.* 68: p. 2838-2842. 2002.
 32. **Junco Díaz, R.A.; Suárez Pita, M.T.; Weng Alemán, Z.; Chiroles Rubalcaba, S.; González González, M.I.; Díaz Rosa, O.E.** *Sensibilidad antimicrobiana en bacterias de origen ambiental.*, Hig Sanid Ambient. 6: p. 150-159. 2006.

Recibido: 21/08/2012

Aprobado: 26/08/2013

Efecto de cultivos lácticos sobre el desarrollo a bajas temperaturas de microorganismos causantes de ETA

Effect of bioprotective lactic cultures on the growth of food-borne pathogenic microorganisms at low temperatures

Silvia G. Ortiz^{1,*}, Laura B. Duverne¹, Oscar C. López¹, Silvia Raffellini¹, María C. Mans¹

1- Universidad Nacional de Luján, Departamento de Tecnología, Buenos Aires, Argentina.

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

Resumen

El incremento de la demanda de vegetales mínimamente procesados trajo aparejada una mayor incidencia de brotes de ETA asociados con su consumo. La aplicación de bacterias lácticas podría limitar el desarrollo de microorganismos patógenos en estos alimentos durante su almacenamiento en frío. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de cultivos lácticos aislados de vegetales mínimamente procesados sobre el desarrollo de microorganismos patógenos e indicadores en sistema modelo a bajas temperaturas. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli* se inocularon en caldo triptona soja (10^4 ufc/ml) en cocultivo con cepas nativas de bacterias lácticas, y se incubaron 4 días a temperaturas entre 5 y 15 °C. Periódicamente se hicieron recuentos de microorganismos sobrevivientes. *L. monocytogenes*, en los controles sin cultivos lácticos, presentó fase lag solamente a 5 °C, y a 15 °C alcanzó la fase de crecimiento estacionario a las 48 h de incubación. Con la adición de cultivos lácticos se prolongó la fase lag, disminuyó la velocidad de crecimiento y no se alcanzó la fase de crecimiento estacionario durante los 4 días de incubación. *S. Enteritidis* se mantuvo estable a 5 °C, sin diferencia significativa entre los tratamientos en cocultivo con bacterias lácticas y el control. En cambio, a 15 °C en cocultivo con bacterias lácticas se observó menor velocidad de crecimiento. *E. coli* no presentó diferencias significativas entre los tratamientos control y en cocultivo con bacterias lácticas. Se concluye que los cultivos lácticos nativos podrían funcionar como barrera adicional para limitar el desarrollo de patógenos en alimentos a bajas temperaturas, sin incidir en el desarrollo de los indicadores.

Palabras clave: Bioprotección; Bacterias lácticas; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Enteritidis; *Escherichia coli*.

Abstract

Increasing demand for minimally processed vegetables brought about a higher incidence of outbreaks of foodborne illnesses associated with their intake. Lactic acid bacteria may limit the development of pathogens in these foods during cold storage. The objective of this work was to evaluate the effect of lactic acid bacteria isolated from minimally processed vegetables on the growth of pathogenic and indicator bacteria in a model system at low temperatures. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *E. coli* were inoculated into tryptone soy broth (concentration: 10^4 cfu / ml) in coculture with native lactic acid bacteria strains, and incubated for 4 days at temperatures between 5 and 15 °C. Periodically, bacteria survivors were determined by the plate-count technique. Control treatments of *L. monocytogenes* (without lactic cultures added) showed only lag phase at 5 °C, and reached the stationary growth phase at 15 °C - 48 h. With lactic cultures added, *L. monocytogenes* showed a longer lag phase, a slower growth rate and did not reach the stationary-phase during the 4 days of incubation. *S. Enteritidis* remained stable at 5 °C, without significant difference between control and treatments in coculture with lactic bacteria. In contrast, at 15 °C *S. Enteritidis* showed slower growth rate in coculture with lactic acid bacteria. *E. coli* showed no significant differences between treatments in control and co-culture with lactic acid bacteria. In conclusion, the native lactic cultures could function as an additional barrier to limit the growth of pathogens in food at low temperatures, without affecting the growth of indicators.

Keywords: Bioprotection; Lactic acid bacteria; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella* Enteritidis; *Escherichia coli*.

Introducción

Las hortalizas y frutas frescas son vulnerables a la contaminación con microorganismos que pueden provocar enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) debido a su consumo sin ningún tipo de procesamiento térmico (1). El riesgo de producción de ETA se ve agravado por la ausencia de controles microbiológicos sistemáticos en estos productos y por los cambios operados en los últimos años en los sistemas de comercialización, como por ejemplo el expendio bajo nuevas formas de presentación, tales como los llamados productos frescos cortados o productos de IV GAMA mínimamente procesados (2). El incremento de la demanda de vegetales de IV GAMA trajo aparejada una mayor frecuencia de incidencia de brotes de ETA asociados con su consumo, producidos por virus, parásitos y bacterias (3, 4). Entre las bacterias involucradas en dichos brotes se destacan *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 y *Shigella* spp. (5, 6, 7). En respuesta a la preocupación respecto a la inocuidad microbiológica de frutas y hortalizas mínimamente procesadas, las agencias de salud pública están estableciendo especificaciones microbiológicas para el control de estos productos en las que se estipula la investigación de estos patógenos o de microorganismos que pudieran ser indicadores de la presencia de los mismos (8). Paralelamente, la industria de los vegetales mínimamente procesados se encuentra en constante búsqueda de nuevas tecnologías para el mantenimiento de la calidad y para la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables en todos los pasos de la cadena de producción y distribución (9). Entre las alternativas disponibles se destaca la utilización de tecnologías basadas en la “bioconservación” o “bioprotección”, que se define como la aplicación de microorganismos antagonistas o sus productos metabólicos para inhibir o destruir la microbiota indeseable (autóctona o contaminante, patógena o deteriorante) de un alimento, produciendo por consiguiente el incremento de la inocuidad y la vida útil sin modificar en forma perceptible la calidad sensorial del mismo (10).

La aplicación de cultivos lácticos bioprotectores concentrados podría ser una herramienta para inactivar o limitar el desarrollo de microorganismos patógenos en vegetales frescos o mínimamente procesados durante su almacenamiento en frío (11, 12), pues a bajas temperaturas las bacterias lácticas ejercerían su capacidad antagonista por ocupación espacial de nicho ecológico y excreción de metabolitos antimicrobianos (por ejemplo bacteriocinas), pero sin producir procesos fermentativos que modifiquen la calidad sensorial del producto alimenticio (13). El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cultivos lácticos, aislados de vegetales mínimamente procesados, en el desarrollo de microorganismos patógenos e indicadores en sistema modelo (medio de cultivo líquido) a bajas temperaturas.

Materiales y métodos

Microorganismos, condiciones de almacenamiento y preparación de inóculos

En este trabajo se utilizaron *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serov. Enteritidis MA 44 como cepas representativas de patógenos causantes de ETA en vegetales frescos y mínimamente procesados, y *Escherichia coli* ATCC 35218 como cepa representativa de microorganismos indicadores de contaminación fecal y de probable presencia de microorganismos patógenos entéricos en estos alimentos. Las cepas se conservaron a -20 °C en caldo triptona soja (TSB, Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) suplementado con 0,6% de extracto de levadura y adicionado con 15% de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en TSB suplementado con 0,6% de extracto de levadura y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los cultivos resultantes se emplearon como inóculo en los ensayos.

Como cultivos lácticos bioprotectores se utilizaron las cepas mesófilas *Leuconostoc* sp. LL R15 y *Pediococcus* sp. LL R106 (heterofermentativa y homofermentativa respectivamente), aisladas a partir de radicheta (*Cichorium intybus*) mínimamente procesada (14). Las cepas se conservaron a -20 °C en caldo MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) adicionado con 15% de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Los cultivos resultantes se concentraron por centrifugación y se emplearon como inóculo en los ensayos correspondientes.

Evaluación del efecto de la aplicación de cultivos lácticos bioprotectores en el crecimiento de bacterias patógenas e indicadora a bajas temperaturas en sistemas modelo

L. monocytogenes ATCC 7644, *S. Enteritidis* MA 44 y *E. coli* ATCC 35218 se inocularon por separado en erlenmeyers con 100 ml de TSB suplementado con 0,6% de extracto de levadura (concentración final $\approx 10^4$ ufc/ml), a los cuales se les adicionaron los cultivos lácticos concentrados (homofermentativo o heterofermentativo) en ensayos independientes (concentración final $\approx 10^8$ ufc/ml). Como controles se emplearon erlenmeyers inoculados solamente con cada una de las cepas en estudio. Los erlenmeyers se incubaron a 5, 10 y 15 °C durante 4 días. Las temperaturas se eligieron por ser la óptima para el almacenamiento de vegetales mínimamente procesados (5 °C) o por implicar condiciones de abuso para la conservación de alimentos que deben almacenarse refrigerados (10 y 15 °C) (15). Periódicamente los tratamientos se sometieron a recuentos de células viables en placas con medios agarizados Oxford, *Salmonella Shigella* y Violeta Rojo Bilis Lactosa, según

corresponda, que se incubaron 24 h a 37 °C. Los recuentos de bacterias lácticas se realizaron en agar MRS incubado 48 h a 30 °C bajo condiciones de anaerobiosis. Todos los ensayos y recuentos se realizaron por triplicado y se reportan los valores promedio obtenidos en log ufc/ml. Las curvas experimentales de crecimiento se representaron como log ufc/ml en función del tiempo.

Determinación de duración de las fases de crecimiento y de velocidad de duplicación en fase exponencial

La duración de las distintas fases de desarrollo y la velocidad de duplicación (VD) de las poblaciones microbianas en cada tratamiento se estimaron a partir de sus respectivas curvas experimentales de crecimiento.

Se consideró “velocidad de duplicación” (VD) al número de duplicaciones por unidad de tiempo (día) durante la fase exponencial, y se calculó mediante la aplicación de la ecuación 1 (16):

$$VD = [(\log N - \log N_0) 3,33]/t \quad (1)$$

donde: N = población microbiana al final de la fase exponencial o del período bajo análisis

N₀ = población microbiana al inicio de la fase exponencial o del período bajo análisis

t = tiempo de duración de la fase exponencial o del período bajo análisis (días)

Análisis estadístico

Los análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher), empleados para establecer diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$) se realizaron usando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (StatPoint Inc., USA).

Resultados y discusión

Las cinéticas de crecimiento de los cultivos puros (controles) de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis MA 44 y *Escherichia coli* ATCC 35218, y en cocultivo con bacterias lácticas (específicamente con *Leuconostoc* sp. LLR 15), expuestos a bajas temperaturas (5, 10 y 15 °C) en sistema modelo líquido (medio TSB con 0,6 % de extracto de levadura), se visualizan en la Figura 1.

Analizando el comportamiento de estos microorganismos en los sistemas modelo sin adición de bacterias lácticas se observa que a 5 °C, *L. monocytogenes* presentó una fase de latencia de solamente 2 días a partir de la cual la población inició la fase de multiplicación exponencial (Figura 1 a), de acuerdo con la naturaleza psicrófila del microorganismo (17).

En cambio, en los tratamientos controles de *S. Enteritidis* y *E. coli* a 5°C, sus poblaciones se mantuvieron estables

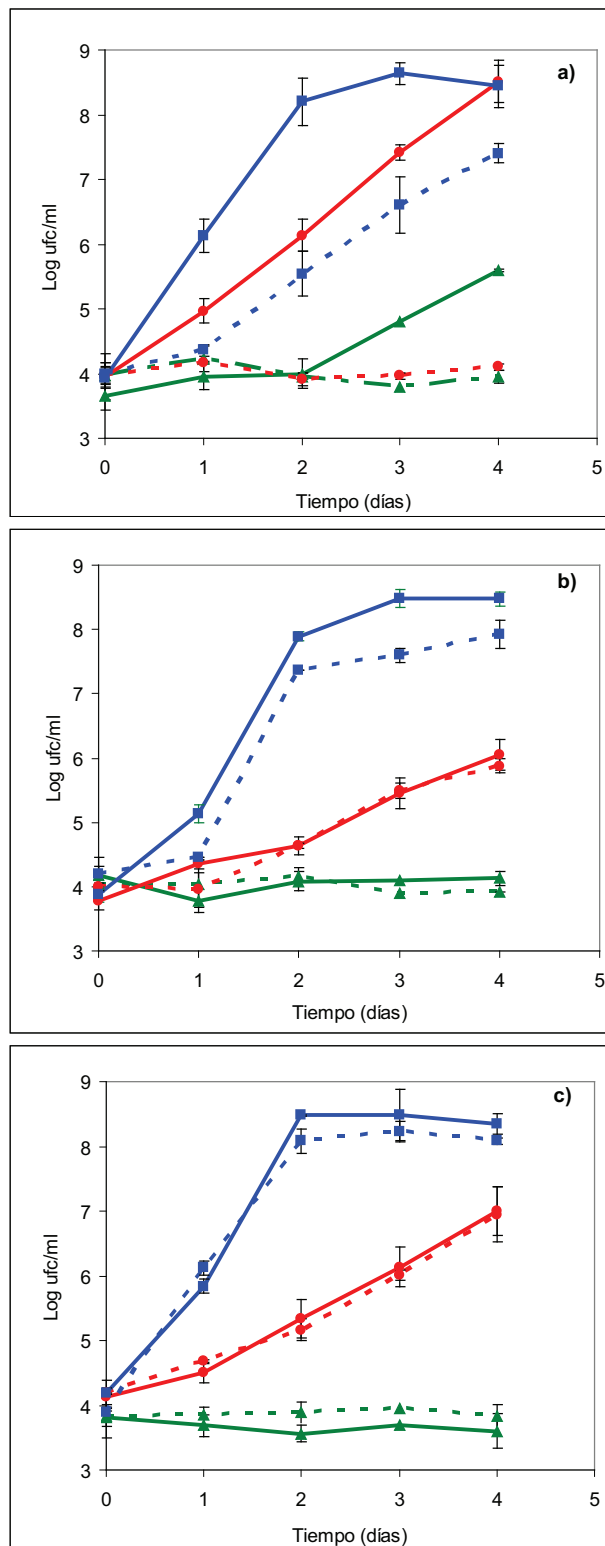


Figura 1: Efecto de la temperatura (5, 10 y 15 °C) y del cocultivo con *Leuconostoc* sp. LLR 15 (+ CL) en las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (a), *Salmonella* Enteritidis MA 44 (b) y *Escherichia coli* ATCC 35218 (c), en medio líquido.

—▲— 5 °C; - -▲- - 5 °C + CL; —●— 10 °C; - -●- - 10 °C + CL; —■— 15 °C; - -■- - 15 °C + CL

en fase de latencia durante todo el período de incubación (Figura 1 b y c).

A mayores temperaturas (10 °C y 15 °C), ninguna de las tres especies en cultivo puro sin adición de bacterias lácticas presentó fase de latencia (Tabla 1). No obstante, a 10 °C sus cinéticas de crecimiento difirieron significativamente ($P < 0,0001$) entre sí, debido a las diferencias en sus respectivas velocidades de duplicación (*L. monocytogenes* > *E. coli* > *S. Enteritidis*), según se visualiza en la Tabla 1, lo cual condujo a diferencias significativas en las poblaciones alcanzadas hacia el final del período de incubación (8,51 log en *L. monocytogenes*, 7,00 log en *E. coli* y 6,05 log en *S. Enteritidis*).

Tabla 1: Efecto del cocultivo con *Leuconostoc sp.* LLR 15 (CL) y la temperatura de incubación en la duración de la fase de latencia (días) y en la velocidad de duplicación en fase exponencial (duplicaciones/día) de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. Enteritidis* MA 44 y *E. coli* ATCC 35218 en medio líquido

Microorganismo	Fase de latencia (días)			Velocidad de duplicación (duplicaciones/día)		
	Adición o no de cultivo bioprotector	Temperatura			Temperatura	
		5 °C	10 °C	15 °C	5 °C	10 °C
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	Sin CL(1)	2	0	0	2,7	3,8
	Con CL(2)	4	4	1	0	0
<i>S. Enteritidis</i> MA 44	Sin CL	4	0	0	0	2,0
	Con CL	4	1	0	0	2,1
<i>E. coli</i> ATCC 35218	Sin CL	4	0	0	0	2,4
	Con CL	4	0	0	0	2,3

(1) Desarrollo del microorganismo sin adición de *Leuconostoc sp.* LLR 15;

(2) Desarrollo del microorganismo en cocultivo con *Leuconostoc sp.* LLR 15.

Ninguna de las tres especies alcanzó la fase estacionaria a 10 °C durante los 4 días de incubación si bien, teniendo en cuenta la población alcanzada, *L. monocytogenes* posiblemente ya estaría en el inicio de la misma (Figura 1).

A 15 °C, las velocidades de duplicación durante la fase exponencial de crecimiento se incrementaron 87%, 155% y 195% con respecto a las observadas a 10 °C para *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* y *E. coli*, respectivamente (Tabla 1). Además, las tres especies alcanzaron la fase estacionaria (a las 48 h *L. monocytogenes* y *E. coli*, y a las 72 h *S. Enteritidis*), con poblaciones máximas de $\approx 8,5$ log (Figura 1).

El cocultivo con bacterias lácticas (cuyas cargas se mantuvieron estables durante todo el ensayo y en todos tratamientos) tuvo efectos disímiles en los tres microorganismos.

En *Listeria monocytogenes*, los cultivos lácticos provocaron modificaciones en las cinéticas de crecimiento a las tres temperaturas ensayadas (Figura 1a). A 5 °C, las bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas prolongaron significativamente ($P = 0,0001$) la fase de latencia de *Listeria* durante todo el período de incubación (4 días), en comparación con el control, en el que dicha fase duró solamente 2 días (Tabla 1).

A 10 °C y 15 °C, la diferencia significativa entre la cinética de crecimiento en el tratamiento control y la observada

en los cocultivos con bacterias lácticas se mantuvo durante todo el período de incubación ($P < 0,0001$), ya sea porque en los cocultivos se produjo una notable prolongación de duración de la fase de latencia de *L. monocytogenes* a 10 °C o una disminución de su velocidad de duplicación a 15 °C (Tabla 1), lo cual condujo a menores poblaciones del patógeno al final de la incubación y a que no se haya llegado a la fase estacionaria de crecimiento (Figura 1 a).

Además, no se observaron diferencias significativas entre los efectos producidos por los distintos cultivos lácticos en el comportamiento de *L. monocytogenes* (P entre 0,0559 y 0,8964). Por consiguiente, tanto los cultivos lácticos homofermentativos como los heterofermentativos podrían actuar como bioprotectores contra *Listeria monocytogenes* en condiciones de refrigeración pues producen retardo en el crecimiento del patógeno. La actividad antagónica observada producida por los cultivos lácticos podría deberse a la competencia por la ocupación espacial de nicho ecológico, o bien, a la excreción de metabolitos antimicrobianos (por ejemplo, compuestos de bajo peso molecular y bacteriocinas) que estos generarían a los cuales *L. monocytogenes* sería sensible (13, 18).

Con respecto al comportamiento de *S. Enteritidis* en cocultivo con bacterias lácticas, a 5 °C la población de *Salmonella* se mantuvo estable durante el período de incubación, y no hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos con adición de los diferentes cultivos lácticos (Figura 1 b). En consecuencia podría deducirse que la aplicación de temperaturas de 5 °C es de por sí suficiente para mantener a *S. Enteritidis* en fase de latencia.

A 10 °C solamente se observó diferencia significativa entre el control y los tratamientos con bacterias lácticas en el primer día de incubación ($P: 0,0054$), debido a que tanto los cultivos heterofermentativos como los homofermentativos, sin diferencias significativas entre ellos ($P: 0,6286$), provocaron que *S. Enteritidis* presentara una fase de latencia de 1 día (Tabla 1). Una vez superada la misma, no hubo diferencias significativas entre el control y los tratamientos con bacterias lácticas durante el período de incubación restante (P entre 0,5007 y 0,6588), y sus velocidades de duplicación fueron prácticamente iguales (Tabla 1).

En cambio, a 15 °C se observaron diferencias significativas entre el control y el cultivo con bacterias lácticas heterofermentativas durante todo el período de incubación y en la población máxima alcanzada (P entre 0,0374 y 0,0001), debido a que la presencia de estas bacterias provocó una disminución del 40% de la velocidad de duplicación de *S. Enteritidis*, comparada con la observada en el cultivo control (Tabla 1). Por el contrario, a dicha temperatura no se observaron diferencias significativas entre el cocultivo con bacterias lácticas homofermentativas y el tratamiento control (P entre 0,0655 y 0,1813) durante todo el período de incubación.

Por consiguiente, solo los cultivos lácticos hetero-

fermentativos presentarían efecto bioprotector contra *S. Enteritidis*, aunque de menor magnitud que el observado en *L. monocytogenes*.

En *E. coli*, no se observaron diferencias significativas entre las curvas de crecimiento de los tratamientos control y en cocultivo con bacterias lácticas (P entre 0,1216 y 0,7618) bajo ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 1 c), ni en los parámetros que caracterizan a dichas curvas, como por ejemplo la velocidad de duplicación en fase exponencial (Tabla 1). Por consiguiente los cultivos lácticos empleados no producen efecto bioprotector contra este microorganismo que es ampliamente utilizado en microbiología como índice de la probable presencia de bacterias patógenas de origen entérico, por ejemplo *Salmonella* spp., en alimentos y en productos y/o ambientes relacionados con su producción, y como indicador de contaminación fecal en vegetales frescos y mínimamente procesados (8). El comportamiento de *E. coli* ante estos cultivos lácticos bioprotectores presenta como ventaja que con el empleo de los mismos no se enmascara su presencia y por consiguiente permanece inalterable su cualidad de indicador de patógenos entéricos.

Por otro lado, en la industria alimentaria se están utilizando cepas de referencia de *E. coli* como subrogantes de *Salmonella* sp. para las evaluaciones de procesos a escala piloto o industrial, en la cuales no se puede introducir el patógeno (19). Una de las condiciones que debe cumplir una cepa para poder ser empleada como subrogante es presentar un comportamiento similar al patógeno que reemplaza frente al proceso en estudio (20). Desde este punto de vista, la cepa *E. coli* ATCC 35218 utilizada en este trabajo no sería un adecuado subrogante de *Salmonella* en la evaluación de cultivos bioprotectores pues ha presentado diferencias significativas con el comportamiento observado en *S. Enteritidis* MA 44 frente a bacterias lácticas heterofermentativas a 10 y 15 °C (valores de P entre 0,0295 y 0,0001).

Conclusiones

Se concluye que, de acuerdo con los comportamientos observados en sistema modelo, los cultivos lácticos nativos podrían funcionar como barrera adicional para limitar el desarrollo de patógenos en alimentos conservados a bajas temperaturas, como por ejemplo vegetales frescos o mínimamente procesados, sin incidir en el desarrollo de los indicadores recomendados para estos productos alimenticios, lo cual alienta la realización de estudios futuros para la evaluación de su efectividad en matrices vegetales. No obstante se considera necesario probar otras cepas de *E. coli* u otras especies bacterianas para ser empleadas como subrogante de enterobacterias patógenas en la evaluación a escala industrial de la aplicación de cultivos bioprotectores en alimentos.

Agradecimientos

Los autores agradecen el subsidio otorgado por el Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján para la realización de este trabajo.

Bibliografía

1. Berger, C.N.; Sodha, S.V.; Shaw, R.K.; Griffin, P.M.; Pink, D.; Hand, P. and Frankel, G. *Fruit and vegetables as vehicles for transmission of human pathogens*. Environ. Microbiol. 12: p. 2385–2397. 2010.
2. Garret, E.H.; Gorny, J.R.; Beuchat, L.R.; Farber, J.M.; Harris, L.J.; Parish, M.E.; Suslow, T.V. and Busta, F.F. *Microbiological safety of fresh and fresh-cut produce: Description of the situation and economic impact*. Comp. Rev. Food Sci. Food Saf. 2: p. 13–37. 2003.
3. Abadias, M.; Usall, J.; Anguera, M.; Solsona, C. and Viñas, I. *Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments*. Int. J. Food Microbiol. 123: p. 121–129. 2008.
4. Painter, J.A.; Hoekstra, R.M.; Ayers, T.; Tauxe, R.V.; Braden, C.R.; Angulo, F.J. and Griffin, P.M. *Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008*. Emerg. Infect. Diseases 19: p. 407–415. 2013.
5. Gorny, J.R. *Microbial contamination of fresh fruits and vegetables in Microbiology of fruits and vegetables*. G.M. Sapers; J.R. Gorny and A.E. Yousef, Editor. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton. P. 4–32. 2006.
6. Centers for Disease Control and Prevention (2012) Foodborne outbreak online database (FOOD) [On line]. Available at <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/> (verified 4 Mayo 2013).
7. Kozak, G.K.; MacDonald, D.; Landry, L. and Farber J.M. *Food-borne outbreaks in Canada linked to produce: 2001 through 2009*. J. Food Prot. 76: p. 173–183. 2013.
8. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (2012). *Código Alimentario Argentino*. Capítulo XI. Alimentos vegetales. Artículo 925 quarter [On line]. Available at http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp (verified 4 Mayo 2013).
9. González-Aguilar, G.A.; Ruiz-Cruz, S.; Cruz-Valenzuela, R.; Ayala-Zavala, J.F.; De La Rosa, L.A.; Alvarez-Parrilla, E. *New technologies to preserve quality of fresh-cut produce in Food engineering: Integrated approaches*. G.F. Gutiérrez-López; G.V. Barbosa-Cánovas; J. Welti-Chanes; E. Parada-Arias, Editor. Springer, New York. P. 105–115. 2008.
10. Voula, A.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K. and Holzapfel, W. (2013). *Status and trends of the conservation and sustainable use of micro-organisms in food processes fao background study paper N° 65* [On line]. Available at

- <http://www.fao.org/docrep/meeting/028/mg309e.pdf> (verified 9 mayo 2013).
11. Randazzo, C.L.; Pitino, I.; Scifò, G.O. and Caggia, C. *Biopreservation of minimally processed iceberg lettuces using a bacteriocin produced by Lactococcus lactis wild strain*. Food Control. 20: p. 756-763. 2009.
 12. Trias, R.; Badosa, E.; Montesinos, E. and Bañeras, L. *Bioprotective Leuconostoc strains against Listeria monocytogenes in fresh fruit and vegetables*. Int. J. Food Microbiol. 27: p. 91-98. 2008.
 13. Reina, L.D; Breidt, F.; Fleming, H.P. and Kathariou, S. *Isolation and selection of lactic acid bacteria as biocontrol agents for nonacidified, refrigerated pickles*. J. Food Sci. 70: p. M7-M11. 2005.
 14. Ortiz, S.; Duverne, L.; López, O.; Raffellini, S. y Mans, M.C. *Selección de bacterias lácticas inhibidoras de microorganismos patógenos aisladas de vegetales minimamente procesados*. Proceedings del XII CYTAL. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2009.
 15. Allende, A.; Martínez, B.; Selma, V.; Gil, M.I.; Suárez, J.E.; Rodríguez, A. *Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing Listeria monocytogenes in vitro and in fresh-cut lettuce*. Food Microbiol. 24: p. 759-766. 2007
 16. Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Stahl, D.A. and Clark, D.P. *Brock Biology of microorganisms*. 13th Edition, Benjamin Cummings, San Francisco. P. 123-126. 2012.
 17. International Commission on Microbiological Specifications for Food, *Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos*, Editorial Acribia, Zaragoza. P. 165- 209. 1996.
 18. Ananou, S.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno M. and Valdivia, E., *Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods*, A. Méndez-Vilas, Editor. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. P. 475. 2007.
 19. Eblen, D.R.; Annous, B.A. and Sapers, G.M., *Studies to select appropriate nonpathogenic surrogate Escherichia coli strains for potential use in place of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in pilot plant studies.*, J. Food Prot. 68: p. 282-291. 2005.
 20. Busta, F.F.; Suslow, T.V.; Parish, M.E.; Beuchat, L.R.; Farber, J.N.; Garret, E.H. and Harris, L.J., *The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce.*, Comp. Rev. Food Sci. Food Saf. 2: p. 179–185. 2003.

Recibido: 12/12/2012

Aprobado: 23/10/2013

Efecto del almacenamiento congelado sobre panificado de fécula de mandioca: propiedades físicas, texturales y sensoriales

Effect of frozen storage on bread of cassava starch: Physical textural and sensory properties

Laura B. Milde^{1,*}, Fernando A. Cabral¹, Romina Ramírez²

1- Módulo de Farmacia y Bioquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, Av. Mariano Moreno N° 1375, Posadas, Misiones, Argentina.

2- Becaria del programa del Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT).

* E-mail: lauramilde@hotmail.com

Resumen

Los panificados tienen una vida media relativamente corta. Se evaluó la posibilidad de utilizar almacenamiento congelado a -20 °C en panificados para celíacos formulados con fécula de mandioca, harina de maíz y aditivos naturales (grasa, huevo, harina de soja), durante 28 días. Se analizaron parámetros físicos y texturales cada 7 días, con pan elaborado en el día como control. Se observó diferencia significativa del volumen específico de los congelados con respecto al fresco, no así a diferentes tiempos de congelación; no hubo diferencias para el porcentaje de pérdida de peso. En el color hubieron diferencias con el proceso como con el tiempo de almacenamiento para la corteza y para los parámetros L* y b* de la miga. Excepto la elasticidad, los demás parámetros texturales se vieron afectados por el almacenamiento congelado. La aceptación fue elevada incluso hasta el día 28. En general, el tratamiento influyó sobre la masa libre de gluten analizada, no así el tiempo de almacenamiento congelado.

Palabras clave: Pan libre de gluten; Almacenamiento congelado; Fécula de mandioca; Propiedades de panificados; Celíacos.

Abstract

Bakery products have shorter shelf-life. The possibility of using frozen storage at -20 °C in bread for celiac with cassava starch, corn flour and natural additives (fat, egg, soy flour), for 28 days was evaluated. Physical and textural parameters were analyzed every seven days, with day fresh bread as control. A significant difference of specific volume of frozen bread compared to fresh and not frozen was observed, but not in relation to different freezing times; there was no difference in relation to the percentage of weight loss. In relation to color, there were differences both in color and storage time for the crust and the L* and b* parameters of the crumb. With the exception of elasticity, the other textural parameters were affected by freezing. Acceptance was high even to day 28. In general, freezing influenced gluten-free mass analyzed, but not storage time.

Keywords: Gluten-free bread; Frozen storage; Cassava starch; Bakery properties; Celiac.

Introducción

La posibilidad de elegir los alimentos a consumir y distribuirlos en las diferentes comidas del día es propia de cada individuo; pero no todos pueden hacerlo libremente, debido a que sufren reacciones adversas a determinados alimentos, como es el caso de los enfermos celíacos. La enfermedad celíaca es la intolerancia total y permanente

al gluten que produce la atrofia de las vellosidades del intestino delgado; la eliminación del gluten de la dieta, de por vida, es el único tratamiento. Estudios poblacionales realizados en Argentina en el año 2001 indicaron una prevalencia de enfermos celíacos de 1:167, lo que incrementó la demanda de productos alimenticios libres de gluten [1].

El gluten es la principal proteína en la estructura de formación de la harina, necesaria para producir pan de buena

calidad [2], lo que convierte al trigo (cereal con mayor contenido de gluten) en el elegido para la panificación. En la elaboración de masas para celíacos, se lo reemplaza con mezclas de harinas: de arroz, de soja, de maíz, de quinoa, entre otras. En la actualidad en el mercado, se encuentran disponibles panes sin gluten, en general, de una calidad inferior a los elaborados con harina de trigo, dado que exhiben desmoronamiento de la miga y son pobres en sabor [2]; [3]. El almidón de mandioca es una opción adecuada para la preparación de panes sin gluten [4].

La eliminación del gluten en productos de panadería refleja una disminución en la calidad del pan, es por eso que se debe compensar la falta de sus propiedades mediante el agregado de emulsionantes, aditivos, enzimas, etc. [5]; o bien, se pueden añadir proteínas de diferentes fuentes naturales como la soja, albúmina de huevo, y productos lácteos, con el fin de superar en parte, los problemas asociados a la falta de viscoelasticidad. Por ejemplo, la harina de soja utilizada en la formulación del presente trabajo es una buena contraparte para los cereales, pero hay que destacar que según Sánchez; Osella y de la Torre [6], altos niveles de harina de soja pueden conducir a una disminución en el volumen específico y de las propiedades sensoriales del pan.

Las alteraciones que se destacan durante el almacenamiento son: cambios en el sabor, aroma y pérdida de crujibilidad de la corteza por efectos tales como el enzimático y las reacciones de crecimiento microbiano o de hongos [7], lo que lleva a pérdidas económicas tanto para el fabricante como para el consumidor. Entre los métodos tradicionales que se utilizan para extender la vida útil de los productos alimenticios durante largos períodos de tiempo, el almacenamiento congelado es el único método que permite obtener un producto con características similares a las de un fresco en una amplia variedad de productos alimenticios [7]; [8]; [9]. Por esta razón, el mercado de productos de panadería provenientes de masas congeladas está creciendo rápidamente y ha sido estudiado y aplicado en varios países; pero se debe tener en cuenta que la masa de los mismos está influenciada por diferentes factores, como ser: la formulación (tipo de levadura, tipo de harina, otros aditivos) [8]; así como los parámetros de procesamiento (el mezclado de la masa, el tiempo de levado) [10], la velocidad de congelación, la temperatura de almacenamiento, el tiempo de almacenamiento [11], y el método de descongelación [12]. El mayor desafío para la producción de panes provenientes de masas congeladas es mantener la viabilidad celular, y la potencia de la producción de dióxido de carbono de la levadura congelada, debido a que es uno de los ingredientes más importantes en la producción de masa congelada [3].

Para evaluar las características del producto final se pueden realizar pruebas cuantitativas, como volumen específico, absorción de agua o porcentaje de pérdida de peso; distintos parámetros de textura de los panes, como

firmeza y elasticidad de la miga [13], y pruebas cualitativas o sensoriales [14]. La percepción de los consumidores de la calidad sensorial de un producto es determinante en la elección de cualquier alimento.

Se encontró escasa información acerca del efecto de la congelación o del tiempo de almacenamiento a temperaturas bajo cero de panes libres de gluten.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar si una masa de panificado elaborada con fécula de mandioca y harina de maíz, utilizando levadura fresca con textura de pasta comprimida, es capaz de resistir un determinado período de almacenamiento congelado sin perder sus propiedades físicas, mecánicas y sensoriales.

Materiales y métodos

Las materias primas utilizadas fueron: fécula de mandioca (Santa Ana, Misiones, Argentina) y harina de maíz (Indelma, Santa Fe) en una proporción (80:20), 1,4% de sal (Celusal, Tucumán), 5% de azúcar (Ledesma, Jujuy), 5% de levadura fresca comprimida (Calsa, Buenos Aires); como aditivos, se incorporaron: 6% de grasa vegetal (Danica, Buenos Aires), huevo (1 unidad) y 10% de harina de soja (Instituto, Misiones). Se agregó una cantidad de agua suficiente para obtener una masa homogénea (58%). El porcentaje de los ingredientes es expresado como g/100g de la mezcla fécula de mandioca-harina de maíz.

La preparación de las masas y manufactura se realizó mediante un procedimiento ya optimizado por Milde, Ramallo y Puppo [4]. Se distribuyeron las masas en cuatro moldes rectangulares, de acero inoxidable (22x9x6 cm), colocando 350g en cada uno; uno de los moldes correspondería al día 7 de almacenamiento, otro al día 14, otro al día 21 y el último al día 28 (se repitió el mismo procedimiento durante 6 meses). Se procedió al levado de las masas durante 20 minutos sobre horno caliente a 35 °C; se pesó y posteriormente se congeló en freezer (Gafa, modelo 500, Argentina) a -20 °C, envueltos en papel film y codificados. En ese periodo, el freezer fue utilizado exclusivamente para este estudio. Si bien no se registró su temperatura a lo largo de todo el almacenamiento, se controló dicho valor mediante un termómetro cada vez que se colocaban masas a congelar.

Finalizado el tiempo de almacenamiento congelado correspondiente, se realizó el descongelamiento lento de las masas colocándolas 10 horas en heladera (Patrick 360, Argentina) a 4 °C y 6 horas sobre mesada a temperatura ambiente. Se efectuó la cocción (Cocina Whirlpool, ACH505-2, Brasil) a 240 °C durante 30 minutos.

Se procedió a la elaboración y cocción de una masa que se utilizó como pan control (fresco).

Los análisis de los productos finales se llevaron a cabo a la hora de la cocción; para la evaluación de los parámetros físicos y mecánicos se trabajó con seis repeticiones.

Análisis de parámetros físicos

Volumen específico: representa la relación entre el volumen y el peso del pan una vez enfriado. El volumen de los panes se midió por el método de desplazamiento de semillas de sésamo [15]; se utilizó un recipiente rectangular de (24x10x8) cm, una probeta graduada y una balanza digital (ATMA, BC7200, China).

Porcentaje de pérdida de peso (%PP): se determinó mediante la siguiente fórmula [16]:

$\%PP = [(Peso \text{ antes de hornear} - Peso \text{ después de hornear}) / Peso \text{ antes de hornear}] \times 100$.

Determinación de color: el color se evaluó en forma instrumental con el colorímetro Hunter Lab modelo D25A-9000, calibrado con patrones estándar ($Y = 93.69$, $x = 0.89$, $y = 0.32$). Se determinaron los parámetros: L (luminosidad), a^* (parámetro de cromaticidad rojo-verde) y b^* (parámetro de cromaticidad amarillo-azul) en la escala de Cielab.

A los efectos de lograr un dato representativo de cada parámetro, se realizaron 3 lecturas en distintos sectores tanto de la corteza como de la miga.

Análisis de parámetros mecánicos

Determinación de textura: se utilizó el analizador de textura (modelo TA.TX2i.plus, Stable Micro System, Inglaterra), provisto de una plataforma de aluminio (sobre la cual se colocó la muestra), y un plato de compresión de 75mm. La velocidad del test fue de 5mm/s, mientras que la velocidad pre-test fue de 1mm/s. Las muestras a evaluar se cortaron en medidas iguales de 6x6 cm, y se sometieron a ensayos de doble compresión (TPA), llevando la masa hasta un 50% de la altura del producto inicial. Los parámetros de textura: firmeza (N), elasticidad (%), cohesividad (%), gomosidad (N) y masticabilidad (N), se calcularon a partir de un gráfico de fuerza por distancia obtenido del software del analizador de textura.

Análisis sensorial

La evaluación sensorial se llevó a cabo a la hora de cocción de los panes que fueron elaborados para este procedimiento; se recurrió a pruebas afectivas-descriptivas y los atributos evaluados fueron: *apariencia* en 2 niveles: “compacto” y “esponjoso”, *dureza* en 3 niveles: “muy duro”, “firme” y “blando”, *masticabilidad* en otras 3 categorías: “alta”, “regular” y “baja” y *sabor* mediante escala hedónica de 5 puntos: “me gusta mucho”, “me gusta”, “no me gusta ni me desagrada”, “me desagrada”, “me desagrada mucho” [2]; [17]; [18]. Se realizó con 15 jueces con más de 7 años de experiencia en la catación de panes elaborados con fécula de mandioca, en un laboratorio del Módulo de Bioquímica y Farmacia de la FCEQyN. Para cada catador se colocó, un recipiente para enjuague bucal

después de cada cata y se le entregó una planilla donde debían dar su informe sobre los parámetros de cada pan, con un apartado final para opinar sobre el producto.

Análisis estadístico

Las respuestas del tratamiento se evaluaron en los productos panificados cocidos a través de la medición de *parámetros físicos* (volumen específico, porcentaje de pérdida de peso y color) y *parámetros de textura* (firmeza, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad), mediante un análisis de varianza (ANOVA) por medio del software “Statgraphics plus 5.1” para establecer si existían diferencias significativas entre las muestras evaluadas, con un nivel de confianza del 95%. Los resultados del análisis sensorial se procesaron en una planilla de cálculo de Excel a fin de obtener el grado de aceptación de los productos. Los atributos se agruparon en dos categorías, aceptable y no aceptable. Como aceptable, para el atributo *apariencia* se consideró la característica “esponjoso”, para *dureza* “blando” y “firme”, para *masticabilidad* “baja” y “regular”; para el *sabor* se agruparon las escalas “me gusta mucho”, “me gusta”, “no me gusta ni me desagrada”, como positivas para la aceptación del producto.

Resultados y discusión

Parámetros Físicos

Se determinaron valores medios y desvíos estándares del volumen específico (V_e) de panes frescos y panes provenientes de las masas congeladas, almacenadas a diferentes tiempos, que se representan en la Figura 1.

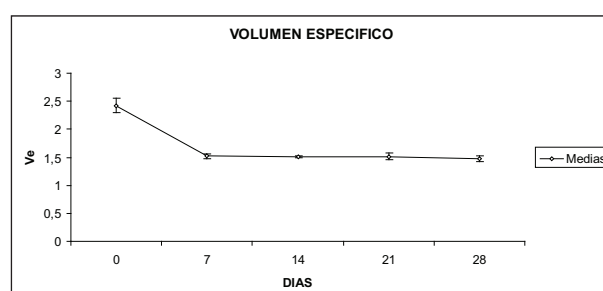


Figura 1: Valores medios y desvíos estándares del volumen específico de panes frescos y de panes de masas almacenadas congeladas durante 7, 14, 21 y 28 días.

Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) del volumen específico de las masas congeladas con respecto al fresco, no existiendo tal diferencia entre las masas congeladas almacenadas diferentes tiempos.

El volumen de la masa disminuyó comparando el fresco con los congelados, pero se mantuvo constante entre ellos, por lo tanto se evidencia que el proceso de congelación influye en el volumen específico, no así el tiempo de alma-

cenamiento congelado; similares resultados se observaron en trabajos realizados a partir de masas de panes elaboradas con harina de trigo; Carr y Tadini [8], almacenaron en congelación 28 días y obtuvieron una disminución del volumen específico de los panes en el orden del 30%; mientras que Phimolsiripol y col. [19], obtuvieron un decrecimiento del 9% almacenando las masas hasta 112 días a diferentes rangos de temperatura. Mezaize y col. [20], almacenando durante 7 días masas libres de gluten obtuvieron un decrecimiento en el orden del 20% en el volumen específico de los panes.

La disminución del volumen específico indica un probable daño en los componentes de la masa, producido por la congelación. Es evidente que el proceso de congelación produjo cambios en la microestructura de la miga debido al crecimiento de los cristales de hielo, causando tanto pérdidas en la actividad de la levadura como la disminución de la capacidad de la red proteica de la masa para retener dióxido de carbono [7]; [9].

Se determinaron valores medios y desvíos estándares del porcentaje de pérdida de peso (% PP) de panes frescos y panes provenientes de las masas congeladas a diferentes tiempos, que se representan en la Figura 2.

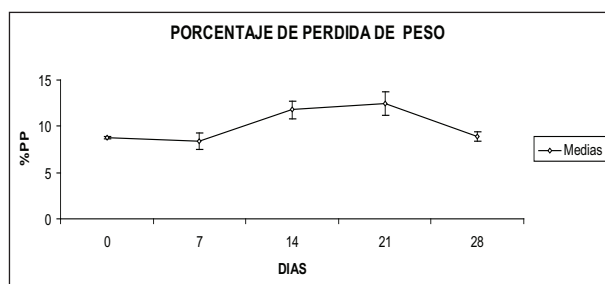


Figura 2: Valores medios y desvíos estándares del porcentaje de pérdida de peso de panes frescos y de panes de masas congeladas durante 7, 14, 21 y 28 días.

No se obtuvo una diferencia significativa entre fresco y congelados ($p > 0,05$); sin embargo, los panes mostraron un comportamiento variable: no existió diferencia estadística para pan de masa almacenada durante 7 días con respecto a un fresco, pero sí en cambio se observó un incremento significativo luego de 14 y 21 días de almacenamiento, que retornó a valores iniciales a los 28 días. En cambio, otros autores [19], obtuvieron resultados diferentes ya que sus panes elaborados con harina de trigo sufrieron aumento en el porcentaje de pérdida de peso con el proceso de congelación y con el tiempo de almacenamiento.

La pérdida de peso de la masa, está íntimamente relacionada con los cambios que ocurren en la distribución del agua en la compleja matriz de la masa, lo cual podría resultar en cambios en el microambiente de la levadura, que llevarían a un daño celular reversible o irreversible [21]. Simmons; Smith y Vodovotz [17], indicaron que las proteínas de la soja podrían proveer cierta protección a las células de la levadura a temperaturas de congelación;

así, la cantidad de agua libre sería menor, disminuyendo la evaporación, con lo cual tendríamos una menor pérdida de agua y por consiguiente menor pérdida de peso de la hogaza. En el presente estudio, a pesar de la tendencia a la pérdida de peso, la utilización de harina de soja probablemente favoreció a la formación de mayor cantidad de agua ligada a través del tiempo de almacenamiento, lo que contribuyó a que retorne a valores semejantes al fresco y al de masa almacenada 7 días.

Una de las variables que incide de forma considerable a la hora de elegir un producto, es el color; los resultados del análisis, realizados tanto en miga como en corteza de panes frescos y de aquellos provenientes de masas congeladas, se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Valores medios y desvíos estándar de parámetros de color de panes frescos y resultantes de masas almacenadas congeladas. Tiempos: 0, 7, 14, 21 y 28 días.

L*: luminosidad, a*: rojo-verde, b*: amarillo-azul

Diferentes letras en la misma columna de cada parte del pan indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

	Días	L*	a*	b*
CORTEZA	0	65,42 ± 1,58 ^a	2,81 ± 0,73 ^a	28,8 ± 1,12 ^a
	7	69,27 ± 0,60 ^b	-4,63 ± 0,85 ^b	24,74 ± 0,46 ^b
	14	71,94 ± 1,23 ^c	-3,97 ± 0,61 ^{bc}	26,39 ± 0,69 ^c
	21	71,48 ± 0,23 ^c	-2,94 ± 0,80 ^c	23,75 ± 1,09 ^b
	28	77,45 ± 0,10 ^d	-3,63 ± 0,60 ^{bc}	22,17 ± 0,66 ^d
MIGA	0	66,16 ± 0,34 ^a	-3,85 ± 0,56 ^a	33,8 ± 0,29 ^a
	7	70,69 ± 0,63 ^b	-5,02 ± 1,08 ^a	27,42 ± 0,47 ^b
	14	72,47 ± 0,45 ^c	-5,54 ± 1,16 ^a	24,48 ± 0,79 ^c
	21	68,91 ± 0,11 ^d	-4,38 ± 0,50 ^a	24,51 ± 1,72 ^c
	28	69,12 ± 0,55 ^d	-5,01 ± 0,92 ^a	29,60 ± 0,73 ^d

Los parámetros L* y b* presentaron diferencias estadísticamente significativa entre el fresco y los congelados, como también entre los congelados entre sí, tanto para la corteza como para la miga ($p < 0,05$). El parámetro a* mostró diferencias entre la corteza del fresco y los congelados ($p < 0,05$), no así entre los congelados ($p > 0,05$). En la miga no se observó diferencia significativa ($p > 0,05$) entre todas las muestras.

Como se presenta en la Tabla 1 se observó un aumento de los valores de L* con la congelación y con los días de almacenamiento; ambos factores influyeron también sobre b* cuyos valores a diferencia de L* disminuyeron en comparación al fresco. Mientras que los valores de a* para corteza y miga a pesar de haber disminuido en panes congelados, no mostraron diferencias significativas en el análisis estadístico. Estos resultados indicarían una influencia de la congelación sobre a* pero no del tiempo de almacenamiento en estado congelado.

Es decir que el almacenamiento provocó un aumento de la luminosidad del pan, así como una reducción en el enrojecimiento y la tonalidad amarilla del mismo.

Otros investigadores obtuvieron resultados similares trabajando con panes de trigo [22], y trigo enriquecido con diferentes ingredientes [23]. Majzoobi y col [22],

atribuyeron estos resultados a la formación de cristales de hielo en la superficie del pan, los cuales provocan la destrucción de algunos pigmentos responsables del color en el producto final.

Parámetros Mecánicos

En la Tabla 2 se observan los resultados de las mediciones de los parámetros texturales en panes de masas elaboradas y congeladas a diferentes tiempos, y del pan fresco.

Tabla 2: Parámetros texturales de panes elaborados a partir de masas almacenadas congeladas: firmeza (f), elasticidad (e), cohesividad (c), gomosis (g) y masticabilidad (m); tiempos: fresco, 7, 14, 21 y 28 días. * Valores medios y desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencia significativa entre los datos ($p < 0,05$).

Días	Parámetros Texturales				
	f (N)*	e%*	c %*	g (N)*	m (N)*
0	86.63 ± 9.7 ^a	92.4 ± 1.27 ^a	54.6 ± 1.70 ^a	47.1 ± 3.13 ^a	43.61 ± 3.4 ^a
7	241.9 ± 24.7 ^b	90.9 ± 0.07 ^a	65.5 ± 0.57 ^b	158.34 ± 14.8 ^b	143.82 ± 13.4 ^b
14	244.9 ± 1.40 ^b	90.8 ± 0.92 ^a	58.3 ± 3.04 ^b	142.66 ± 6.51 ^b	129.40 ± 4.5 ^b
21	237.5 ± 21.8 ^b	90.7 ± 0.001 ^a	62.6 ± 2.83 ^b	148.50 ± 6.95 ^b	134.70 ± 6.2 ^b
28	252.8 ± 56.1 ^b	89.6 ± 4.31 ^a	50.2 ± 1.77 ^c	127.34 ± 32.5 ^b	114.74 ± 34.6 ^b

La firmeza se vio afectada por el proceso de congelación; se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el pan fresco y los congelados, no así entre los congelados. La firmeza de la miga es causada por cambios en la estructura del almidón; una explicación para el aumento de la firmeza sería el crecimiento de los cristales de hielo durante el almacenamiento de la masa que daña la estructura [8]. Simmons; Smith y Vodovotz [17] que estudiaron pan con harina y leche de soja, llegaron a la conclusión de que la soja minimiza los cambios durante el congelado y conduce a cambios mínimos en la dureza al compararlo con pan elaborado con harina de trigo; sin embargo, Carr y Tadini [8] trabajando con panes de harina de trigo obtuvieron aumento en la firmeza recién a partir del día 21 de almacenamiento congelado. Gallagher y col [2], encontraron que la ausencia de gluten incrementa el movimiento del agua desde la miga hacia la corteza resultando una miga más firme en panes libres de gluten, aún sin el proceso de congelación. La elasticidad no fue significativamente influenciada por la temperatura y tiempos de almacenamiento congelado ($p > 0,05$), probablemente debido a la formulación, donde las proteínas de la soja interactúan fuertemente con el agua al igual que el almidón, originando panificados más elásticos y posiblemente menos propensos a daños por congelación. Simmons; Smith y Vodovotz [17] compararon su formulación con panes de harina de trigo y llegaron a la conclusión que los frescos tenían elasticidad similar, mientras que hubo disminución significativa cuando se congelaron.

La cohesividad se vio afectada significativamente ($p < 0,05$) por la congelación y por el tiempo de almace-

namiento llegando incluso a valores menores que el fresco, a los 28 días. Un comportamiento similar pudo ser observado por Carr y col [8].

En los parámetros gomosis y masticabilidad hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el fresco y los congelados, no así entre los congelados, por lo tanto no se ven afectados por el tiempo de almacenamiento. Leray y col [24], estudiaron masas libres de gluten con el agregado de diferentes emulsionantes y no obtuvieron diferencias entre fresco y congelados en gomosis y cohesividad, que recién aumentaron al día 28 de almacenamiento. Los panes elaborados con harina y leche de soja [17] no sufrieron cambios en la cohesividad y masticabilidad durante el tiempo de almacenamiento congelado.

De la comparación realizada con diferentes formulaciones se deduce la importancia de la formulación en las respuestas de cada parámetro de textura.

Análisis sensorial

Los resultados obtenidos de las pruebas afectivas- descriptivas utilizadas, se presentan en la Tabla 3, discriminando los cuatro atributos evaluados: *apariencia, dureza, masticabilidad y sabor*.

Tabla 3: Resultados del análisis sensorial de panes provenientes de masas almacenadas congeladas a diferentes tiempos: fresco, 7, 14, 21 y 28 días.

Parámetros fresco		Tiempo de almacenamiento				
		7 días	14 días	21 días	28 días	
Apariencia	compacto	0	8	6	7	4
	esponjoso	15	7	9	8	11
Dureza	duro	0	4	7	4	2
	firme	6	8	4	10	8
	blando	9	3	4	1	5
Masticabilidad	alta	5	1	0	1	2
	regular	8	6	6	10	9
	baja	2	8	9	4	4
Sabor	me gusta mucho	3	0	0	0	0
	me gusta	8	7	4	6	8
	no me gusta ni me desagrada	4	5	10	9	7
	me desagrada	0	3	1	0	0
	me desagrada mucho	0	0	0	0	0

Con respecto a los frescos se obtuvo 100% de aceptación en la *apariencia, dureza y sabor* y 80% para la *masticabilidad*. En cuanto a los congelados, se observó una variación de los porcentajes en los días 7, 14 y 21 para los distintos atributos exceptuando *masticabilidad*. Se consideró como representativo el día 28, máximo tiempo de almacenamiento analizado en este trabajo, donde se obtuvo un alto porcentaje de aceptación, ya que en *apariencia y*

masticabilidad fue 73%, *dureza* 87% y *sabor* 100%. El *sabor*, parámetro que en interacción con el aroma compone el flavor, es el que más influencia tiene a la hora de elegir el producto, según Annett y col [25].

Cabe destacar que la firmeza se relaciona directamente con la dureza del pan, mientras que la elasticidad se asocia con la masticabilidad; lo que indica la importancia de los resultados que se obtienen en la evaluación sensorial ya que los consumidores son los que determinan la aceptación o no del producto. En la Figura 3 se observa la correlación obtenida entre la firmeza (instrumental) y *dureza* (sensorial) ponderando un único valor de dureza en una escala del 1 al 10, para cada tiempo, dándole un valor numérico arbitrario a cada nivel (duro = 10; firme = 6; blando = 3).

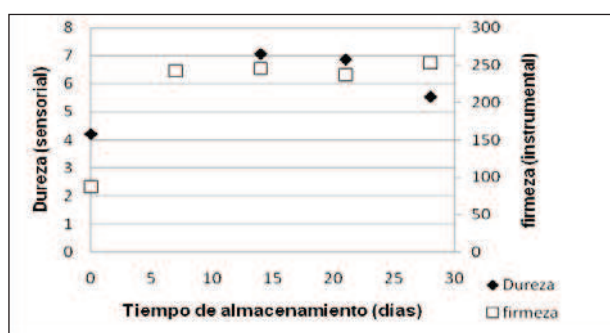


Figura 3: Correlación entre dureza (sensorial) y firmeza (instrumental) de panes frescos y provenientes de masas almacenadas congeladas durante 7, 14, 21 y 28 días.

Los resultados obtenidos para panes frescos son similares a otros panes libres de gluten cuya formulación incluyen harinas de arroz y aditivos sintéticos [2]; [26]. En el caso de los congelados, para los atributos de *apariencia*, *dureza* y *sabor*, la variación en los porcentajes de aceptación puede deberse a distintos factores, por una parte el tipo de harina y su interacción con los demás ingredientes y por otro lado el tipo de fermentación y de levadura utilizada [27]. Por último también el proceso de producción ejerce una influencia importante, según Gale y col [28]. Hay que destacar la *masticabilidad* de los panes ya que se mantiene prácticamente sin variaciones, a diferencia de otros con formulaciones a base de trigo [29].

Conclusión

Al evaluar los resultados obtenidos de los productos finales provenientes de masas congeladas libres de gluten, elaboradas con *fécula de mandioca* y *harina de maíz*, utilizando *levadura fresca* con *textura de pasta comprimida*, se comprobó que la mayoría de los parámetros físicos y mecánicos que definen la calidad del pan solo se vieron influenciados por el proceso de congelación, no así por el tiempo de almacenamiento congelado, con una elevada aceptación incluso luego de 28 días de almacenamiento.

Estos resultados permiten concluir que las masas

analizadas son capaces de resistir un determinado período de almacenamiento congelado sin que se produzca un decrecimiento importante en la calidad del pan.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración técnica de Nuñez, Andrés Julio y Kachuk, Leonardo Lipe encargados del manejo del texturómetro del Laboratorio Central, a la Mgter. Hase, Sandra, a cargo del texturómetro y al Dr. Schmalko, Miguel Eduardo, a cargo del Laboratorio de Yerba Mate, donde se realizó el análisis de color, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN) de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM).

Referencias

- Gómez, J.; Selvaggio, G.; Viola, M.; Pizarro, B.; La Motta, G.; de Barrios, S.; Catelleto, M.; Echeverría, R.; Sugai, E.; Vázquez, H.; Maurino, E.; Bay, J. *Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of adult population in the La Plata area*. Journal American Gastroenterology, 96(9), p. 2700-2704, 2001.
- Gallagher, E.; Gormley, T.R.; Arendt, E.K., *Crust and crumb characteristics of gluten free breads*, Journal of Food Engineering, 56(2), p. 153-161, 2003.
- Gutkoski, L. C.; Brehm, C. M.; Dos santos, E.; Mezzomo, N. *Efeito de ingredientes na qualidade da massa de pão de forma congelada não fermentada durante o armazenamento*, Ciência e Tecnologia de los Alimentos, 25(3), p. 460-467, 2005.
- Milde L.; Ramallo L.; Puppo M. *Gluten Free Bread based on Tapioca Flour: Texture and Sensorial Properties*, Food and Bioprocess Technology. 5(3), p. 888- 896, 2012.
- Marco, C.; Rosell, C. M. *Breadmaking performance of protein enriched gluten free breads*, Cereal Group, Institute of Agrochemistry and Food Technology, 227(4), p. 1-28, 2009.
- Sánchez, H.D.; Osella, C.A.; de la Torre M.A. *Use of Response Surface Methodology to optimize gluten-free bread fortified with soy flour and dry milk*, Science Technology Int.10 (1), p. 5-9, 2004.
- Ribotta, P.D.; Tadini, C.C.; Gularte, M.A.; Collar, C. *Alternativas tecnológicas para la elaboración y la conservación de productos panificados*, Editorial Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2009.
- Carr, L.G.; Tadini, C.C. *Influence of yeast and vegetable shortening on physical and textural parameters of frozen part baked French bread*, Food Science and Technology, 36(6), p. 609-614, 2003.
- Bárcenas, M. E.; Rosell, C. M. *Effect of frozen storage time on the bread crumb and aging of par-baked bread*, Food Chemistry, 95(3), p. 438-445, 2006.

10. Rouillé, J.; Le Bail, A.; Courcoux, P. *Influence of formulation and mixing conditions on breadmaking qualities of French frozen dough*, Journal of food engineering, 43(4), p. 197-203, 2000.
11. Havet, M.; Mankai, M.; Le Bail, A. *Influence of the freezing condition on the baking performances of French frozen dough*, Journal of Food Engineering, 45(3), p. 139-145, 2000.
12. Phimolsiripol, Y. *Shelf Life Determination of Frozen Bread Dough Stored under Fluctuating Temperature Conditions*, Kasetsart Journal (Natural Science), 43(1), p. 187-197, 2009.
13. Toufeili, I.; Dagher, S.; Shadarevian, S.; Noureddine, A.; Sarakbi, M.; Farran, M. *Formulation of gluten-free Pocket-type Flat Breads: Optimization of Methylcellulose, Gum Arabic, Egg Albumen Levels by Response Surface Methodology*. Cereal Chemistry, 71(6), p. 594-601, 1994.
14. Osorio, S.H. *Estudio Tecnológico de la utilización de harina de yuca en panificación*; Ingeniero Agro Industrial; Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Administración Ingeniería Agro Industrial, sede Palmira, 2004.
15. Jiamyangyuen, S.; Srijesdaruk, V.; Harper, W. *Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread*, Songklanakarin J. Sci. Technol. 27(1), p. 55-64, 2005.
16. Da Mota Zanella, V.; Mireles Mendoza, C.; Camarena Aguilar E.; Bautista Justo, M. *Efecto del uso de Masas Congeladas sobre las Características y Textura en pan Blanco*. Revista Salud Pública y Nutrición, 13, p. 456-465, 2005.
17. Simmons, A. L.; Smith K. B.; Vodovotz Y. *Soy ingredients stabilize bread dough during frozen storage*, Journal of Cereal Science, 56(2), p. 232-238, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2012.05.007>.
18. Demirkesen, I.; Mert, B.; Sumnu, G.; Sahin, S. *Rheological properties of gluten-free bread formulations*, Journal of food Engineering, 96(2), p. 295-303, 2010.
19. Phimolsiripol, Y.; Siripatrawan, U.; Tulyathan, V.; Cleland, D. *Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality*. Journal of Food Engineering, 84(1), p. 48-56, 2008.
20. Mezaize, S.; Chevallier, S.; Le-Bail, A.; de Lamballerie, M. *Gluten-free frozen dough: influence of freezing on dough rheological properties and bread quality*. Food Research International, 43(8), p. 2186-2192, 2010.
21. Mazur, P. *Mechanisms of injury in frozen-thawed cells cooled at suboptimal and supraoptimal rates*, Cryobiology, 13, p. 645, 1976.
22. Majzoobi, M.; Farahnaky, A.; Agah, Sh. *Properties and Shelf-life of Part-and Full-baked Flat Bread (Barbari) at Ambient and Frozen Storage*, Journal of Agricultural Science and Technology, 13, p. 1077-1090, 2011.
23. Mandala, I.; Polaki, A.; Yanniotis, S. *Influence of frozen storage on bread enriched with different ingredients*, Journal of Food Engineering, 92(2), p. 137-145, 2009.
24. Leray, G.; Oliete, B.; Mezaize, S.; Chevallier, S.; Lamballerie, M. *Effects of freezing and frozen storage conditions on the rheological properties of different formulations of non-yeasted wheat and gluten-free bread dough*, Journal of Food Engineering, 100(1), p. 70-76, 2010.
25. Annet, L.E.; Muralidharan, V.; Boxall, P.C.; Cash S.B.; Wismer W.V. *Influence of health and environmental information on hedonic evaluation of organic and conventional bread*, Journal of Food Science, 73(4), p. 50-55., 2008.
26. Gallagher, E.; Kunkel, A.; Gormley, T.R.; Arendt, E.K. *The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long-term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere*, European Food Research and Technology, 218(1), p. 44-48, 2003.
27. Chang, C.Y.; Seitz L.M.; Chambers, E. *Volatile flavor components of breads made from red winter wheat and hard white winter bread*, Cereal Chemistry, 72 (3), p. 237-42, 1995.
28. Gale, C.; Potus J.; Drapon, R.; Poiffait, A.; Bar, C.; Fischer J.; Giampaoli, P. *La faveur de la mie du pain: influence de la variété de blé et du mode de panification*. Science Alimentaire, 14(5), p. 643-53, 1994.
29. Inoue, Y.; Bushuk, W. *Studies on frozen doughs, Effects of frozen storage and freezing-thaw cycles on baking and rheological properties*, Cereal Chemistry, 68(6), p. 627-631, 1991.

Recibido: 07/02/2013

Aprobado: 28/05/2013

Internet del futuro. Desafíos y perspectivas

Future internet: challenges and issues

Trabajo de Revisión

Eduardo O. Sosa^{1,*}, Diego A. Godoy²

1- Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales; Universidad Nacional de Misiones, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

2- Centro de Investigación en Tecnologías de la Información y Comunicación, Universidad Gastón Dachary, Av. López y Planes 6511, Posadas, Misiones, Argentina

* E-mail: es@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen

“Internet del Futuro” es llamada a representar dentro de las Tecnologías de Información y Comunicaciones en un futuro no muy lejano, una batería de conceptos y tecnologías que involucrarán a dispositivos, interfaces y software. Desde la Internet de las computadoras, pasando por la Web 2.0, la tendencia es la ubicuidad y fortalecimiento del nuevo paradigma de la computación “datacéntrica”.

En el presente trabajo se analiza la evolución de las tecnologías y conceptos involucrados, fundamentalmente considerando a Internet de las Cosas (IoT), los desafíos e implicancias que conllevan el acceder a ese dominio al cual denominamos Internet del Futuro.

Se concluye que los cambios de paradigmas involucrados envuelven a la sociedad toda, debiendo atenderse los desafíos éticos y tecnológicos a nivel global. Internet de las cosas debe abocarse a mitigar los riesgos en una sociedad donde la información propia debe ser transparente para aquellos actores seleccionados y totalmente invisibles para los demás.

Palabras clave: Internet del futuro; Internet de las cosas; Redes inalámbricas; Ubicuidad; WSN; RFID.

Abstract

In the near future, within the framework of the Information and Communications Technology (ICT), the internet is intended to represent a set of concepts and technologies that will involve devices, interfaces and software. From the internet of computers, through Web 2.0, the trend is ubiquity and the strengthening of the new computing paradigm aimed at “datacentric” networks. This paper analyzes the evolution of the technologies and concepts so far involved in the development of Internet of Things (IoT); also, it analyses the challenges and implications that are in the way to deepen in the domain known as “Future Internet”. A conclusion is settled that the change of paradigms involves the whole society, and they must be addressed as ethical and technological challenges worldwide. Internet of things must tackle mitigate risks in a society where its own information should be transparent to those players selected and completely invisible to others..

Keywords: Future internet; Internet of things; Wireless networks; Ubiquity; WSN; RFID.

Introducción

Nadie podía prever hace pocos años el rol que jugaría Internet en nuestros días, convirtiéndose en una de las piedras angulares de nuestra sociedad, siendo elemento fundamental de soporte en las interacciones sociales y económicas a escala global. Todo comenzó como “Internet de las computadoras”, una red global de servicios -tales como la WWW- construida en las capas superiores de TCP/IP. La “Suite de Protocolos TCP/IP”, comúnmente conocida como TCP/IP por sus dos principales protocolos (Transport Control Protocol e Internet Protocol), es utilizada para

comunicarse a través de cualquier conjunto de redes interconectadas (1). Esta suite puede incluir otros protocolos, aplicaciones e incluso los medios de red, siendo ejemplo de ello UDP (User Datagram Protocol), ARP (Address Resolution Protocol) e ICMP (Internet Control Message Protocol), y aplicaciones como TELNET (Telecommunication Network), FTP (File Transfer Protocol) y RPC (Remote Procedure Call). Han pasado los años y el nuevo paradigma es la “Internet de las personas”, con ejemplos concretos como la web social ó Web 2.0 (2), donde el contenido es creado y utilizado por los mismos usuarios.

El término “Web 2.0” se ha convertido en soporte

natural y fundamental con referencia a los patrones de diseño y modelos de negocio referentes a tecnología de Internet y su utilización. El concepto es referenciado a Internet basada en servicios, donde los clientes colaboran y comparten información en línea, aportando así una nueva forma de interacción social. Wikipedia es uno de los mejores ejemplos de sitios web que han nacido, quién sabe si al amparo de este concepto, o como motor de él, dado que su contenido es producido, editado, organizado y traducido por los propios usuarios (3).

Una serie de conceptos y tecnologías (infraestructuras, dispositivos, software, etc.) se enlazan indefectiblemente con “Internet del Futuro” y conforman la tendencia de las Tecnologías de Información y Comunicación en los años venideros. El tema primordial a considerar es Internet de alta velocidad con acceso ubicuo. Con ello se habilitarán nuevas formas de interacción con el mundo digital. A modo de ejemplo, vale nombrar que a inicios de Octubre de 2012 los usuarios de Facebook alcanzaban los 1.000 millones de suscriptores, de los cuales 20 millones son de Argentina. Facebook es el sitio con mayor audiencia de los usuarios argentinos (4), conformando solamente el 1,7% del tráfico global a los contenidos del sitio mencionado.

En el futuro, el rol de Internet será más evidente a medida que más actividades basadas en la red lleguen, para quedarse, a nuestra vida diaria. Hoy Internet es indispensable. Los usuarios jóvenes la utilizan como bandera generacional y buscan continuamente instrumentarla de acuerdo a sus preferencias. Internet como la conocemos, un modelo de capas, permite a los usuarios innovar dentro de cada una de las capas sin intervención central, aplicando toda la inteligencia de la red en los extremos de cada enlace, y no en la red misma. Internet ha sido creada como una plataforma para innovaciones. Probablemente, Internet en el futuro poco se parecerá a la que conocemos hoy.

Si bien parece ser un término de la jerga técnica, la computación ubicua es un modelo posterior de la interacción persona-computadora de escritorio, y es un término ya utilizado por Mark Weiser en la década de 1990 (5). Esta permite acceder a nuevos contenidos; fundamentalmente aquellos generados en escenarios conformados por innovadores modelos de negocio adaptados a este nuevo paradigma.

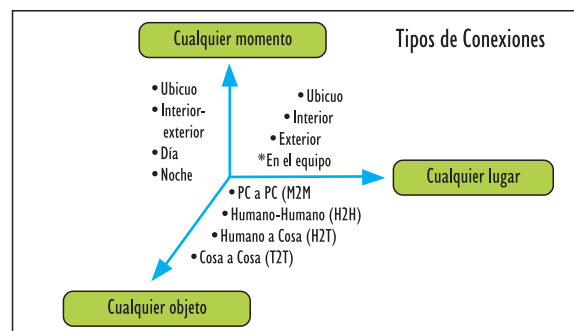
La investigación sobre “Internet del Futuro”, de una manera creciente y casi exclusiva, se centra en proyectos y actividades de lo que se vino en denominar “Internet de las Cosas” (Internet of Things - IoT -) ó Internet del Mundo Real. El desarrollo y avance en estos campos se fundamenta en el incesante crecimiento del número de equipos electrónicos -notebooks, netbooks, teléfonos inteligentes, nodos sensores- que día tras día interactúan con el mundo real en los más diversos escenarios y situaciones, tales como tráfico vehicular, sitios de ocurrencia de catástrofes o cataclismos, hospitales, medio ambiente, conflictos bélicos, etc.

Las condiciones encontradas en estos entornos se ha vuelto cada vez más difícil de modelar, por lo que todo intento de simular dichos entornos con las herramientas normalmente utilizadas, concluyen casi siempre en resultados que indican una relación muy pobre y limitada del comportamiento de los algoritmos y protocolos en escenarios de la vida real. Para ello se propone en algunos entornos reemplazar las simulaciones con investigación experimental (6). De aquí que laboratorios y redes existentes representan escenarios reales, a partir de los cuales se obtienen resultados valederos de éstas investigaciones.

Internet de las Cosas

Después de la WWW (años 1990) e Internet móvil (años 2000), se presenta ahora la tercera y potencialmente más fragmentada fase de la revolución en Internet, la IoT (Internet of Things). IoT une los objetos del mundo real con el mundo virtual, para así facilitar la conectividad en cualquier momento y en cualquier lugar para cualquier cosa, no sólo considerando a las personas. Se refiere a un mundo donde los objetos físicos y los seres, los datos y los entornos virtuales; estarían todos ellos interrelacionados entre sí temporal y espacialmente.

La experimentación en la vida real ha evolucionado tan rápidamente que hoy se interactúa con el mundo físico llevando a “Internet” al escenario elegido. Esto se realiza generalmente instalando transceptores en distintos elementos de la vida cotidiana, permitiendo un nuevo modelo de comunicación, ya no solamente entre personas y cosas, sino también entre las cosas entre sí (Figura 1).



Source: ITU

Figura 1: Dimensiones de la comunicación en las TIC's (7).

De esta manera se adiciona una nueva dimensión al mundo de las comunicaciones en las TIC's, donde al conocido modelo de Internet: “en cualquier lugar, en cualquier momento y entre todos” se ha adicionado la conectividad “entre cualquier cosa”. Con ello las conexiones se multiplican exponencialmente y crean una red con una dinámica completamente nueva, lo que se ha dado en llamar Internet de las Cosas. IoT no es ni ciencia ficción ni un boom industrial, sino que se basa en sólidos avances tecnológicos y en nuevos conceptos en cuanto a ubicuidad de las redes.

La utilización del término idiomático IoT ha crecido

considerablemente, siendo punto de convergencia en conferencias, libros, revistas y programas de investigación. Debe notarse, que su utilización aún no es comparable a la importancia que revisten términos como Web 2.0; cuando se realiza una evaluación referente a búsquedas y/o accesos a sitios específicos. Si se considera la distribución geográfica global de la importancia del término, pareciera que IoT está centrada fundamentalmente en Europa.

La idea subyacente en el concepto de IoT es que virtualmente cada “cosa” existente en el mundo físico también puede convertirse en un elemento que está conectado a Internet (8). Las “cosas” no necesariamente se convierten en computadoras, pero se pueden caracterizar como pequeños dispositivos capaces de diferentes tareas, a las que se les denominan “cosas” inteligentes. Obviamente ésta caracterización debe soportar serios cuestionamientos respecto a la necesidad que las cosas realmente deberían comportarse como computadoras para poder ser inteligentes.

Los productos inteligentes no son sinónimo de conceptos tales como computación ubicua ó inteligencia ambiental (9). Estos conceptos tienden a centrarse en describir la forma cómo los humanos interactúan con su entorno. Los elementos inteligentes no son siempre invisibles e imperceptibles (10), en realidad son actuadores no reactivos capaces de adaptarse a los cambios en su medio ambiente de manera autónoma.

Características de IoT

Internet de las Cosas no es algo nuevo (11), (12), (13). Cuando pretendemos identificar adecuadamente a IoT indefectiblemente se presenta la cuestión existencial: ¿Cuáles son las diferencias o similitudes que nos permiten diferenciar a IoT con internet tal como la conocemos?

Internet de las cosas se ha desarrollado a contracorriente de la forma usual de desarrollo de las tecnologías, donde se propone una idea y luego se genera la tecnología necesaria. IoT ha cobrado relevancia de la mano de los avances en el desarrollo y sociabilización de nuevo hardware durante la década del 2000, avanzando en la miniaturización de los dispositivos, el aumento en la capacidad de procesamiento y de transmisión, y de la mano de nuevas técnicas de ahorro energético. Ello ha conllevado asimismo que los costos de producción decrezcan continuamente a lo largo del tiempo, fundamentalmente por cuestiones de escala, hasta convertirse en asequibles por cualquier persona (14). Se diferencian claramente a las tecnologías que contribuyen al desarrollo de IoT, así como a aquellas que potencialmente le adicionarían valor al dominio, las que se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Tecnologías e Internet de las Cosas

Tecnologías que Contribuyen directamente al desarrollo de Internet de las Cosas	Tecnologías que pueden llegar a adicionar valor a Internet de las Cosas
Interfaces máquina-máquina (M2M) y protocolos de comunicación electrónica Microcontroladores Comunicación inalámbrica Tecnología RFID Tecnología de almacenamiento de energía Sensores Actuadores Software Tecnología de localización	Etiquetado Geográfico Biometría Máquinas de Visión Robótica Realidad aumentada Escenarios paralelos Telepresencia Interfaces tangibles Tecnologías limpias

Definitivamente IoT nace como consecuencia de la existencia de tecnologías disponibles en el medio, tales como la identificación por radiofrecuencia (RFID) y de las redes inalámbricas de sensores (WSN). La utilización de ambas tecnologías a lo largo del tiempo no ha sido coincidente en cuanto al dominio de aplicación de cada una de ellas.

Las WSN han sido preferidas en estudios e interacción con el ambiente y situaciones de emergencias y desastres. RFID ha sido concebida como una herramienta ligada a las cadenas de abastecimiento de diferentes productos. Las primeras hacen uso de capacidades limitadas de procesamiento, almacenamiento, transmisión y agregación de datos; tareas que son realizadas solamente en parte por RFID. Estas diferencias han conllevado consecuentemente a líneas de investigación diferentes, por más que ambas utilizan a las TIC's para interactuar con el mundo físico.

El establecimiento de una red de sensores se determina principalmente por la aplicación necesaria de la red. Normalmente las tareas comunes a la mayoría de las redes de éste tipo se encuadran en la determinación del valor de algún parámetro en un lugar geográfico determinado, detección de la ocurrencia de eventos de interés, Clasificación un objeto detectado y Monitoreo de un objeto (14).

Las etiquetas RFID son unos dispositivos pequeños, similares a una calcomanía, que pueden ser adheridas o incorporadas a un producto, un animal o una persona; existiendo una gran variedad de dispositivos con diferentes capacidades de cómputo y comunicación; llegando a utilizarse, como ejemplo, en hospitales mediante las cuales se indica diagnóstico y tratamiento indicado a cada uno de los pacientes (15).

Se ha verificado en diferentes trabajos que ambas tecnologías convergen en prestaciones y capacidades (14), por lo que se estima que en un futuro no muy lejano llegarán a fundirse (Figura 2).

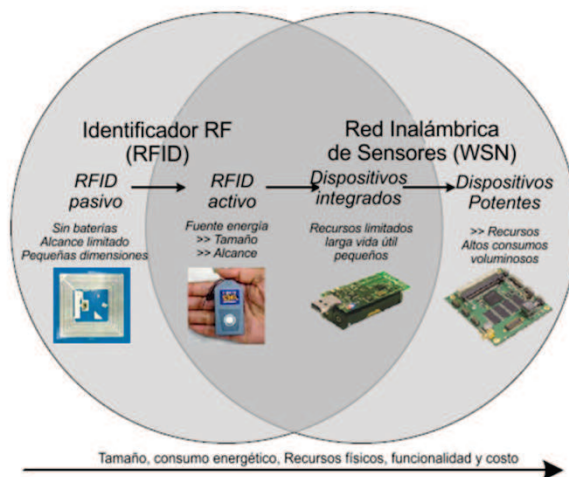


Figura 2: Convergencia de tecnologías RFID y WSN.

Infraestructura IoT

La infraestructura necesaria para soportar IoT ha ido evolucionando rápidamente los últimos años. Hoy con el advenimiento IPv6 y de la posibilidad teórica de direccionamiento de alrededor de 340 undecillones de dispositivos (2128) (16) se obtiene una inagotable capacidad de administración de dispositivos para la red soporte. El número de teléfonos móviles para fines de 2011 alcanzaron las 6.000 millones de unidades (17) convirtiéndose en la tecnología líder en inversiones en cuanto a telecomunicaciones. Debido a este inusitado desarrollo, inversiones y avances en la telefonía móvil, esta tecnología ha derramado en otras tecnologías emergentes la posibilidad de un rápido desarrollo.

Hoy, estamos viviendo un cambio en la forma de acceso a la red, desde el acceso primario por medio de PC hacia los dispositivos móviles (teléfonos inteligentes, portátiles o Tablet PC). Los dispositivos son proporcionados al usuario final con una cantidad cada vez mayor de sensores y actuadores. La combinación de estos elementos crea un entorno capaz de percibir, calcular, y por lo tanto actuar inteligentemente como parte de la red. Los diferentes objetos físicos del presente, cada vez más frecuentemente son presentados con sus tarjetas RFID o códigos de respuesta rápida (QR-Codes). Este tipo de combinaciones interconectan al mundo físico con internet, utilizando casi ineludiblemente dispositivos inteligentes.

Caracterización de IoT

La Internet del mundo real se basa en la ubicuidad de los dispositivos móviles y la proliferación de redes inalámbricas, permitiendo a todos el acceso permanente a Internet continuamente y en cualquier lugar.

El aumento de la capacidad y potencia de cómputo

de los dispositivos ayudará a las personas a generar sus aplicaciones, las que serán propias para cada actividad social y cognitiva. La independencia del vínculo físico visible no importa solamente en los dispositivos de usuario, otros elementos (prendas de vestir, neumáticos, cepillos de dientes, edificios) pueden conectarse y colaborar comportándose como un elemento más de una red global de dispositivos, con conectividad a diferentes nodos a través de redes locales ó globales (8).

Si bien existen algunos experimentos embrionarios bien conocidos -Arduino, Nabaztag, Pachube, Touchatag, Thingspeak, Cosm-, el camino a recorrer es bastante largo aún. Hoy los objetos pueden intercambiar información en una "Intranet de cosas" en ambientes donde los procesos son controlados. La cuestión aún no resuelta tiene que ver con la interconexión a Internet de las Cosas, que por definición deberían ser abiertas, aleatorias y complejas.

Cabe preguntarse ahora: ¿Es IoT solamente otra cara de conceptos bien conocidos respecto a la computación inalámbrica, inteligencia ambiental, de las WSN y RFID? ¿Qué es realmente IoT? ¿Cuáles son sus principales componentes?

Entre las diferencias sustantivas con Internet, tal como la conocemos hoy, encontramos a la invisibilidad del hardware, al número de nodos participantes, la conectividad, la orientación de los servicios y la especificidad de tarea.

Por norma, el hardware destacado para IoT es considerablemente diferente a lo que estamos acostumbrados a ver en las redes contemporáneas. Esto se debe fundamentalmente a que el propósito de ambas tecnologías es completamente diferente. Mientras las terminales de Internet están normalmente establecidas por computadores personales utilizadas como estaciones de trabajo, y teléfonos móviles con una amplia gama de recursos; en el dominio de IoT las terminales de red son de tamaño insignificante, y en muchos casos incluso invisibles y de muy baja disponibilidad de recursos. Las diferencias paradigmáticas, pasan por la necesidad de las primeras (internet de hoy) de permanecer conectadas a la red de energía eléctrica, contra la necesidad de las "cosas" de funcionar durante largos períodos de tiempo antes de desaparecer o extinguirse. Comparando los procesos de transmisión y recepción, potencia de cálculo, capacidad de almacenamiento y consumo energético, los nodos IoT poseen una fracción de las capacidades de las terminales/servidores actuales.

Otra de las reglas fundamentales que se cumple en el dominio IoT, es que los dispositivos no interactúan directamente con humanos. Existen más de 4.109 teléfonos móviles inteligentes; más de mil trescientos millones de computadoras personales, cámaras de diferentes tipos, PDAs y servidores (18) que prestan servicio para que permanezcamos interconectados el 33% de las siete mil millones de personas que habitamos el planeta.

Estos números semejan ser inconmensurables, pero no son más que una fracción de la totalidad de “cosas” que se crean y fabrican todos y cada uno de los días. Consideremos solamente a aquellos productos que portan un microprocesador y que no poseen la capacidad de comunicarse, tales como lavarropas, cepillos electrónicos, heladeras y televisores. Considerando la potencialidad que a los dispositivos mencionados se adicione un transceptor; debe considerarse en todo momento que las personas no pueden pretender comunicarse con ellos directamente; y sobre todo la necesidad de la existencia de una nueva infraestructura de red que soporte todo el tráfico generado por estos dispositivos.

Las tecnologías ofrecidas al usuario de Internet como última milla, han avanzado considerablemente, posibilitando alta capacidad de tráfico, y un excelente nivel de calidad de servicios de transmisión de voz, datos, video y otros. En las acometidas domiciliarias por medios físicos como cobre y fibra óptica, un valor normal de tráfico de datos alcanza a los 5 Mbit/s. En el futuro cercano este valor alcanzará los 50-100 Mbit/s. En las redes de sensores inalámbricas -WSN- y de Identificación por Radiofrecuencia -RFID- la velocidad de transferencia es de 3 órdenes menos, rondando los 150 kbit/s.

Hoy en Internet, la gran mayoría de los servicios están orientados a los usuarios finales (e-mail, www, chat, VoIP, FTP, comercio, etc). IoT viene a definir un rango de servicios, que excluye taxativamente la posibilidad de la intervención directa del humano. En la mayoría de las aplicaciones en el dominio de IoT, los dispositivos inteligentes se comunican entre ellos de la forma M2M, aprobando la interacción con humanos solamente ante la necesidad de tomar ciertas decisiones. En este punto se debe recordar el concepto computación ubicua, entendiéndola como la integración de las TIC's en el entorno de las personas, de forma tal que los ordenadores no se perciban como objetos físicos bien diferenciados (5).

La historia del éxito económico de Internet ha comenzado con la WWW, que ha permitido a empresas alcanzar a los clientes en forma global para así proveer y distribuir contenidos a costos muy bajos. Con la web 2.0 se ha avanzado en contenidos generados por los propios usuarios. IoT permite que el mundo físico (cosas y lugares) generen datos de manera autónoma. IoT nace para llevar la red hacia el evento, permitiendo aumentar la granularidad del acto de “sentir”, adicionando millones de terminaciones nerviosas nuevas (equipos); y con ello habilitando una herramienta que permite adentrarse a un nuevo mundo de oportunidades, desafíos, como también de nuevos riesgos.

¿Es Internet de las Cosas una nueva Red?

De acuerdo a lo considerado hasta aquí se podría argumentar que IoT no es más que una nueva aplicación en Internet; con varios elementos que actualmente conocemos

como servicios en Internet. Algunos autores consideran por ello que IoT es una exageración y que debería ser considerada un servicio y ser llamado “web de las cosas” (19). Se debe convenir que esta visión requiere de bloques de bajo nivel necesarios para direccionar e identificar unívocamente cada una de las cosas inteligentes, interconectándolas con los vínculos de última milla y luego con Internet. Por ello se puede contextualizar a IoT como una extensión de Internet hacia el mundo real, dado que no existe diferencia entre infraestructura y nivel de aplicación. Son fundamentales en este dominio las cuestiones relacionadas con la posibilidad de establecer inter-operatividad total entre los diferentes dispositivos, a los cuales se los vislumbra cada vez con una mayor capacidad y con ello una mejor adaptación y comportamiento autónomo; garantizando así confianza, seguridad y privacidad.

Los problemas típicos en este tipo de redes es que precisan de soluciones y desarrollos sobre la eficiencia tecnológica -energía, capacidad de cálculo y poder de procesamiento-, la cual debe trascender la pretendida escalabilidad. Tal vez pueda considerarse en este caso transformar a los objetos interconectados en actores reales de Internet, desarrollando e implementando las metodologías correspondientes.

Desafíos identificados

Las líneas de investigación establecidas en el derrotero hacia la aceptación definitiva de IoT por la industria y la sociedad consideran a los siguientes tópicos: estandarización, privacidad, autenticación, seguridad, confiabilidad, integración, coordinación y regulación.

La estandarización es un requerimiento primordial hacia la globalidad de IoT, facilitando con ello la aceptación masiva. El hecho debe permitir aceptar la tecnología de conectividad ubicua propuesta abarcando a tal cantidad de objetos sin sacrificar nada de privacidad. Cada uno de los elementos de IoT deberá ser etiquetado con el propósito de identificación y seguimiento; debiendo estar protegido contra accesos indebidos y/o interceptación de tráfico por medio de autenticación.

La comunicación “máquina a máquina -M2M-” por cable, inalámbrica ó móvil es una tecnología disponible hace ya un tiempo, que se ha popularizado con los servicios de red inalámbricos. Es la forma más popular de comunicación en Internet de las Cosas (IoT) actualmente. Debido a factores de escala y diseño, existen importantes vulnerabilidades en cuanto a seguridad que deberán ser estudiadas y subsanadas en el futuro próximo.

La confiabilidad y privacidad de la información en la red es otra de las cuestiones en juego. La confiabilidad implica autenticidad de la información en tránsito, de la identificación inequívoca de los actores en la comunicación, como también un reaseguro de la calidad de las mediciones efectuadas por los equipos desplegados.

Todo lo anterior debe ser coordinado de una manera tal que permita la utilización eficiente de la información colectada, siendo precisas para ello la colaboración y cooperación de las personas, aplicaciones, procesos y servicios a integrarse en el dominio IoT.

Las regulaciones en los diferentes escenarios es una tarea complicada toda vez que involucra a las leyes y preceptos locales, gubernamentales e internacionales. La auto-regulación es una propiedad pretendida en los dispositivos de la nueva generación por ser rentable y eficiente; pero en realidad la mayoría de los mismos no soportará esta característica.

Conclusiones

Hace un tiempo el número de dispositivos interconectados ha alcanzado al número de personas que habitamos el planeta. Estos dispositivos no se conforman exclusivamente de teléfonos inteligentes y tabletas. Existen implementaciones tan disímiles como aquellas para el control de establos atendiendo al estado de salud o alimentación de los animales, como en ambientes donde se vigila la salud humana en hospitales y/o en residencias geriátricas.

El cambio experimentado de paradigmas envuelve a la sociedad toda, debiendo atenderse los desafíos éticos y tecnológicos a nivel global. El crecimiento de la red sin ningún tipo de regulación o interferencias podría devenir en una sociedad bajo vigilancia, donde la privacidad de cada uno de los individuos se vería fuertemente amenazada por el registro de viajes, derroteros, ubicaciones y transacciones económicas. Internet de las cosas debe abocarse a mitigar los riesgos en una sociedad donde la información propia debe ser transparente para aquellos actores seleccionados y totalmente invisibles para los demás.

El desarrollo de IoT depende de la dinámica de la innovación tecnológica en campos tan diversos como los sensores inalámbricos, la nanotecnología, y el software para sistemas embebidos. Las redes serán en el futuro un negocio próspero y de bajo costo, y la dependencia de la tecnología podría convertirse en un problema serio para las generaciones por venir.

Además del enfoque en las redes; las tecnologías subyacentes tales como acceso móvil, redes inalámbricas y redes de fibra; siguen siendo los factores clave para el desarrollo de Internet en el futuro. Los principales desafíos son el soporte de aplicaciones para banda ancha móvil, manejo de escenarios, escalabilidad incluyendo soporte QoS, seguridad y confiabilidad.

Referencias

1. **Socolofsky, T. ; Kale, C.** “Un Tutorial de TCP/IP”. Request for Comments (RFC) 1180: Network Working Group. [Online] Enero 1991. [Visitado Diciembre 10, 2013.] <http://goo.gl/btlEuB>.
2. **O'Reilly, T.** “What Is Web 2.0: Design Patterns and Business Models for the Next Generation of Software”. Spreading the knowledge of Innovators [Online] Septiembre 6, 2005. [Visitado 06 25, 2011] <http://tiny.cc/w6eetw>.
3. **Serrano Cobos, J.** “Pasado, presente y futuro de la Web 2.0 en servicios de información digital”. [Online] Textos universitarios de biblioteconomía i documentació, Diciembre 8, 2006. [Visitado Octubre 23, 2012] <http://goo.gl/1QWLx>.
4. **Alexa, the Web Information Company.** Top Sites. [Online] Enero 2013. [Visitado Febrero 15, 2013] <http://goo.gl/vBZ1X>.
5. **Weiser, M.** “The computer for the 21st century”. [Online] sept 1991. [Visitado Octubre 12, 2011] <http://goo.gl/zBIHf>.
6. **CORDIS.** Servicio de Información Comunitario sobre Investigación y Desarrollo. Descubra la Investigación de la UE. [Online] Enero 12, 2013. [Visitado Enero 12, 2013] <http://tiny.cc/w1fetw>.
7. **Tan, L.; Neng, W.** “Future internet: The Internet of Things”. 2010. 3º International Conference on Advanced Computer Theory and Engineering (ICACTE). Vol. 5, pp. 376-380.
8. **International Telecommunication Union.** ITU Internet Reports 2005: The Internet of Things. [Online] noviembre 01, 2005. [Visitado Octubre 16, 2012] <http://goo.gl/5jN9BC>.
9. **Information Society Technologies Advisory Group (ISTAG).** “Orientations for Workprogramme 2000 and beyond”. Chairman ISTAG. 1999.
10. **Meyer, G.; Främling, K.; Holmström, J.** “Intelligent Products: A survey”. 2009, Computers in Industry, Vol. 60, Nro. 3, pp. 137-148.
11. **Ashton, K.** “That ‘Internet of Things’ Thing”. RFID Journal. [Online] Junio 22, 2009. [Visitado Octubre 15, 2012] <http://goo.gl/d7YAx>.
12. **Gershensfeld, N.** “When things start to think”. 1. New York : Henry Holt, 1999.
13. **Atzori, L.; Iera, A. and Morabito, G.** “The Internet of Things: A survey”. 2010, Computer Networks, Nro. 15, Vol. 54, pp. 2787-2805. ISSN 1389-1286.
14. **Sosa, E.** “Contribuciones al Establecimiento de una Red Global de Sensores Inalámbricos Interconectados”. Universidad de La Plata, 2011. pp. 1-14, Tesis Doctoral.

15. **Fisher, J.; Monahan, T.** “*Tracking the social dimensions of RFID systems in hospitals*”. 2008, International Journal of Medical Informatics, Nro. 3, Vol. 77, pp. 176-183.
16. **Sailan, M.K.; Hassan, R. ; Patel, A.** “*A comparative review of IPv4 and IPv6 for research test bed*”. 2009. International Conference on Electrical Engineering and Informatics. Vol. 2, pp. 427-433.
17. **International Telecommunication Union.** *Global ICT developments*. [Online] Enero 15, 2013. [Visitado Enero 15, 2013] <http://tiny.cc/ofr21w>.
18. **MobiThinking.** *Mobile Marketing Tools*. [Online] Noviembre 2012. [Visitado Octubre 15, 2012] <http://tiny.cc/2lr21w>.
19. **Christophe, B.** “*Semantic Profiles to Model the ‘Web of Things’*”. 2011. 7 International Conference on Semantics Knowledge and Grid (SKG). pp. 51-58.

Recibido: 19/03/2013

Aprobado: 24/08/2013

Propiedades eléctricas de metilésteres obtenidos de aceites vegetales entre 20Hz y 2MHz

Electrical properties of FAME obtained from vegetable oils from 20Hz to 2MHz

Julián Corach^{1,2,*}, Patricio A. Sorichetti³, Silvia D. Romano^{1,2}

1- Grupo de Energías Renovables (GER), Facultad de Ingeniería (FI), Universidad de Buenos Aires (UBA), Av. Paseo Colón 850, 1063, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

2- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Av. Rivadavia 1917, 1033, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

3- Laboratorio de Sistemas Líquidos, Facultad de Ingeniería (FI), Universidad de Buenos Aires (UBA), Av. Paseo Colón 850, 1063, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* E-mail: jcorach@fi.uba.ar

Resumen

Las mediciones de propiedades eléctricas han sido exitosamente utilizadas en trabajos anteriores para caracterizar mezclas de metilésteres de ácidos grasos (FAME - fatty acid methyl esters) obtenidas a partir de aceite de soja. En este trabajo se muestra que esta técnica puede ser también utilizada en FAME producido a partir de otros aceites vegetales. Esta generalización es relevante en el ámbito industrial, en mediciones de laboratorio, en control de calidad y para realizar medidas en línea en sistemas automáticos de producción.

En este trabajo se determinó la dependencia de la permitividad y la conductividad con la temperatura de mezclas de FAME obtenidos a partir de aceite de girasol, maíz, uva, chía, canola, jatropha, coco y algodón entre 300K y 343K, para frecuencias desde 20Hz hasta 2MHz. En todas las muestras estudiadas la permitividad presenta una dependencia lineal decreciente con la temperatura, en tanto la conductividad presenta una dependencia exponencial (modelo de Arrhenius), con energías de activación entre 0,20 eV y 0,25 eV.

Palabras clave: Permitividad; Conductividad; FAME; Biodiesel; Propiedades eléctricas.

Abstract

Electrical properties measurements have been successfully applied in previous works to characterize mixtures of fatty acid methyl esters (FAME) obtained from soybean oil.

In this work, it is shown that these techniques may be applied to FAME samples from other feedstocks. This generalization is relevant in industrial applications, as well as in laboratory measurements, quality control and "on line" production systems. Permittivity and conductivity dependences on temperature were determined between 303 K and 343 K in the frequency range 20 Hz to 2 MHz in FAME samples from sunflower, corn, grapeseed, chia, canola, jatropha, coconut and cottonseed oils. In all the samples analyzed permittivity decreases linearly with temperature, and an exponential (Arrhenius) function fits well the conductivity data, with activation energies between 0,20 eV and 0,25 eV.

Keywords: Permittivity; Conductivity; FAME; Biodiesel; Electrical properties.

Introducción

Las mezclas de metilésteres de ácidos grasos (FAME) se obtienen a partir de aceites vegetales mediante una reacción denominada transesterificación. En la misma, reacciona un alcohol (usualmente metanol) con un aceite de origen vegetal (éster) y se obtiene otro alcohol (glicerol) y otro éster (Figura 1) [1, 2, 3].

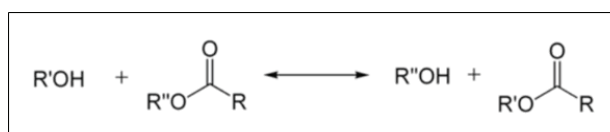


Figura 1: Esquema de la reacción de transesterificación. R'OH y R''OH representan químicamente los alcoholes, y los grupos con el doble enlace de oxígeno representan los ésteres.

En la práctica, la reacción es catalizada con hidróxido

de sodio. Además, normalmente se trabaja con exceso de alcohol, con el objetivo de que la reacción (de equilibrio) se desplace hacia los productos. Tanto el hidróxido de sodio como el alcohol en exceso son removidos mediante sucesivas etapas de lavado con agua, de modo de asegurar la calidad del producto final.

Si bien la principal aplicación de FAME es como biocombustible (biodiesel), tanto puro como en mezclas con Diesel, es importante señalar que también se utiliza en muchas otras aplicaciones, tales como aislante líquido de transformadores de distribución y de potencia [4], en la industria cosmética, y en la fabricación de pinturas, barnices, tintas, etc. [5].

Para que una muestra de FAME pueda ser considerada biodiesel, los valores de ciertas propiedades (por ejemplo la viscosidad, el índice de acidez y la densidad) deben estar dentro de los rangos establecidos por las normas internacionales. Si en una muestra dada se miden todas las propiedades establecidas en las normas internacionales, y al menos una propiedad toma valores fuera de los rangos permitidos, entonces tal muestra no puede ser considerada como biodiesel.

Existen dos propiedades eléctricas que, si bien hasta el presente no están contempladas en las normas internacionales de calidad de biodiesel, brindan información útil sobre las muestras de FAME. Estas propiedades son la permitividad y la conductividad, y pueden ser medidas mediante espectroscopía dieléctrica. Esta técnica es rápida, no destructiva, económica y adecuada tanto en laboratorio como en aplicaciones industriales, incluyendo sistemas automáticos de control “en línea” [6, 7, 8].

Las mediciones de conductividad y permitividad permiten detectar la presencia de contaminantes polares como agua, hidróxido de sodio y alcohol, que afecta de forma negativa la calidad de la materia prima y del producto final [9, 10, 11]. Además, posibilitan diferenciar entre muestras de aceite vegetal y de FAME.

El Grupo de Energías Renovables (GER) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Buenos Aires ha estado produciendo y caracterizando FAME durante muchos años, a partir de aceites vegetales. El GER también estudia técnicas de producción automática en la planta piloto. La caracterización de FAME para su uso en motores Diesel se lleva adelante mediante la medición de propiedades requeridas en normas internacionales [12,13] y de propiedades eléctricas.

Cabe destacar que el GER publicó anteriormente estudios de FAME obtenidos a partir de aceite de soja en las distintas etapas de producción [8,14]. Dado que en la actualidad se utiliza una amplia variedad de aceites vegetales para la producción de FAME en diferentes países [15], en este trabajo se extendió a otros aceites vegetales la investigación realizada con el aceite de soja [14].

Materiales y métodos

Se analizaron muestras de FAME obtenidas a partir de ocho aceites vegetales, tanto comestibles (girasol, maíz, uva, chía y canola) como no comestibles (coco, algodón y jatropha). Las muestras fueron producidas mediante la transesterificación entre cada aceite y metanol. La relación aceite-alcohol fue 25% (V/V). La reacción se llevó a cabo con agitación continua a 60°C utilizando hidróxido de sodio como catalizador. El FAME así obtenido fue purificado mediante etapas de lavado y secado para eliminar impurezas. Los aceites vegetales comestibles fueron adquiridos en envases comerciales, mientras que los aceites no comestibles fueron donados por productores argentinos.

La permitividad relativa compleja ϵ_r de una sustancia es una propiedad vinculada a la acumulación y disipación de energía debidas a la acción de campos eléctricos externos; en este trabajo se supone que los campos tienen variación temporal armónica con frecuencia angular ω ($\omega = 2\pi f$, y f es la frecuencia del campo expresada en Hz).

Es posible obtener la permitividad relativa $\epsilon_r(\omega, T)$ relativa de una sustancia mediante mediciones de capacidad eléctrica. La capacidad en vacío C_o de una celda de medición dieléctrica (análoga a un capacitor de placas paralelas) puede suponerse independiente de la frecuencia y de la temperatura y con resistencia e inductancia despreciables en el rango de frecuencias estudiado en este trabajo. Cuando se introduce un dieléctrico en la celda, en general la capacidad depende de la temperatura y, si las pérdidas del dieléctrico no son despreciables, la capacidad pasa a representarse mediante un número complejo, como se muestra en la Ec. 1

$$C(\omega, T) = C'(\omega, T) - i C''(\omega, T) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde $C'(\omega, T)$ representa los efectos de acumulación de energía y $C''(\omega, T)$ representa los efectos de disipación de energía. El cociente entre la capacidad $C(\omega, T)$ de la celda llena con la muestra en estudio y la capacidad en vacío C_o es la permitividad relativa compleja ϵ_r de la muestra a la frecuencia angular ω y a la temperatura T , como se indica en la Ec. 2

$$\frac{C(\omega, T)}{C_o} = \epsilon_r(\omega, T) = \epsilon_r'(\omega, T) - i \epsilon_r''(\omega, T) \quad (\text{Ec. 2})$$

donde ω es la frecuencia angular del campo externo, T es la temperatura de la muestra expresada en grados Kelvin, y $\epsilon_r'(\omega, T)$ y $\epsilon_r''(\omega, T)$ son, respectivamente, las partes real e imaginaria de la permitividad relativa compleja.

El sistema de medición de propiedades eléctricas utilizado [16, 17] se esquematiza en la Figura 2.

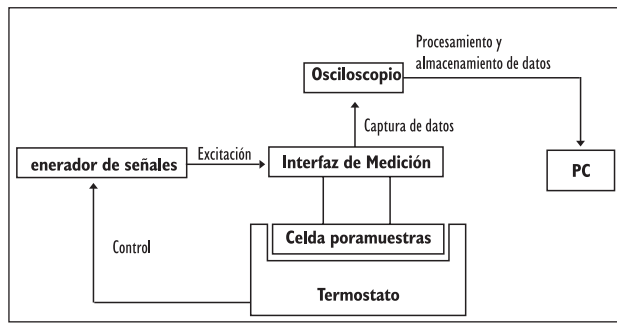


Figura 2: Esquema del sistema de medición.

El generador de señales produce un barrido de frecuencias desde 20Hz hasta 2MHz. Las señales excitan la celda termostatizada - que contiene la muestra de la sustancia en estudio- a través de la interfaz de medición. Un capacitor de referencia de valor conocido se encuentra conectado a la interfaz y también es excitado por las señales emitidas por el generador. Las señales de la celda bajo estudio y del capacitor de referencia son captadas por el osciloscopio digital, comparadas en módulo y fase y enviadas a la computadora personal (PC), donde son almacenados los datos; las mediciones son controladas por la PC. La comparación en módulo y fase de las señales de la celda portamuestras y del capacitor de referencia permite conocer el valor de la capacidad de la muestra y posteriormente, como se indicó con anterioridad, obtener los valores de la permitividad relativa compleja.

A cada temperatura, las partes real e imaginaria de la permitividad relativa compleja fueron descriptas como funciones de la frecuencia mediante las Ecs. 3 y 4 de la Sección Resultados y Discusión. Para determinar los parámetros se empleó un algoritmo no-lineal de cuadrados mínimos (Leventhal-Marquardt) a fin de minimizar el error cuadrático medio del ajuste.

Resultados y Discusión

A partir de las mediciones realizadas, se obtuvieron los espectros dieléctricos de las ocho muestras de FAME medidas, para frecuencias entre 20Hz y 2MHz y temperaturas entre 300K y 343K con una precisión de $\pm 0,1K$. Como ejemplo, las Figuras 3 y 4 muestran los valores de las partes real e imaginaria de la permitividad relativa compleja en función de la frecuencia. Se trata de una muestra de FAME obtenida a partir de aceite de chía, medida a una temperatura de 343K.

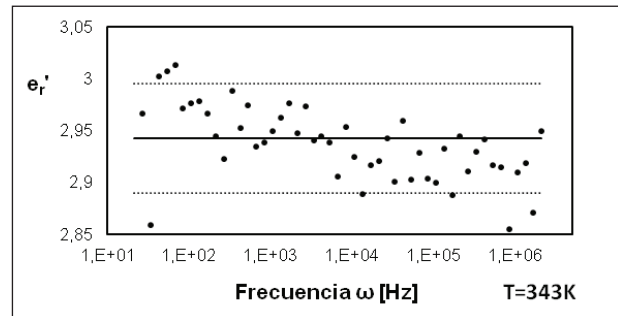


Figura 3: Parte real de la permitividad relativa compleja en función de la frecuencia.

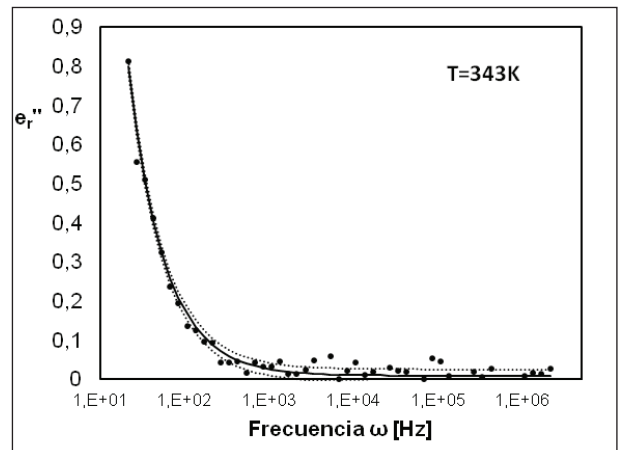


Figura 4: Parte imaginaria de la permitividad relativa compleja en función de la frecuencia.

En cada figura, los valores experimentales están representados con puntos, el ajuste con línea continua y los límites de las bandas de incertidumbre con líneas punteadas. El ancho de cada banda de incertidumbre corresponde a dos veces el error cuadrático medio del ajuste. Cabe destacar que todas las muestras de FAME presentadas en este trabajo, en todo el intervalo de temperaturas estudiado, presentan dependencias cualitativamente similares.

En el rango de frecuencias estudiado, la parte real de la permitividad relativa ϵ'_r de las sustancias medidas resultó independiente de la frecuencia, como muestra la Ec. 3

$$\epsilon'_r(\omega, T) = \epsilon'_r(T) \quad (\text{Ec. 3})$$

donde T es la temperatura expresada en K.

Por otro lado, la disipación de energía se debe principalmente al movimiento de portadores de carga, los cuales aparecen tanto por la presencia de contaminantes como por efectos térmicos, ya que los efectos de relajación se producen a frecuencias mucho mayores que la máxima frecuencia de medición de este trabajo ($\epsilon''_{pol} \rightarrow 0$). Entonces, la parte imaginaria ϵ''_r puede escribirse del siguiente modo

$$\epsilon''_r(\omega, T) = \frac{\sigma(T)}{\epsilon_o \omega} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde ϵ_o es la permitividad del vacío $8,85 \times 10^{-12} \text{ F/m}$ y σ es la conductividad de la sustancia en estudio expresada en S/m . La expresión resultante de la permitividad relativa compleja para este caso, se indica en la Ec. 5.

$$\epsilon_r(\omega, T) = \epsilon'_r(T) - i \frac{\sigma(T)}{\epsilon_o \omega} \quad (\text{Ec.5})$$

Al aplicar un campo externo a una sustancia dieléctrica, como las muestras estudiadas en este trabajo, los momentos dipolares moleculares tienden a alinearse con el campo externo. Por un lado el movimiento debido a la agitación térmica se opone al ordenamiento de los mismos; por otro lado la densidad molecular disminuye debido a la dilatación del fluido por el incremento de temperatura. Se comprende así que $\epsilon'_r(T)$ tienda a decrecer a medida que la temperatura aumenta. En el rango de temperaturas estudiado en este trabajo, es posible ajustar la dependencia de ϵ'_r mediante una función lineal, como se indica en la Ec. 6

$$\epsilon'_r(T) = \epsilon'_r(T_o) + \frac{d\epsilon'_r}{dT}(T - T_o) \quad (\text{Ec.6})$$

donde $\epsilon'_r(T_o)$ es la parte real de la permitividad relativa a la temperatura de referencia $T_o = 318\text{K}$ y $\frac{d\epsilon'_r}{dT}$ es el coeficiente de temperatura a la temperatura de referencia, expresado en $1/\text{K}$.

Por otra parte, el valor de la conductividad $\sigma(T)$ aumenta rápidamente a medida que aumenta la temperatura, y puede ser ajustado como se indica en la Ec. 7

$$\sigma(T) = A \exp(BT) \quad (\text{Ec.7})$$

donde las constantes A y B son mayores que cero y T es la temperatura expresada en K.

La Figura 5 muestra mediante símbolos los valores de ϵ'_r en función de $T - T_o$ (con $T_o = 318\text{K}$) y con líneas continuas los ajustes lineales para cada una de las muestras de FAME medidas.

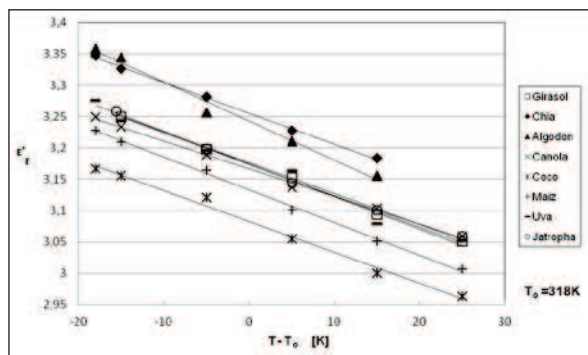


Figura 5: Parte real de la permitividad en función de la temperatura de muestras de FAME obtenidas a partir de aceites vegetales.

En todos los casos, el valor de ϵ'_r se ajustó bien a una función lineal decreciente con la temperatura, con coeficientes de correlación R^2 comprendidos entre 0,985 y 0,998.

Los parámetros de ajuste de la Ec. 6 y sus incertezas fueron obtenidos a partir de los valores experimentales. Los valores de $\epsilon'_r(T_o)$ y $\frac{d\epsilon'_r}{dT}$ para $T_o = 318\text{K}$ para cada muestra de FAME estudiada se muestran en la Figura 6. En todos los casos las bandas de incerteza corresponden a dos desvíos estándar.

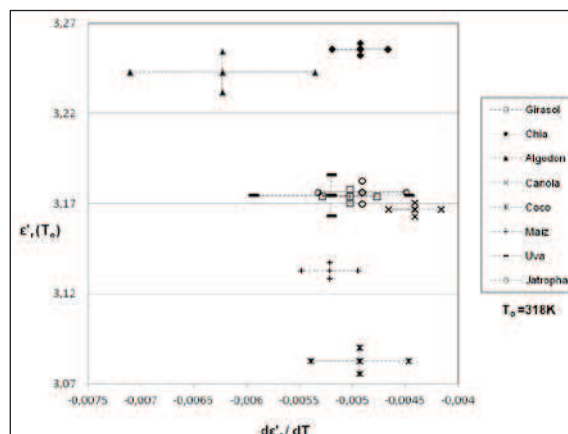


Figura 6: Parámetros de ajuste de la parte real de la permitividad para FAME producidos a partir de diferentes aceites vegetales.

Los valores de $\epsilon'_r(T = 318\text{K})$ de las muestras de FAME obtenidos a partir de distintos aceites vegetales estuvieron comprendidos entre 3,08 (coco) y 3,26 (chía). En todos los casos, la incertidumbre relativa fue menor al 0,35%. Los valores de $\frac{d\epsilon'_r}{dT}$ estuvieron comprendidos entre $-4,4 \times 10^{-3}$ (FAME obtenido a partir de aceite de canola) y $-6,2 \times 10^{-3}$ (FAME obtenido a partir de aceite de algodón). La incertidumbre relativa para este parámetro estuvo comprendida entre 5% y 14%.

Los resultados expuestos indican que los valores de la parte real de la permitividad de las muestras de FAME estudiadas no dependen apreciablemente del origen del aceite vegetal utilizado. Esto es debido a que la estructura molecular de los FAME varía poco al utilizar para su producción aceites vegetales de distintos orígenes [9,14]. Esta independencia respecto al origen del FAME se observa también en otras propiedades físicas y químicas especificadas en normas internacionales, las cuales toman valores contenidos en intervalos estrechos. La correlación entre algunas de esas propiedades y las propiedades eléctricas de FAME fue reportada en aceite de soja [9,18]. Así, las mediciones de la parte real de la permitividad pueden ser utilizadas para detectar la presencia de contaminantes, como restos de metanol o aceite no transesterificado (es decir, aceite que no reacciona con el metanol).

La conductividad en función de la temperatura de las muestras de FAME estudiadas se grafica en la Figura 7, en escala semi logarítmica. Los símbolos indican los valores

de $\sigma(T)$ obtenidos para las muestras de FAME a distintas temperaturas, a partir del ajuste de la Ec. 4, y las líneas representan los ajustes como se indica en la Ec. 7.

La dependencia exponencial permite analizar los resultados experimentales con un enfoque diferente. En lugar de describir la dependencia de la conductividad con la temperatura mediante la Ec. 7, es posible ajustarla con una función de tipo Arrhenius como indica la Ec. 8:

$$\sigma(T) = \sigma_o \exp\left(\frac{d}{T}\right) \quad (\text{Ec.8})$$

donde el parámetro d puede considerarse proporcional a una energía de activación ΔE expresada en J , siendo $d = \frac{\Delta E}{kT}$, k es la constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$) y σ_o es el factor pre-exponencial expresado en S/m .

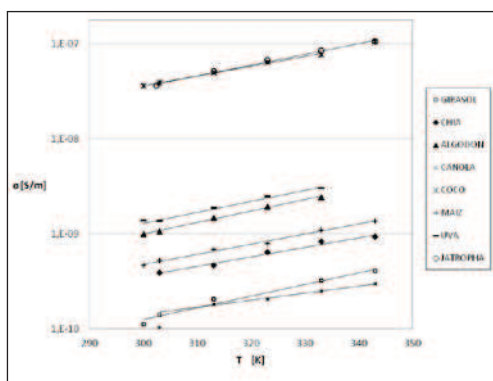


Figura 7: Conductividad en función de la temperatura para FAME producidos a partir de diferentes aceites vegetales.

La Ec. 8 permite calcular la energía de activación de la conductividad eléctrica, la cual indica la rapidez de variación de la conductividad al variar la temperatura. Los valores de energía de activación ΔE así obtenidos estuvieron comprendidos entre 0,20 eV (FAME obtenido a partir de aceite de algodón) y 0,25 eV (FAME obtenido a partir de aceite de girasol) y tuvieron, en todos los casos, incertidumbres relativas menores al 12%, con coeficientes de correlación R^2 mayores que 0,980 indicando que la correlación estadísticamente significativa (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros de ajuste: factor pre-exponencial σ_o , energía de activación ΔE y coeficiente de correlación R^2 para FAME producidos a partir de diferentes aceites vegetales.

Materia prima	σ_o [S/m]	ΔE [eV]	R^2
Girasol	$2,06\text{E-}06$	$0,25 \pm 0,02$	0,980
Chía	$1,04\text{E-}06$	$0,20 \pm 0,01$	0,984
Algodón	$1,02\text{E-}05$	$0,24 \pm 0,01$	0,999
Canola	$1,00\text{E-}06$	$0,23 \pm 0,02$	0,983
Coco	$8,73\text{E-}05$	$0,20 \pm 0,01$	0,999
Maíz	$2,06\text{E-}06$	$0,21 \pm 0,01$	0,991
Uva	$1,04\text{E-}05$	$0,23 \pm 0,01$	0,994
Jatropha	$2,92\text{E-}04$	$0,23 \pm 0,01$	0,996

Los valores obtenidos son comparables a los reportados en muestras de FAME producidas a partir de soja (aproximadamente 0,21eV) [14].

Es importante destacar que el factor pre-exponencial

σ_o no es una propiedad intrínseca de las muestras, debido a que depende fuertemente de la presencia de humedad y otros contaminantes [9,10]. Dado que la energía de activación es una propiedad intrínseca, es posible realizar mediciones de la conductividad $\sigma(T)$ a diferentes temperaturas y, a través de la dependencia de Arrhenius, referirlas a una temperatura común. De esta manera es posible comparar cuantitativamente el grado de contaminación de las muestras de FAME (relacionado con σ_o con independencia de la temperatura (por ejemplo, en las distintas etapas de producción, almacenamiento y transporte).

Conclusiones

Se obtuvieron los espectros dieléctricos de muestras de FAME obtenidas a partir de distintos aceites vegetales, para frecuencias entre 20Hz y 2MHz, y a temperaturas comprendidas entre 300K y 343K. Las muestras fueron producidas a partir de aceite de girasol, maíz, uva, chía, canola, jatropha, coco y algodón.

En todos los casos, el valor de la parte real de la permitividad de las muestras de FAME decrece a medida que aumenta la temperatura de la misma; además, se obtuvo un ajuste de los valores experimentales con una función lineal con coeficientes de correlación R^2 mayores a 0,985 en todos los casos.

Los parámetros de ajuste de todas las muestras toman valores contenidos en un intervalo estrecho, como era de esperar dado que la estructura molecular de todas las muestras de FAME es similar. De la misma manera que sucede con otras propiedades físicas y químicas, cuyos valores deben estar acotados dentro de determinados límites establecidos por normas internacionales, los valores de la parte real de la permitividad resultaron prácticamente independientes del origen de las muestras de FAME. En consecuencia, las mediciones de la parte real de la permitividad pueden utilizarse para determinar la presencia de contaminantes, como restos de metanol o aceite vegetal no transesterificado.

El incremento de la conductividad de las muestras de FAME a medida que aumenta la temperatura se modela en forma exponencial (dependencia de tipo Arrhenius) con coeficientes de correlación mayores a 0,980 en todos los casos. Los valores de energía de activación de las muestras estudiadas estuvieron comprendidos entre 0,20 eV y 0,25 eV. Debido a que la conductividad de los FAME depende de la presencia de contaminantes, los resultados obtenidos posibilitan utilizar las mediciones de conductividad para comparar cuantitativamente el nivel de contaminación de FAME a diferentes temperaturas, por ejemplo, en las distintas etapas del proceso de producción y también durante el almacenamiento y transporte del producto final.

En resumen, los resultados presentados en este trabajo muestran que las mediciones de propiedades eléctricas, que ya fueron aplicadas a muestras de FAME obtenido a partir de aceite de soja, también pueden ser utilizadas en

muestras obtenidas a partir de diferentes aceites vegetales. La generalización de estos resultados es relevante para la caracterización de muestras tanto en ámbitos industriales como en laboratorios, para control de calidad, y para su aplicación “en línea” en sistemas de producción automáticos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto UBACyT “Investigación y desarrollo en biocombustibles líquidos” (UBACyT 2010 - 2013), de la Universidad de Buenos Aires.

Referencias

1. Ma F, Hanna MA. *Biodiesel production: a review. Biore-sour Technol*, 70(1):1–15, 1999.
2. Knothe, G.; Van Gerpen, J.; Krah, J. *The Biodiesel Handbook*. 1st ed. Illinois: AOCS Press, EEUU, 1–12, 2005.
3. Romano, S.D. *Biodiesel*. In: Romano SD, González Suárez E, Laborde MA, editores. *Combustibles Alternativos*. 1ª ed, Argentina, Ediciones Cooperativas, p. 11–88, 2006.
4. Keshavamurthy, H.C.; Sridhar, S. *Novel capacitor fluid from vegetable oil*. IEEE Inter Symp Electr Insul, 452–5, 1998.
5. Gunstone, F.D. *Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses*. Blackwell Publishing, EEUU, p. 318, 2002.
6. Field, R.F. *Dielectric measurement techniques*. In: von Hippel AR, editor. *Dielectric Materials and Applications*, Cambridge MA: The MIT Press, EEUU, p. 47–62, 1966.
7. Kremer F, Schönhals A. *Broadband dielectric spectroscopy*. 1st ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, Alemania, 2003.
8. Sorichetti, P.A.; Romano, S.D. *Physico - chemical and electrical properties for the production and characterization of Biodiesel*. *Phys Chem Liq*, 43(1):37–48, 2005.
9. Romano, S.D.; Sorichetti, P.A. *Dielectric Spectroscopy in the Production and Characterization of Biodiesel*. 1st ed. London: Springer-Verlag, Reino Unido, 2010.
10. Romano, S. D.; Sorichetti, P. A. *Estimation of methanol content in biodiesel by measurements of electrical properties and flash point determination*. In: Lee WH, Cho VG, editors. *Handbook of sustainable energy*, New York: NOVA Science Publishers Inc, EEUU, p. 679–691, 2011.
11. Romano, S.D.; Sorichetti, P.A.; Buesa Pueyo, I. *Methanol content in biodiesel estimated by flash point and electrical properties*. In: Erbaum JB, editor. *Bioethanol: Production, benefits and economics*, New York: NOVA Science Publishers Inc, EEUU, p. 135–146, 2009.
12. ASTM D 6751- 03 (American Standard of Biodiesel): *Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels*, 2003.
13. EN 14214 (European Standard of Biodiesel): *Automotive Fuels, Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines, Requirements and Test Methods*.
14. Gonzalez Prieto, L.E.; Sorichetti, P.A.; Romano, S.D. *Electric properties of biodiesel in the range from 20 Hz to 20 MHz*. Comparison with diesel fossil fuel, *International Journal of Hydrogen Energy*, Elsevier, Vol. 33, p. 3531–3537, 2008.
15. Romano, S.D.; Pereira, N. Jr. *Materias primas para la producción de combustibles líquidos*. In: Romano SD, González Suárez E, editores. *Biocombustibles líquidos en Iberoamérica*. Ediciones Cooperativas, Argentina, p. 11–29, 2009.
16. Schenkel, C.D.; Sorichetti, P.A.; Romano, S.D. *Electrodos Inter-cambiables para Medir Propiedades Eléctricas en Líquidos*. *Anales de la Asociación Física Argentina*, 17: 283–7, 2005.
17. Sorichetti, P.A.; Matteo, C.L. *Low-frequency dielectric measurements of complex fluids using high-frequency coaxial sample cells*. *Measurement*, 40(4):437–49, 2007.
18. Romano, S.D.; Sorichetti, P.A. *Correlation between electrical properties and flash point with methanol content in biodiesel*. *Chem Phys Res J*, 3 (2/3):259–68, 2009.

Recibido: 16/04/2013

Aprobado: 31/07/2013

Análisis de la cadena de ricino para la producción de biodiesel

Chain analysis of castor oil for biodiesel production

Fernando Ferrari Putti^{1,*}, Nayele Macini², Rafael Ludwig¹

1- Faculdade de Ciências Agronômicas, FCA, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

2- Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade de Ribeirão Preto, USP, SP, Brasil.

*E-mail: fernandoputti@fac.unesp.br

Resumen

La cadena de producción de ricino ha surgido como una de las más importantes de la agroindustria, siendo empleada en una gama de aplicaciones tales como industrial, medicinal, cosmética y energética. Con el desarrollo de investigaciones en bioenergía, se ha descubierto que es posible aprovechar el aceite de ricino para la producción de biodiesel y esto incrementó su importancia otorgándole un gran impacto, especialmente económico. En Brasil, la apuesta de su plantación de ricino tuvo implicaciones tanto sociales como económicas y ambientales y por lo tanto se introdujo en algunas regiones del nordeste semiárido, donde la producción es realizada por pequeños y medianos productores con mano de obra familiar en consorcio con otros cultivos alimenticios, especialmente con especies de ciclo corto para alcanzar mayores ingresos con estos cultivos. El énfasis en los temas sociales es fuerte debido a que la sequía en la región semiárida promueve un obstáculo para una amplia gama de agricultores. Estos sitios se han considerado en estado de calamidad pública y el interés de dar continuidad y consolidación al proyecto de plantación trajo a estas áreas una infraestructura escasa. Considerando el interés económico por el ricino, existen diferencias de opinión, porque incluso el gobierno ha puesto en marcha incentivos para susplantaciones, mientras que hay otros cultivos que tienen mejores ingresos para la producción de energía.

Palabras clave: Sostenibilidad; Combustibles; Agricultura familiar.

Abstract

The production of castor bean has emerged as one of the most important agro-industry, which employs a range of applications such as: industrial, medicinal, cosmetic and energy. With the development of bioenergy research, they have discovered that it is possible to enjoy the castor oil for biodiesel production and then, your importance had a big impact, especially economic. In Brazil, the bet in the plantation appeals such social as economic and environmental, therefore introduced in some regions of the semi-arid northeast, where production is done by small and medium producers familiar with a consortium with other food crops with short cycle species to achieve higher revenue from crops. The emphasis on social issues is strong, because the drought in the semiarid region promotes an obstacle for a wide range of farmers. These places have been considered in the state of public calamity and the interest of continuing and consolidation of the plantation project brought to these areas a lack infrastructure. Already in the economic interest of castor have differences of opinion, because even the government has released incentives for planting castor beans, there are otherscultivations that have better incomes for energy production.

Keywords: Sustainability; Fuel; Family farming.

Introducción

Actualmente, en el mercado mundial, la escasez de recursos y el alto precio de los combustibles fósiles, las fuertes leyes ambientales y los debates sobre el desarrollo sostenible se han vuelto preocupantes para Brasil y esto ha hecho que el país genere proyectos en el área de los biocombustibles.

Uniando todos estos factores sociales, económicos y

ambientales, se estableció en la región semiárida de la mitad norte del Piauí, un proyecto de energía que tiene como objetivo el cultivo de ricino para la producción de combustibles de origen biológico, que se originó a partir de una mezcla de una o más especies. El ricino por ser oleaginosa, es útil para la producción de biodiesel y su cultivo es propicio en el clima del estado nordeste (CESÁR, 2010).

La comercialización de las cosechas de ricino es hecha junto al frijol caupi, siendo el primero con la empresa Bra-

sil Ecodiesel y el segundo con Conab (Compañía Nacional de Abastecimiento). Existe también un proyecto integrado entre el Gobierno Federal, Gobierno Estatal, EMBRAPA Medio-Norte-PI y PI SEBRAE que tiene como objetivo crear una mayor inclusión social y el desarrollo sostenible del Piauí semiárido.

Cabe destacar que la Universidad Federal de Piauí (UFPI) con la planta de la Escuela de Producción de Biodiesel, ya instalada y en funcionamiento desde 2004, opera para la producción de biocombustibles; para la capacitación y formación de los estudiantes de graduación y postgrado; para el desarrollo de nuevas tecnologías y los equipamientos relacionados a área.

El proyecto mira el cultivo de ricino con el objetivo específico de utilización para resultados energéticos, y es relativamente nuevo, pues fue iniciado a mediados de 2005 por el SEBRAE. Este cultivo fue dado como una promesa de alto desarrollo y los índices sociales y económicos han mejorado mucho en la región. Sin embargo, se sabe que el ricino no es el cultivo ideal para el uso de energía, ya que hay otros con mejor consistencia para esto. Así, el ricino no es tan citado entre los cultivos de semillas oleaginosas más importantes para la producción de biocombustibles, y de este modo los índices sociales no se han mejorado como lo esperado. Por otro lado, la asociación de empresas con técnicos de la UFPI consiguieron crear métodos que utilizan otros productos y logran resultados eficaces para ser utilizados como fuente energética.

A través del estudio de la cadena agroindustrial de ricino para la producción de biodiesel, se propone describir sus eslabones, volumen producido, productividad y tecnología. Otro objetivo es discutir el papel social de este cultivo abordando su importancia, y las fallas del proyecto gubernamental para la producción familiar de semillas oleaginosas, de manera de establecer una relación final entre las barreras y oportunidades del cultivo de ricino para la producción de biodiesel.

Metodología

El principal método de investigación utilizado fue el exploratorio, donde hubo un levantamiento de datos y mediante la investigación cualitativa se pudo establecer la relación entre los datos numéricos y su posible influencia en la esfera política, social y económica.

El estudio del ricino para biodiesel es un tema relativamente reciente. La integración entre los datos de ricino y el biodiesel es una práctica común, pero hay diferencias entre sus prácticas. Muchos estudios aplican la técnica de interconectar la cadena a la energía, porque su importancia es mayor en este requisito. Varios estudios realizados sobre el tema consideran similares las opiniones políticas y económicas sobre el asunto.

Hay muchas líneas de investigaciones sobre el tema principalmente económico y social. No hay limitaciones

para el estudio de esta área por ser rentable y tener siempre nuevos descubrimientos, sobre todo por el contexto global energético. En el presente trabajo, considerase imprescindible el análisis de los dos estudios, tanto cualitativo como cuantitativo.

Dentro de los objetivos de este trabajo, está la contextualización y caracterización de la cadena de ricino, así como una evaluación de su tendencia para el futuro. En la integración de los datos se optó por una abordaje tanto social cuanto política, revelando las mejores opiniones sustentadas.

Resultados

El gobierno puso en marcha un programa de incentivos para el plantío de ricino, pero la población no está segura en cuanto el mismo, sobre todo una vez que acreditase que *Jatropha Curcas* es la principal alternativa del ricino. Para este proyecto, la especie biológica en discusión es de gran importancia, pero no es una prioridad para la producción de biodiesel.

Hay una gran inestabilidad en los precios, poca inversión privada en las fábricas, un exceso de oferta y la concurrencia con otras semillas oleaginosas. A pesar del incentivo dado por el gobierno, el plantío es poco o nada mecanizado, donde los agricultores usan semillas comunes, cosecha manual debido a la maduración no uniforme y no utilizan insumos modernos, como fertilizantes y agrotóxicos. El problema para los productores es la venta abajo del precio de coste para las empresas, además de la cuestión de los intermediarios, donde se encuentran la mayor parte del costo agregado para el productor (DIAS, 2013).

Buscando mejorar la calidad de la producción de las familias que participan en el programa de agricultura familiar del gobierno, se están implementando políticas que buscan diversificar y agregar valor a la producción de estas familias. Un ejemplo es la asociación del cultivo de gusanos de seda. Las hojas del ricino alimentan a la mariposa que produce un capullo de seda, lo que permite una renta extra de entre R\$ 255,00 y R\$ 357,00 por hectárea, de modo integrado con la producción de ricino.

Contextualización de la cadena y producto

Política

El ricino fue elegido en varios países de la América del Sur, América Central y el Caribe, como una de las culturas agrícolas para suministro de aceite y por esa razón el tercer Congreso Brasileño de Ricino abrió espacio para la internacionalización de los intercambios de informaciones sobre las investigaciones agropecuarias en este campo.

Según investigaciones de la Embrapa Algodón, debido a los altos precios alcanzados por el petróleo en los últimos tiempos, todos están buscando alternativas para sustituir a

los combustibles fósiles. Esta búsqueda es cada vez más intensa y el Brasil se ha destacado en el escenario mundial por tener desarrollado un programa exitoso de producción de etanol y por estar actualmente implementando un nuevo proyecto para producir biodiesel.

Como forma de estimular la construcción de plantas de biodiesel, el gobierno estableció las subastas reguladas por la Agencia Nacional de Petróleo (ANP) para la venta anticipada a precios Free on Board (FOB) de la producción planeada de las plantas a la Petrobras. Como condición de participación de las plantas en las subastas se estipuló el fomento y la adquisición de materias primas procedentes de la agricultura familiar en porcentajes diferentes según la región de actuación. Las plantas con proyectos de fomento y adquisición de materia prima familiar aprobados por el Ministerio de Desarrollo Agrario (MDA) reciben el “Sello Combustible Social” y son beneficiadas de la exención de tributos sobre el PIS (Programa de Integración Social) y COFINS (Contribución para el Financiamiento de la Seguridad Social) en la venta de biodiesel (BERMAN, 2011).

La introducción del biodiesel como matriz energética brasileña ocurrió en Enero de 2005, mediante la ley 11.097 y estableció un porcentaje mínimo de mezcla de biodiesel con diesel mineral. Para el período de 2005 a 2007, se autorizó la adición de 2% de biodiesel. A partir de 2008, el porcentaje de 2% se torna obligatorio, siendo autorizada la adición de 5% y a partir de 2013 este porcentaje se vuelve obligatorio (BARNOSA, 2010).

El Sello Combustible Social es concedido por el Ministerio del Desarrollo Agrario a los productores de biodiesel que promuevan la inclusión social y el desarrollo regional mediante la generación de empleo y renta para los agricultores familiares que participan del PRONAF (Programa Nacional de Fortalecimiento da Agricultura Familiar). Con este sello, el productor de biodiesel tiene derecho a alícuotas de PIS/Pasep y Cofins con coeficientes de reducción diferenciados y acceso a mejores condiciones de financiación con las entidades financieras que poseen condiciones especiales de financiación para proyectos con el Sello Combustible Social.

El productor debe establecer contratos que contienen el plazo contractual, el valor de la compra y los criterios de reajuste del precio contratado, las condiciones de entrega de las materias primas y la identificación y concordancia de la representación de los agricultores que participaron en las negociaciones y todavía deben asegurar la asistencia y capacitación técnica de los agricultores familiares. Para que las plantas alcancen los beneficios del Sello Combustible Social, la agricultura familiar deberá producir 560 mil toneladas de ricino, un número mucho más grande de que la producción brasileña de ricino de 2007, estimada en 93,7 mil toneladas por la Conab.

El porcentaje de materia prima oriunda de la producción familiar de los diferentes estados se distribuye de la siguiente manera: Semiárido y Nordeste con 50%, Sudeste

y Sur con 30% y el Norte con 10%.

Aunque el gobierno establezca proyectos e intervenciones para la aceptación del biodiesel en el mercado nacional, la situación ha tomado algunos rumbos preocupantes. Las únicas materias primas que no poseen un mercado ya establecido en la cual su demanda compite con el biodiesel son la grasa animal, la soja y la semilla de algodón. Otras culturas presentan concomitantemente al mercado de biodiesel utilidades alimenticias, farmacéuticas, cosméticas y otras, lo que hace con que el precio se torne oscilante y sea una actividad de alto riesgo (Tabla 1).

Tabla 1: Características de las principales oleaginosas para la producción de biodiesel.

Especie	Productividad tonelada /ha	% de aceite	Ciclo de vida	Rendimiento (tonelada aceite/ha)
Dendê (Palma)	15 a 25	20	Perene	3 a 6
Girasol	1,5 a 2	34 a 48	Anual	0,5 a 0,9
Ricino	0,5 a 2	43 a 45	Anual	0,22 a 0,9
Maní	1,50 a 2	40 a 43	Anual	0,6 a 0,8
Haba de Soja	2 a 3	17	Anual	0,2 a 0,4
Algodón	0,86 a 1,4	15	Anual	0,1 a 0,2
<i>Jatropha Curcas</i>	2 a 12	50 a 52	Perene	1 a 6

Fuente: Adaptado de Meireles, F.S. (2003).

Económica

El mayor productor mundial de ricino y también de su aceite, es la India, seguida por China y Brasil, conforme se muestra en la Tabla 2. La región con la mayor producción en Brasil es la región nordeste, debido a su adaptabilidad a las condiciones de cultivo, y el segundo mayor productor es la región Sudeste, en que se cultiva con fines cosméticos y no para la producción de biodiesel (Tabla 3).

Tabla 2: Producción y valor de la producción de ricino en los principales países productores.

Países	Producción (miles t)	Valor de la producción (millones de US\$)
India	1.098,0	425,2
China	190,0	73,3
Brasil	91,1	34,6
Mozambique	374,9	14,0
Paraguay	13,0	5,0

Fuente: Food and Agriculture Organization (FAO), 2009.

Tabla 3: Producción por región en Brasil de 1996 a 2006.

Cantidad producida (miles toneladas)											
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Brasil	41,3	97,4	16,7	33,4	112,5	100	76	83,7	138,7	168,8	95
Nordeste	39,5	93,8	13,1	28,1	87,4	73,4	67	75,7	126,7	154	83,3
Sudeste	1,4	1,2	1	2,9	13,4	6,7	2,7	2,3	2,5	8,9	6,5
Sur	0,1	0	0	0,1	1	1,1	0,4	0,5	1	1,1	0,7
Centro-Oeste	0,3	2,5	2,5	2,2	10,8	18,8	5,8	5,2	8,5	4,7	3,8

Fuente: Produção Agrícola Municipal - PAM/IBGE (2011).

El precio de venta de ricino es definido diariamente por el mercado y puede ser afectado por muchos factores como: la producción mundial liderada por la India; la cotización del dólar ya que la mayor parte del aceite producido es exportado; las condiciones locales como la distancia hasta la industria y los impuestos. Para evitar esta variación, el Gobierno Federal a través de la CONAB estipula un precio mínimo de venta para garantizar que el agricultor cubra por lo menos sus gastos de producción.

Social

En los últimos años, hubo un aumento significativo en relación a los productos derivados del ricino, haciendo que aumente el plantío. Esta oleaginosa puede ser utilizada para la fabricación de biodiesel, cosméticos, medicamentos, lubricantes, fabricación de colorantes, anilinas, desinfectantes, germicidas, fabricación de tintas y protectores o aislantes. Otro factor que torna la extracción del aceite de ricino de gran importancia, desde el punto de vista agropecuario e industrial, es que toda la planta puede ser aprovechada.

Los restos de la producción se pueden tornar biomasa, y pueden volver al suelo; las hojas se pueden utilizar para alimentar los gusanos de seda y, si mezclada con el forraje, puede aumentar la capacidad de producción de leche del ganado. Del tallo puede obtenerse celulosa para tejidos groseros; y de las semillas puede ser extraído el aceite. Hay más de 400 subproductos, que van desde medicamentos, tintas fungicidas y lentes de contacto.

Se cree que uno de los factores que ayudan a que el mercado de biodiesel a partir del aceite de ricino sea inviable antes a los otros cultivos, tales como soja, es la utilización del ricino para diversos fines. La demanda de su aceite es grande, tienen una vasta invocación social, por presentar diversos usos, y así los productores y los agricultores prefieren vender a los que remuneran mejor, en este caso el mercado ya establecido tiene mayores condiciones de pagar por el producto que la industria de biodiesel.

Descripción de la cadena productiva

La cadena productiva de ricino es compuesta por el productor de materia prima, pasando por diversos intermediarios hasta la industria de procesamiento. En esta industria, el aceite producido es destinado a la fabricación de derivados o a la exportación. Las etapas de la cadena de biodiesel de ricino incluyen la producción agrícola de ricino, la producción industrial de biodiesel y glicerina, destinando los subproductos a diversos otros propósitos.

En la Figura 1, las flechas representan los flujos físicos, financieros y de informaciones a lo largo de la cadena. El flujo físico (entrada, subproductos y productos) van del proveedor de materias primas hasta el consumidor final, ya

que los productores de un determinado factor económico son entradas para el próximo factor a ajuste en la cadena productiva.

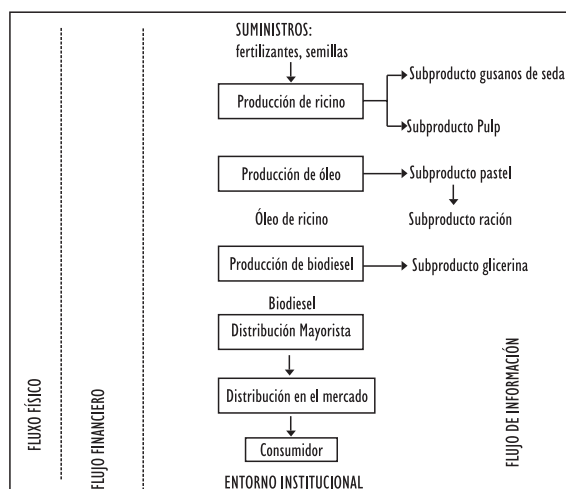


Figura 1: Diagrama de flujo físico y financiero de ricino.

Fuente: Desarrollado por los autores.

Barreras y oportunidades

A pesar del gran beneficio traído por la agricultura familiar en el plantío de ricino, el agricultor encuentra grandes dificultades para entrar en el mercado, tanto por la falta de información y tecnología, cuanto por el bajo precio pagado por las industrias de biodiesel. El productor tiene decepciones con el biodiesel de ricino, ya que el gobierno incentivó el plantío, pero las industrias de transformación no fueron implantadas en el tiempo, lo que desalentó la producción, dice Soares, investigador de Embrapa. Eso es el resultado de un mal planeamiento del Gobierno y de la concurrencia de otros cultivos de oleaginosas con el ricino en la producción de biodiesel.

Además, la alta viscosidad del aceite de ricino que fue descrito como una barrera para el uso sin ningún tipo de mezcla, ya no puede ser utilizada como un argumento. Está llegando de España un nuevo linaje de ricino que tiene el aceite con una menor viscosidad. Luego, el costo del producto debe ser reducido con el uso de la tecnología en el cultivo.

Según Soares, con la semilla mejorada, más fertilizantes y control de plagas, el aceite de ricino se vendería a un precio más favorable que otros aceites en los próximos años.

Conclusión

Llevando en cuenta que el beneficio social y el beneficio económico presentan vertientes distintas, el gran beneficio social traído por la agricultura familiar mediante el plantío de ricino para biodiesel está condenado al fracaso. A pesar de su fácil adaptación al clima semiárido nordes-

tino y favoreciendo la cosecha manual, lo que beneficia la agricultura familiar, el proyecto no tuvo éxito.

Entre los factores que contribuyeron para eso podemos citar la falta de estabilidad en los precios de venta generados por el mercado de uso de ricino para otros fines ya establecidos, lo que conduce a desalentar la plantación por el productor, y el bajo precio pagado por la producción, resultado de la retención de lucros de los intermediarios.

Es un hecho que las oleaginosas como la soja son más rentables, pero mismo cuando favorece las culturas que incluyen regiones de climas desfavorables, el ricino pierde junto a la *Jatropha Curcas*, que incluso sin muchos estudios al respecto se muestra una gran potencia productiva para el semiárido.

Una posible salida para esta situación fue intentar aumentar la rentabilidad de ricino asociando otras culturas a su plantación y utilizando toda la planta, no sólo la semilla para la extracción del aceite. Asimismo, la falta de tecnología y apoyo a los agricultores hizo que la producción fuese perdiendo cualidad y productividad, haciendo al agricultor procurar otros cultivos para su subsistencia.

Luego, se concluye que a pesar de la gran importancia en la producción de ricino para el Brasil y el mundo, este producto no presenta el perfil ideal para la producción de biodiesel sin un mejor planeamiento en el proyecto de agricultura familiar y las políticas más consolidadas que vienen del gobierno para la producción de ricino para biodiesel tiende a perder cada vez más espacio en el mercado, siendo gradualmente reemplazados por nuevas culturas.

Referencias

1. Arruda, João Bosco Furtado. MENDES, Ricardo de Albuquerque. *Diagnóstico Logístico da cadeia produtiva do biodiesel da mamona (CP/BDMA): O Caso do Ceará*. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/DiagnosticoLogistico.pdf>>.
2. Barbosa, D. C.; Serra, T. M.; Meneghetti, S. M. P.; Meneghetti, M. R. *Biodiesel production by ethanolysis of mixed castor and soybean oils*. Fuel. v. 89, nº 12, Dez. 2010.
3. Berman, P.; Nizri, S.; Wiesman, Z. *Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel*. Biomass and Bioenergy. v. 35, nº 7, Jul. 2011.
4. César, A. S.; Batalha, M. O. *Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality*, Energy Policy, v. 38, nº 8, Ago. 2010.
5. Dias, J.m.; Araújo, J.m.; Costa, J.f.; Alvim-Ferraz, M.c.m.; Almeida, M.f. *Biodiesel production from raw castor oil*. Energy, v. 53, nº 1 Mai. 2013.
6. EMBRAPA. *Oleaginosa mamona disponível em*: <<http://www.consultbio.com.br/mamona.htm>>.
7. *Generalidades da Mamona. Disponível em*: Acesso em: 05 setembro 2008. Disponível em <<http://www.criareplantar.com.br/agricultura/mamona/mamona.php?tipoConteudo=texto&idConteudo=1348>>.
8. Lima, Samuel. *Mamona como Alternativa de Produção no Tocantins*. Jornal do Tocantins, Tocantins, 6 dezembro. 2004. Página Rural. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.php?id=7403>.
9. Mamona x pinhão Manso. Disponível em <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/mamona-ou-pinhao-manso.htm>>.
10. Moura, Carla V. R. *Biocombustível do Piauí - a energia que vem da mamona*. Universidade Federal do Piauí, março 2005. Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/docs/PI_Biocombustivel.pdf>. Acessado em: 10 setembro 2008.
11. *O bicho-da-seda agregará valor ao cultivo da mamona e possibilitará mais lucro para os agricultores*. Diário do Nordeste, Fortaleza, 15 dezembro 2004. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/san/bicho.htm>>.
12. PETROBRAS. *Mantém produção de biodiesel de mamona*. Disponível em: <http://g1.globo.com/Noticias/Economia_Negocios/0,,MUL709329-9356,00.html>.
13. Severino, Antônio Joaquim. *Metodologia do Trabalho Científico*. 22. ed. São Paulo: Cortez, 2007. 335 p.

Recibido: 09/07/2013

Aprobado: 03/10/2013

Caracterización de desechos de fundición arqueológicos: la metalurgia colonial en Fundiciones 2, Rinconada, Jujuy

Characterization of archaeological slag: the colonial metallurgy of Fundiciones 2, Rinconada, Jujuy

Trabajo presentado en el 13° Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2013

M. Florencia Becerra^{1,*}, Nicolás Nieva², Carlos I. Angiorama¹

1- Instituto Superior de Estudios Sociales (CONICET) - Instituto de Arqueología y Museo, Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, San Martín 1545, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

2- Laboratorio de Física del Sólido, Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, Universidad Nacional de Tucumán, Avenida Independencia 1800, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

* E-mail: florenciabecerra@gmail.com

Resumen

Fundiciones 2, Rinconada, Jujuy, instalación metalúrgica probablemente de finales del siglo XVIII, consta de dos recintos adosados, un refugio techado y cinco hornos de reverbero, tres de los cuales se encuentran dentro de un tercer recinto. Se presentan los resultados de los estudios microscópicos y de caracterización química de los desechos de fundición recuperados allí, para dar a conocer la naturaleza de la carga mineral y las condiciones de los procesos metalúrgicos desarrollados.

La metodología consistió en la observación y análisis mediante microscopio óptico, microscopio electrónico de barrido (MEB con espectrometría de energía dispersiva de rayos X EDRX) y microsonda analítica de electrones (MAE con espectrometría dispersiva de longitud de onda EDLO) de escorias metalúrgicas recuperadas en la excavación de dos hornos y dos recintos. Estos resultados, junto a la información contextual, permiten comprender el funcionamiento de esta instalación y aproximarnos a la tecnología de la metalurgia extractiva de minerales de plomo y plata durante el período colonial en la región.

Palabras clave: Escorias; Metalurgia; Hornos de fundición; Período colonial; Arqueología.

Abstract

Fundiciones 2, Rinconada, Jujuy, a metallurgical facility in operation probably since the late eighteenth century, consists of two attached rooms, a roofed shelter and five reverberatory furnaces, three of them are inside another structure. This paper presents the results of microscopic studies and chemical characterization of slag samples recovered there, to further the understanding of the nature of the smelted minerals and the conditions of metallurgical processes developed.

The methodology employed was observation and analysis by means of optical microscope, scanning electron microscope (SEM with energy dispersive spectrometry EDS) and electron microprobe microanalysis (EPMA with wave-length dispersive spectrometry WDS) of metallurgical slag recovered during the excavation of two furnaces and two enclosures. These results, and the contextual information, help to understand the operation of this facility and to explore the technology used in extractive metallurgy of lead and silver ores during the colonial period in the region.

Keywords: Slag; Metallurgy; Foundry Furnaces; Colonial Period; Archaeology.

Introducción

Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto de investigación mayor centrado en el análisis de las prácticas minero-metalúrgicas desarrolladas en la llamada Puna de

Jujuy durante momentos prehispánicos y coloniales. En esta oportunidad se presentan los primeros resultados obtenidos mediante un estudio sistemático de la instalación metalúrgica de Fundiciones 2, un complejo metalúrgico probablemente construido durante la segunda mitad del



Figura 1: Vista general del complejo Fundiciones 2.



Figura 2: Vista del recinto que alberga tres hornos de reverbero (de arriba hacia abajo, hornos 1 a 3).

siglo XVIII. Éste se encuentra a unos pocos kilómetros de Santo Domingo, localidad fundada durante la colonia a partir de la explotación aurífera del área. Asimismo, se localiza a unos 2,5km en línea recta de un rico yacimiento de plomo, plata y zinc, conocido como Mina Chinchillas, al lado del cual se ha identificado otro complejo de hornos de reverbero, Fundiciones 1, que hemos estudiado en profundidad en otra oportunidad [1, 2].

Fundiciones 2 presenta ciertas particularidades que la diferencian del resto de los complejos registrados arqueológicamente en la región de la Puna de Jujuy. La misma consta de dos recintos adosados, un refugio techado y cinco hornos de tipo reverbero, tres de los cuales se encuentran dentro de una estructura construida especialmente para albergarlos. Ésta es de planta rectangular (14m x 3m) y de 2m de altura y posee en uno de sus muros siete vanos

rectangulares con dintel: tres menores (anchos y bajos), en el lugar donde se encuentra la caja de fuego de cada uno de los hornos, y cuatro mayores (altos y angostos), intercalados con los anteriores. En el lado opuesto se observan tres vanos que coinciden con las chimeneas de dichos hornos. Por último, en uno de los muros laterales del recinto se localiza otro vano, orientado hacia donde se encuentra el cuarto horno, externo, con una bóveda de 2m de diámetro interior. Presenta tres orificios de respiración en uno de sus laterales mientras que en el otro se encuentra derrumbado. A 8 metros de éste, se halla el quinto horno, de reducidas dimensiones (la bóveda presenta menos de 80 cm de diámetro externo) (Figuras 1 y 2).

Además de la disposición de los distintos hornos (interior y exterior de la estructura) y de las diferentes dimensiones y número de orificios de respiración, se ha observado que las paredes internas de las bóvedas de los tres hornos internos presentan vitrificación de color amarilla, mientras que en el cuarto horno, externo, la misma es de un verde oscuro, recubriendo también parte del suelo. En el caso del quinto, en éste no se identifica este tipo de alteración, con excepción de las paredes internas de la chimenea. La diversidad observada entre los distintos hornos nos ha llevado a suponer el empleo de los mismos para etapas diferentes en el proceso metalúrgico.

Para el estudio de esta instalación se realizó un registro minucioso de la arquitectura y estructuras de fundición identificadas. También se efectuaron recolecciones superficiales sistemáticas y sondeos en sectores seleccionados. Más allá de una gran cantidad de residuos de fundición en superficie y en excavación, no se registró otro tipo de material cultural (cerámica, lítico, óseo, vidrio, etc.). Dadas las posibilidades que brindan los estudios de caracterización de escorias metalúrgicas para la comprensión de los procesos técnicos desarrollados en instalaciones arqueológicas semejantes [3, 4, 5], se decidió continuar el estudio de Fundiciones 2 a partir del análisis de dichos residuos.

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados

obtenidos mediante estudios microscópicos y de caracterización química de una muestra seleccionada de las escorias recuperadas en este sitio, de modo tal de conocer la naturaleza de la carga mineral y las condiciones de los procesos metalúrgicos desarrollados, permitiéndonos de este modo alcanzar una mejor comprensión acerca del funcionamiento de Fundiciones 2.

Materiales y Métodos

En pos de identificar qué tipo de procesos se desarrollaron en los hornos presentes en Fundiciones 2, se seleccionó en total una muestra de 42 escorias (9 provenientes del horno 1, 12 del horno 4, 9 del recinto 1, 8 del recinto 2 y 4 de recolección superficial en el espacio entre recintos). Las mismas fueron preparadas para su observación microscópica mediante su inclusión en acrílico, desbaste y pulido con pulidora metalográfica (PRAZIS PUL 01). Para ello, se utilizaron papeles abrasivos de distinta granulometría (desde 220 hasta 1200) y paños con pasta de diamante (hasta 1 micrómetro). Las probetas fueron observadas, en primera instancia, en un microscopio óptico (MO) metalográfico de reflexión Olympus BX-60M. En ningún caso se procedió a atacar químicamente las superficies de las probetas obtenidas.

En base al estudio de las micrografías del total de la muestra, se seleccionaron seis probetas (tres de cada tipo de horno –M1, M3 y M5 de horno 1; M9, M10 y M37 de horno 4–) para ser analizadas mediante microscopio electrónico de barrido (MEB). Para ello, las probetas fueron grafitadas. En las fases detectadas de las distintas microestructuras se realizaron análisis cuali-cuantitativos, de modo preliminar, por espectrometría de energía dispersiva de rayos X (EDRX) y luego se procedió a efectuar mediciones puntuales y mapas de composición por microsonda analítica de electrones, MAE, con espectrometría dispersiva de longitud de onda, EDLO (JEOL Modelo JXA 8230). Los análisis fueron realizados en el LAMARX, Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba. La interpretación de los datos se realizó fase por fase identificada en cada probeta y sobre la base de la bibliografía de estudios arqueométricos similares [3, 6, 7], de tratados de mineralogía y de interconsultas con especialistas.

Resultados

Microscopia óptica

La observación del total de la muestra bajo microscopio óptico permitió obtener un primer panorama de las características generales de las escorias. Aquéllas provenientes de los hornos 1 y 4, a diferencia de lo presupuesto en base a sus dimensiones, localización y características generales, mostraban grandes similitudes entre sí.

En líneas generales, se distingue un patrón semejante en todas las probetas, las cuales se componen de una matriz vítrea predominante, homogénea. Solo en casos puntuales las matrices resultan más complejas. Se detectan tres tipos de inclusiones: unas alargadas oscuras, opacas y dispersas, otras circulares de aspecto metálico y un tercer tipo, brillantes irregulares o circulares también, que en la mayoría de los casos presenta una fase intermedia, de tonalidad gris, rodeando el borde de grano. En algunas, además, se observan pits de clivaje, de forma triangular (Figuras 3 y 4).

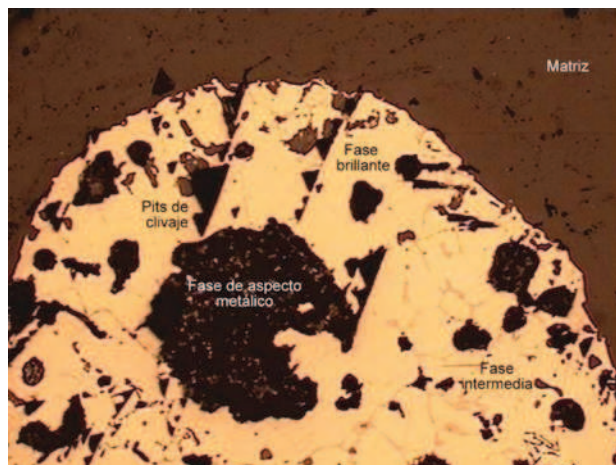


Figura 3: Detalle de las fases presentes en la probeta M10 proveniente del horno 4: matriz, inclusión brillante, fase intermedia y fase de aspecto metálico. También se observan los pits de clivaje. MO, 25x.

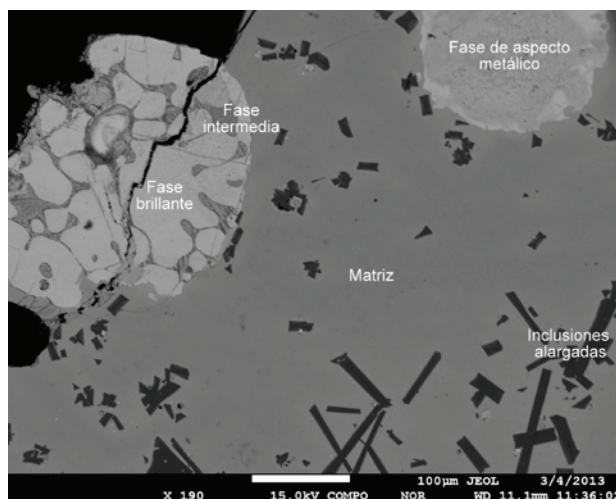


Figura 4: Detalle de las fases presentes en la probeta M1. Micrografía MEB, 190x.

Composición cuali-cuantitativa

Como se ha mencionado, en base a las observaciones preliminares, se seleccionaron seis probetas para efectuar análisis cuali-cuantitativos y caracterizar las fases identificadas mediante MAE.

Las matrices de las escorias, no importa su asociación a los hornos, presentan todas una composición muy seme-

Tabla 1: Composición en porcentaje en peso (%w) de las matrices de cinco probetas, en los distintos puntos medidos en cada probeta.

Pbta	Punto	Na ₂ O	MgO	SiO ₂	Al ₂ O ₃	As ₂ O ₅	PbO	SO ₃	CuO	ZnO	Sb ₂ O ₅	FeO	K ₂ O	CaO
M1	1	0,39	0,87	19,74	3,92	0,06	57,82	4,34	0,04	1,60	1,20	4,43	1,41	4,45
M3	1	0,35	0,80	18,68	3,98	-	59,75	0,43	0,01	1,72	1,26	4,49	1,41	4,28
	2	0,33	0,74	17,75	3,70	-	62,68	0,46	0,05	1,69	1,21	4,12	1,31	4,14
	3	0,37	0,83	19,01	3,95	0,06	59,29	0,36	0,02	1,39	1,26	4,39	1,47	4,38
M5	1	0,35	0,61	19,76	3,72	0,04	59,76	0,39	-	1,46	1,07	4,19	1,32	2,50
	2	0,30	0,77	20,75	3,72	0,01	62,21	0,35	0,08	1,59	1,12	4,03	1,30	3,43
M9	1	0,42	1,42	21,84	3,72	0,07	58,26	0,15	-	6,20	0,91	4,28	0,44	1,65
	2	0,47	0,53	24,45	6,23	-	61,35	0,04	0,01	1,90	1,38	3,80	0,70	1,15
M10	1	0,57	1,55	28,81	4,87	-	47,58	0,38	0,06	4,45	0,99	3,26	1,52	5,83
	2	0,53	1,60	28,36	4,92	-	47,17	0,35	0,18	4,63	0,95	3,32	1,55	6,25
	3	0,54	1,53	28,41	4,84	-	47,56	0,51	0,11	4,58	0,95	3,29	1,53	5,94

Tabla 2: Composición de la fase brillante, circular o irregular, en porcentaje en peso (%w), en distintos puntos de las seis probetas.

Pbta	Punto	S	Pb	As	Sn	Si	Cu	Zn	Ag	Sb	Fe	Al
M1	1	13,98	84,41	-	-	-	2,49	-	0,08	-	-	-
	2	13,94	83,42	-	0,02	-	4,47	-	0,07	0,06	0,05	-
M3	1	13,52	84,16	-	-	-	1,38	-	0,34	-	-	0,01
	2	13,23	85,28	-	-	-	1,17	0,04	0,24	-	0,01	-
	3	13,85	81,81	-	-	0,01	5,57	0,08	0,34	-	-	-
M5	1	13,28	84,51	0,03	-	-	0,66	-	-	0,02	-	0,01
	2	12,94	85,22	0,02	0,03	-	0,60	-	0,02	0,03	-	-
	3	13,29	85,29	-	-	-	0,43	-	-	-	0,04	-
M9	1	13,41	86,98	0,05	-	0,01	0,74	0,02	-	-	-	-
	2	13,78	85,86	-	-	-	1,25	0,09	0,05	-	-	0,01
	3	13,73	80,10	-	-	-	4,88	0,02	0,06	0,03	-	-
M10	1	13,55	88,25	-	-	0,01	0,54	-	0,11	-	-	-
M37	1	5,97	60,50	-	0,02	0,01	1,24	-	0,08	-	0,40	-
	2	6,13	60,38	-	0,09	0,04	1,22	-	0,22	-	0,35	-

jante: entre 18 a 24%w de SiO₂ y un promedio de 56%w de PbO (Tabla 1). Se observa una composición constante de Al₂O₃ entre 4 y 6%w. La probeta M10 varía un poco más que las demás, con mayor porcentaje de SiO₂ (llega a 28%w), de CaO y de ZnO que el resto, disminuyendo la proporción de PbO. Sin embargo, no es representativa del horno 4 (se observa que la probeta M9 es casi idéntica a las del horno 1) y se encuentra entre valores considerables de variación en escorias de este tipo de hornos.

En cuanto a las inclusiones oscuras, alargadas (Figura 4), éstas están compuestas por SiO₂ en un 35%w y CaO en un 30%w, con altos porcentajes de ZnO también. El zinc parece concentrarse en la matriz y en estas inclusiones no metálicas, mientras que en las metálicas no se lo encuentra en altas proporciones. En la fase de aspecto metálico, en cambio, se detectaron porcentajes de Pb que varían del 75 al 84%w, casi llegando al total cuantificado (sin detectar oxígeno). Por sus características, se puede hablar de una fase de PbO con bajísimos porcentajes de Cu y de Ag, aunque en la probeta M10 se detectó alrededor de 7%w de Ag.

La fase brillante circular o irregular, como se puede observar en la Tabla 2, está compuesta por sulfuro de plomo, en una proporción promedio de 14%w de S y alrededor de

85%w de Pb, con variados porcentajes de cobre y plata.

Por último, en relación a las fases intermedias, se observan dos tonalidades diferentes, que, de acuerdo con los resultados obtenidos, dependen de la cantidad de Cu presente, en una relación inversa con el contenido de Pb (en el tono más claro, el Cu varía entre 38 a 52%w, mientras que en el más oscuro va desde 40 a 81%w) (Figura 5). En cuanto a la presencia de plata en las escorias analizadas, los porcentajes detectados son considerablemente bajos, con excepción de una de las probetas, que es parte del piso vitrificado del horno n° 4 (M37). En ella, se identifica un porcentaje promedio de 10%w de Ag, llegando a un 24%w en pequeñas inclusiones, también circulares pero con fases no tan claras como las que se presentan en las otras probetas.

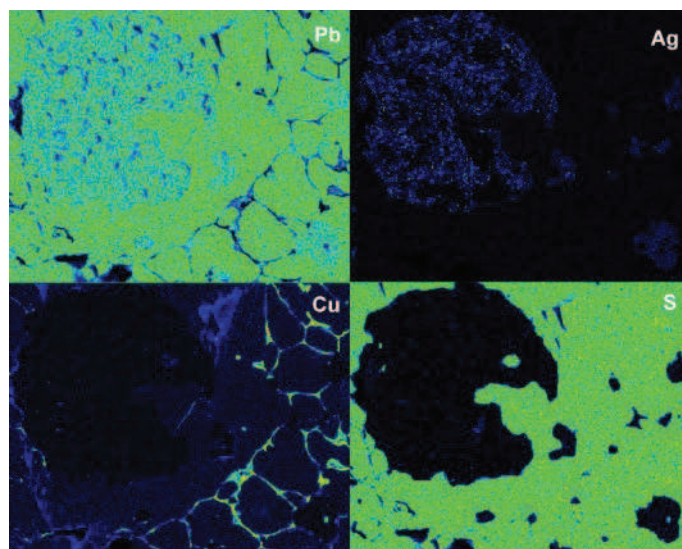


Figura 5: Mapeo de composición (a 230x) que muestra la distribución del plomo, plata, cobre y azufre en una de las inclusiones claras, con fases intermedias y fase de aspecto metálico de la muestra 10. La escala de colores fríos a cálidos indica la concentración ascendente del elemento en cuestión (azul: menor concentración; rojo: mayor concentración).

Discusión

A partir de los resultados obtenidos tanto en campo como en laboratorio se pueden establecer una serie de cuestiones sobre el funcionamiento de esta instalación. En cuanto al empleo de los hornos, los estudios microscópicos y de caracterización química de los desechos de fundición recuperados permiten afirmar que allí se efectuaba la metalurgia extractiva de minerales de plomo, cobre y plata, probablemente con el objetivo de obtener esta última.

En un esquema teórico, de acuerdo con las descripciones de la época [8, 9], en los hornos de reverbero se colocaba el mineral a fundir, -por ejemplo, galena argentífera-, en trozos, sobre el piso preparado de la bóveda, sin crisoles. En la caja de fuego se quemaba el combustible (yareta o queñoa), mientras que la llama y los otros productos de combustión se movilizaban hacia la carga mineral en la bóveda, en el trayecto a la salida por la chimenea. El calor de la bóveda se transmite así por radiación hacia la carga que queda debajo. Esto resulta claro para el horno 4, externo, en donde la bóveda presenta un piso vitrificado que ha sido extraído en parte, seguramente con intenciones de volver a fundir para obtener el metal que haya quedado atrapado (la probeta M37, extraída de este piso, es la que conserva la mayor cantidad de plata detectada) (Figura 6).

Las escorias analizadas son características de este proceso de metalurgia extractiva: los sulfuros de plomo ricos en plata al fundirse habrían liberado, en una primera etapa, el azufre en forma de S_2O , aunque, como se observa, no en su totalidad, ya que parte de la galena fundida, habría vuelto a solidificarse con su composición original (fase clara en Figura 4). El resto del plomo se habría aleado con la plata y el cobre metálico, como óxido de plomo (fase de aspecto metálico en Figura 4), mientras que gran parte de este elemento habría reaccionado con el sílice y el aluminio

de los minerales arcillosos (parte del horno, de la mena o del sedimento del piso del horno), formando la matriz vítrea rica en plomo presente en todas las escorias. A pesar de la presencia de galena re-solidificada, que indicaría ciertas fallas en la eficiencia de los procesos, es destacable que es baja la presencia de plata en todas las escorias (con excepción del piso vitrificado del horno, que habría atrapado parte del metal). El cobre por el contrario, es más abundante en las inclusiones de galena, especialmente en las fases intermedias.



Figura 6: Detalle del piso vitrificado de la bóveda del horno 4.

Por el contrario, el empleo del horno 1 resulta aun poco claro. Las escorias recuperadas durante su excavación no presentan diferencias significativas con las del horno 4, aunque el análisis detallado de la bóveda y caja de fuego, como también de su ubicación en un recinto techado, sugiere que fueron empleados para diferentes funciones. Se debe destacar, por ejemplo, que no solo hay una ausencia de piso vitrificado en la bóveda del horno 1, sino que la

excavación mostró una capa de ceniza blanquecina de 20 cm de espesor. Ante esta situación, se sugiere que las escorias analizadas, a pesar de haber sido recuperadas en excavación, hayan sido parte del sedimento de relleno que colmató el horno 1 y no desechos de la actividad desarrollada allí. En ese caso, los tres hornos dentro del recinto pudieron haber sido empleados para el proceso de refinación, en el que no se producirían este tipo de residuos. El tratado de Alonso Barba afirma que la refinación de la plata se hace también en hornos de reverberación pero de menor tamaño [9]. Bargalló [10] relata que para la copelación se prepara el piso del horno de reverbero con cenizas y caolín, bien apisonado, pero dejando cavidades pequeñas o cope-las, donde se colocaba la aleación plúmbica. La cendrada (preparación de ceniza y arcilla sobre la que se realizaba la refinación) embebía, entonces, el plomo. Según Alonso Barba, la que sólo contiene este metal es de color amarillo por dentro, mientras que la que tiene tonalidad oscura, también contiene plata y debe guardarse para refinarse de nuevo. Según los estudios etnoarqueológicos realizados por el equipo de M. Van Buren [4, 11] el proceso de copelación se realiza en hornos de reverbero pequeños, en recintos techados, lo que se asemejaría a los tres hornos hallados en Fundiciones 2. El horno 5, de pequeñas dimensiones, en el que no se encontraron escorias de fundición y que presenta también una capa de ceniza en la bóveda, habría servido para funciones semejantes. Por otra parte, la coloración indicada por Alonso Barba para la ceniza y la arcilla se asemeja a la de las paredes de los diferentes hornos.

Conclusiones

Este trabajo ha presentado los resultados obtenidos mediante el análisis composicional de una muestra acotada de las escorias de fundición recuperadas en Fundiciones 2. Aunque el estudio de esta instalación se encuentra aún en curso, el objetivo de este artículo es dar cuenta de las posibilidades que brindan este tipo de análisis en la comprensión del funcionamiento de un sitio de estas características y de las tecnologías empleadas allí.

En este sentido, a partir de las mediciones cuali-cuantitativas efectuadas se ha podido establecer que este complejo habría estado dedicado a la metalurgia extractiva de sulfuros de plomo ricos en cobre y plata, al menos en el horno de mayores dimensiones (horno 4), localizado al aire libre. Los tres hornos ubicados en el interior del recinto y el quinto, pequeño, en el exterior, en base al hallazgo de ceniza en sus bóvedas y de esmalte de las paredes como a la ausencia de pisos vitrificados, habrían sido empleados para el proceso de refinado del producto de plomo y plata obtenido en la primera etapa (horno 4). La ausencia de otro tipo de hallazgos, tales como restos de crisoles, herramientas u otra clase de elementos vinculados a la vida de los trabajadores no permite por el momento avanzar en las interpretaciones acerca de la dinámica de esta instalación.

Sin embargo, a pesar de estas limitaciones, se ha logrado alcanzar una mejor comprensión de la tecnología metalúrgica empleada y por tanto, acrecentar el conocimiento acerca de la actividad minero-metalúrgica desarrollada en la región durante el período colonial, a partir de este caso particular.

Agradecimientos

Agradecemos a la comisión organizadora de 13º Congreso SAM-CONAMET 2013 por la invitación a publicar en este volumen. Este trabajo ha sido financiado con proyectos CONICET y FONCyT.

Referencias

1. Becerra, M.F.; C. Angiorama y N. Nieva. *Estudios arqueométricos de evidencias de producción minero-metalúrgica durante época colonial en Fundiciones 1* (Departamento Rinconada, Jujuy, Argentina), Intersecciones en Antropología, Vol. 12, p. 5-16, 2011.
2. Becerra, M. F. *Cruces entre la Arqueología y la Historia. Hornos, socavones y registros: las prácticas minero-metalúrgicas coloniales en la Puna de Jujuy a través del complejo Fundiciones 1* (Rinconada, Jujuy, Argentina), Revista Población y Sociedad, Vol. 19, p. 5-39. 2012.
3. Cohen, C., T. Rehren y M. Van Buren, *An. archaeo-metallurgical study of the use of European furnaces in colonial Bolivia*, Archaeometallurgy in Europe II: p. 529-540. 2009.
4. Van Buren, M. y C. Cohen. *Technological changes in Silver Production after the Spanish Conquest in Porco*, Bolivia, Boletín del Museo Chileno de Arte Precolombino, Vol. 15, N° 2, p. 29-46. 2010.
5. Lechtman, H., P. Cruz, A. Macfarlane y S. Carter. *Procesamiento de metales durante el Horizonte Medio en el Altiplano Surandino* (Escaramayu, Pulacayo, Potosí, Bolivia). Boletín del Museo Chileno de Arte Precolombino Vol. 15-2: p. 9-27. 2010.
6. Cohen, C., T. Rehren y M. Van Buren. *La huayrachina por dentro y por fuera: un estudio arqueo-metalúrgico de la tecnología de fundición de plomo en Porco-Potosí, Bolivia*. En Mina y metalurgia en los Andes del Sur desde la época prehispánica hasta el siglo XVII, editado por P. Cruz y J. J. Vacher. Institut de Recherche pour le Développement. Instituto Francés de Estudios Andinos, Sucre. p. 29-56. 2008.
7. Goldenberg, G. *Archäometallurgische Untersuchungen zur Entwicklung des Metallhüttenwesens im Südschwarzwald*. Blei-, Silber- und Kupfergewinnung von der Frühgeschichte bis zum 19. Jahrhundert. En: Archäometallurgische Untersuchungen zum Metallhüttenwesen im Schwarzwald, compilado por G. Goldenberg, J. Otto y H. Steuer. Jan Thorbecke Verlag Sigmaringen, Alemania. p. 9-274. 1996.

8. **Cobo B.** *Historia del Nuevo Mundo*. Libro Tercero. Capítulos XXXVII, XXXVIII, XXXIX y XL. En *Relaciones Geográficas de Indias*. Tomo II. Ministerio de Fomento, Imprenta de la Real Casa. Madrid. p. CXLIV-CLVIII. [1653] 1885.
9. **Alonso Barba, A.** *Arte de los metales*. Biblioteca Boliviana N°8. Imp. Artística. La Paz. [1640] 1939.
10. **Bargalló, M.** *La minería y la metalurgia en la América española durante la época colonial*. Fondo de Cultura Económica, México. 1955.
11. **Van Buren, M. y B. Mills.** *Traditional smelting technology of the Southern Andes*, *Latin American Antiquity*, Vol. 16, N° 1, p. 3-25. 2005.

Recibido: 28/10/2013

Aprobado: 14/12/2013

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 16 / N° 21 / 2014 / 65–69

Estudio de la morfología y calidad cristalina de ZnSe monocristalino

Morphology and crystalline quality assessment of single crystalline ZnSe

Trabajo presentado en el 13° Congreso Internacional de Metalurgia y Materiales, SAM-CONAMET 2013

Javier L. M. Nuñez García^{1,2}, Adriano Geraci³, Alfredo Tolley³, María Cristina Di Stefano², Edgardo Cabanillas⁴, Ana María Martínez⁵, Raúl D'Elía¹, Eduardo Heredia¹, Alicia B. Trigubo^{1,2,*}

1- CINSO-UNIDEF, Juan Bautista de La Salle 4397, B1603ALO Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

2- FRBA-UTN, Medrano 951, C1179AAQ, CABA, Argentina.

3- CNEA-CAB, San Carlos de Bariloche, R8402AGP Provincia de Río Negro, Argentina.

4- Instituto Sabato, UNSAM-CNEA, Av. G. Paz 1499 (B1650KNA) San Martín, Buenos Aires, Argentina.

5- CEDIT- CeDITec (Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica), Posadas, Misiones, Argentina.

* E-mail: atrigubo@citedef.gob.ar

Resumen

Se estudia la calidad cristalina de una oblea comercial monocristalina de ZnSe (Cradley Crystals) combinando diferentes técnicas. Se utiliza microscopía óptica para la observación de defectos macroscópicos y figuras de corrosión obtenidas por revelado químico de la misma y microscopía electrónica de transmisión para determinar su calidad estructural, también se evalúa su transmitancia óptica por su aplicación en ventanas infrarrojas. Una presencia pequeña de defectos macroscópicos, un orden estructural notable entre dislocaciones y la baja densidad de dislocaciones y desorientación angular halladas entre subgranos adyacentes confirman una adecuada calidad cristalina para el empleo de este material en dispositivos optoelectrónicos.

Palabras clave: ZnSe; MET; Espectroscopia infrarroja de Fourier; Revelado químico.

Abstract

This project involves the study of the crystalline quality of a single crystalline commercial wafer of ZnSe (Cradley Crystals) combining different techniques. We use optical microscopy for the observation of macroscopic defects and etching figures which were obtained by chemical etching and transmission electron microscopy to determine the structural quality of the sample. We also measure the optical transmittance of the wafer due to its application as infrared window. The results show low presence of macroscopic defects, remarkable structural order between dislocations and small values of dislocation density and angular misorientation between adjacent subgrains. This confirms an adequate crystalline quality of the material as required for optoelectronic devices.

Keywords: ZnSe; TEM; FTIR; Chemical etching.

Introducción

Los semiconductores II-VI basados en ZnSe son esenciales para la fabricación de diodos láser en el rango azul-verde del espectro, dado su ancho de banda prohibida (2.715 eV a 300 K). Estos materiales encontrarán en el futuro aplicación inmediata en dispositivos ópticos, con la consecuente demanda de materiales de alta calidad, dado que los detectores y dispositivos ópticos que se elaboran dependen críticamente de las propiedades del mismo [1, 2].

Con el objetivo posterior de comparar el material comercial con el obtenido en nuestro laboratorio, se evalúa

y presenta la calidad cristalina de una oblea comercial monocristalina de ZnSe, adquirida en Cradley Crystals, combinando diferentes técnicas. También se estudia su transmitancia óptica por su posible aplicación en ventanas infrarrojas. La observación de los defectos macroscópicos y de la superficie de la oblea revelada químicamente se efectúa por microscopía óptica determinando en este último caso la densidad de dislocaciones y la desorientación entre subgranos adyacentes mediante el uso de la aproximación de Shockley-Read. La estructura cristalina se estudia por microscopía electrónica de transmisión (MET) en muestras obtenidas por combinación de desbastado mecánico y adelgazamiento iónico.

Procedimiento experimental / Metodología

En la Figura 1 se observa una oblea de ZnSe comercial (Cradley Crystals) en la orientación (110) material obtenido por el método de Bridgman de alta presión (HPB). Se verificó su orientación cristalina por difracción de rayos x (Técnica de Laue) utilizando un difractómetro Phillips con radiación Cu K α .

La oblea fue adquirida con un pulido mecánico (Figura 2) que no afecta la transmisión óptica del material (Figura 3) dado que dicho espectro (en rojo) es comparable a los obtenidos cuando se efectuaron pruebas de pulido en el laboratorio (UNIDEF) en la misma oblea con alúmina alfa de 1 μm libre de aglomerados (LECO Corporation) para longitudes de onda en el infrarrojo cercano ($0,75 \mu\text{m} \leq \lambda \leq 3 \mu\text{m}$).

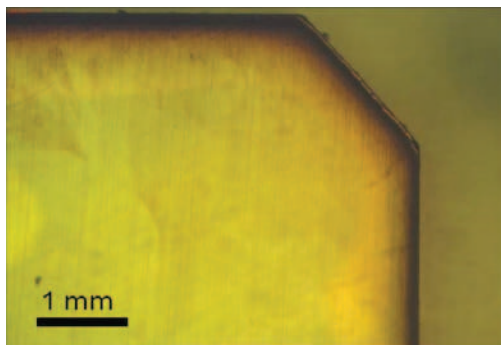


Figura 1: Sustrato comercial (Cradley Crystals).

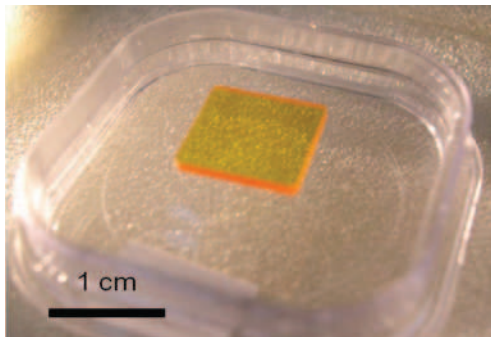


Figura 2: Pulido mecánico.

La transmisión óptica fue medida con un equipo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Perking-Elmer System 2000). La medición se realizó entre $1 \mu\text{m} \leq \lambda \leq 25 \mu\text{m}$ interponiendo la muestra al haz de emisión infrarroja generada por el equipo mencionado con exposición al aire, por lo que aparecen en el espectro los picos de absorción típicos del agua y CO₂. Se comparó el espectro obtenido de esta oblea con el que muestra la empresa Cradley Crystals en <http://www.cradley-crystals.com/> [Figura 3].

Para el estudio por microscopía óptica de los defectos macroscópicos en la oblea, se utilizó una lupa Nikon [Figura 4]. No se ha observado la presencia de poros, pero sí de planos cristalinos que limitan volúmenes pequeños contenidos en el espesor de la oblea manteniéndose la homogeneidad en el material y en el color alrededor de los mismos.

En la Figura 5, obtenida con un microscopio meta-

lográfico (Union Versamet 5279), se puede observar la distribución de las figuras de corrosión que corresponden al revelado químico de esa oblea efectuada con la solución de KMnO₄ en H₂SO₄. La elección se realizó de acuerdo a la información hallada en [3] y por mostrar una reactividad levemente mayor respecto de otras allí indicadas sin producir el sobrerivelado en el material. Las referencias [4-6] demuestran su aplicabilidad a este material.

Se realizaron observaciones de la estructura cristalina del ZnSe comercial por microscopía electrónica de transmisión (MET) [Figuras 6-7] mediante un microscopio Philips CM200 UT con filamento de LaB₆, operado a 200 kV. Se obtuvieron láminas delgadas para su observación combinando el desbastado mecánico, utilizando un trípode SBT 590, y el adelgazamiento iónico, con un equipo GATAN PIPS 691, operado a energías menores que 4 keV. Las imágenes de baja y alta resolución se obtuvieron con una cámara de la firma Olympus -SIS, model Keen View de 1,3 k x 1 k pixels, a una tensión de operación de 200 kV. El principal objetivo de la utilización de diferentes instrumentos es la detección de defectos en dicho material a escalas micrométricas y/o nanométricas.

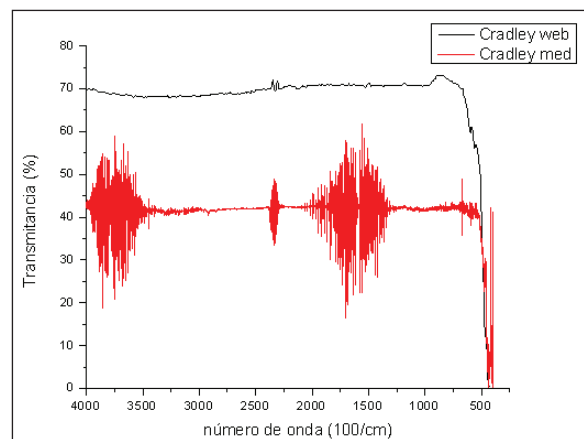
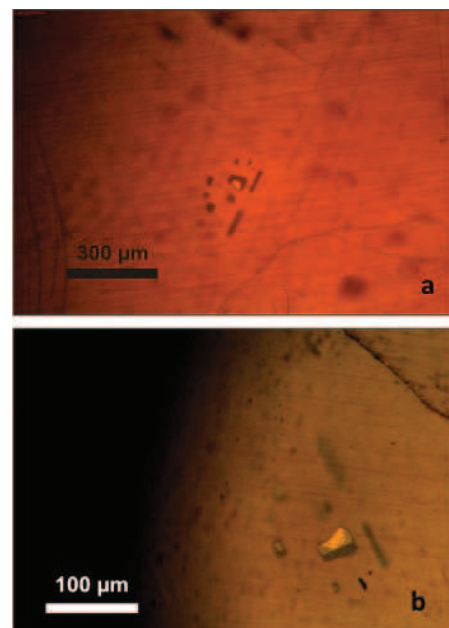


Figura 3: Transmisión óptica del sustrato adquirido y el que figura en la página web de Cradley Crystals.



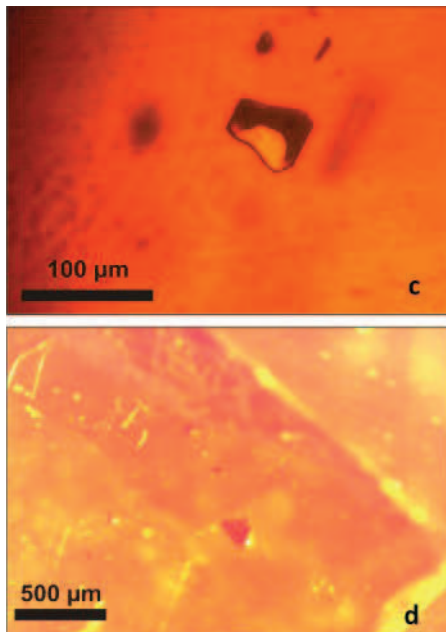


Figura 4: a, b y c muestran un mismo grupo de cristales incluidos con magnificaciones diferentes. En d puede observarse un cristal incluido en otra zona de la oblea.

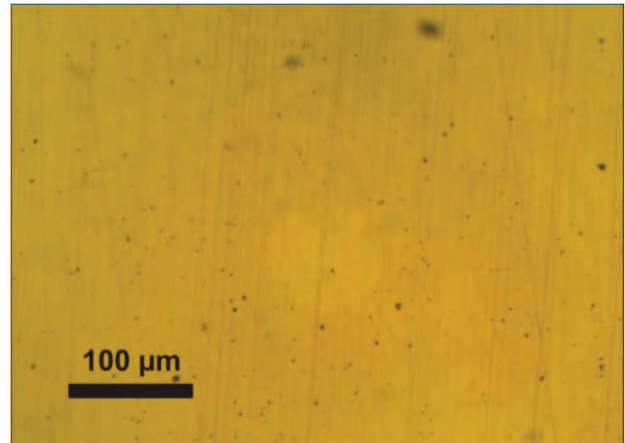


Figura 5: Figuras de corrosión obtenidas por revelado químico de la oblea.

Resultados y Discusión

La Trasmisión Óptica del ZnSe comercial muestra valores del 42% en la oblea adquirida para su estudio frente al 70% que figura en la página web de la empresa Cradley Crystal, Inc [Figura 3]. La presencia de defectos cristalinos macroscópicos [Figura 4], como también dislocaciones [Figura 5] y maclas [Figura 7] explica la diferencia en los valores de esta magnitud entre los distintos materiales. Este

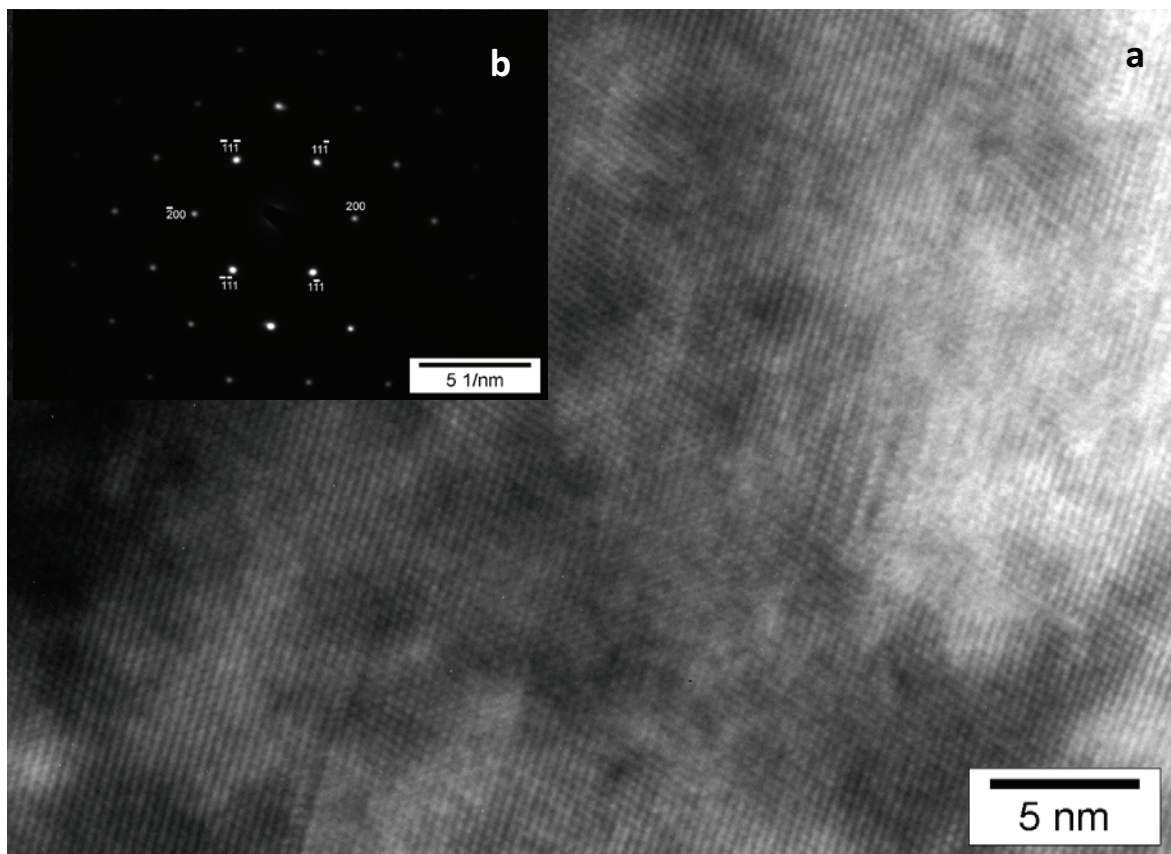
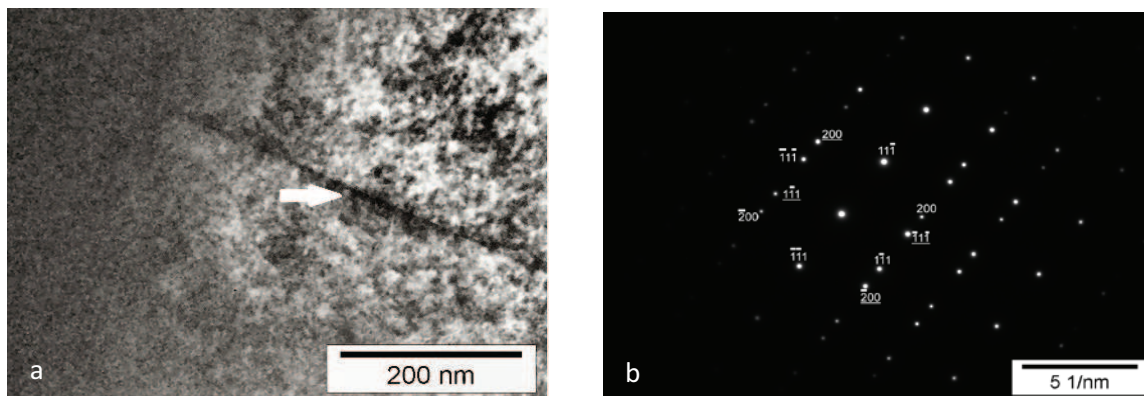


Figura 6: a) Imagen de alta resolución con eje de zona [001]. b) Diagrama de difracción de electrones por transmisión en la misma región según eje de zona [001].

Figura 7: a) Micrografía donde se observa la presencia de una macla. b) Diagrama de difracción de electrones por transmisión en la misma región según eje de zona [011] con una de las reflexiones de tipo [111].



resultado indica que la empresa obtiene lingotes monocristalinos con defectos cristalinos cuya densidad es variable, si bien en esta oblea tanto cristales incluidos como dislocaciones tienen una presencia pequeña. Por otra parte, ambos espectros decaen notoriamente hacia los 22 μm , aunque en nuestro caso las curvas espectrales muestran oscilaciones indeseables en las longitudes de onda de absorción del agua y del CO_2 provenientes del cálculo interno que realiza el programa de FTIR, dado que en esas bandas de absorción el error de medición aumenta al dividir por valores de señal muy pequeños. Es posible que el espectro de FTIR de la empresa comercial no presente las oscilaciones por tomarse con atmósfera controlada.

El valor de la densidad promedio de dislocaciones, calculada efectuando el conteo sobre las micrografías tomadas sobre toda la superficie de la oblea, es de $\delta_{\perp} = 4,4 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-2}$ y la desorientación angular promedio entre subgranos contiguos, determinada utilizando la aproximación de Schokley-Read [7], es de $\phi = 4''$. Estos valores son semejantes y comparables con los registrados en la bibliografía [4, 5, 8].

La imagen de alta resolución y el diagrama de difracción de electrones correspondiente a la misma región en la Figura 6 se obtuvieron según el eje de zona [001]. La alta resolución se empleó en este caso para determinar, a orden local, la existencia de dislocaciones, ya que el análisis por resolución media y baja muestra un mayor promedio de área analizada. No sólo no se observan dislocaciones a nivel nanométrico sino que también se ha determinado un excelente orden estructural entre dislocaciones [Figura 5].

En la micrografía de la Figura 7 se observa lo que aparentemente es un borde de grano. Pero el diagrama de difracción correspondiente a la misma zona descarta esta hipótesis dado que la disposición de puntos es de una macla, con eje de zona [011], siendo una de las reflexiones de tipo [111].

En ninguna de las muestras de ZnSe estudiadas por MET se observó dislocaciones, ni tampoco fallas de apilamiento. Este último tipo de defecto, como así también poros con una alta densidad, sí se presentó en ZnTe comer-

cial (eV, Inc) ambos materiales crecidos por HPB [9-10].

Conclusiones

La oblea comercial de ZnSe (Cradley Crystals, Inc) está pulida mecánicamente, como vimos anteriormente, con una malla que no altera la transmisión óptica del material. Así que esta propiedad está determinada fundamentalmente por los defectos generados por el método de crecimiento (HPB) y la pureza de los elementos de partida. Los defectos cristalinos macroscópicos observados, cristales ocluidos, están presentes en una densidad pequeña, como así también las maclas y dislocaciones. La desorientación angular entre subgranos contiguos es leve. Entre dislocaciones el ordenamiento estructural es excelente. Dado que no parece razonable que la empresa trabaje con distintas purzas en los diferentes crecimientos consideramos que si bien hablamos de presencia de defectos cristalinos con densidades reducidas estos valores son suficientes para que la transmisión óptica de la oblea de ZnSe adquirida tenga valores muy inferiores a los que la empresa presenta en la página web.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Buenos Aires (UTN-FRBA) por los subsidios recibidos, respectivamente PIP 1122-00901-00355 y 25/C116 los cuales permitieron realizar este trabajo. También al Dr. J. Codnia de la Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégicos para la Defensa (UNIDEF)- Ministerio de Defensa (MINDEF) por los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier.

Referencias

1. Yoneta, M.; Nanami, K.; Uechi, H.; Ohishi, M.; Saito, H.; Yoshino, K. "Epitaxial growth and characterization of Cl doped ZnSe layer by MBE". *J Cryst. Growth*, Vol. 237-239, p. 1545-1549, 2002.

2. Li Huanyong, Jie Wanqi. "Growth and characterization of bulk ZnSe single crystal by chemical vapour transport". J. Cryst. Growth, Vol. 257, p. 110-115, 2003.
3. Sangwall, K. "Etching of Crystals. Theory, Experiment and Application"; Elsevier North-Holland, Amsterdam, 1987.
4. Ebina, A.; Asano, K.; Takahashi, T. "Crystallographic polarity and etching behaviour of ZnSe", Jap. J. Appl. Phys. Vol. 16(9), p. 1563-1570, 1977.
5. Maruyama, Kenji; Suto, Ken; Nishizawa, Jun-ichi. "ZnSe horizontal traveling solvent growth using selenium solution". J. Cryst. Growth, Vol. 216(1-4), p. 113-118, 2000.
6. Trigubó, A. B.; Di Stefano, M.C.; D'Elía, R.; Cánepa, H.; Heredia, E.; Aguirre, M.H. "Calidad cristalina del ZnSe obtenido por transporte químico con I_2 como portador gaseoso"; Superficies y Vacío, Vol. 20(3), p. 21-25, 2007.
7. Read, W.T. "Dislocations in crystals"; Mc Graw Hill, Nueva York, 1953.
8. Wang, J.F.; Omino, A.; Isshiki, M. "Melt growth of twin free ZnSe single crystals". J. Cryst. Growth, Vol. 214-215(1-4), p. 875-879, 2000.
9. Trigubó, A.B.; Di Stefano, M.C.; Gilabert, U.; Martínez, A.M.; D'Elía, R.; Cánepa, H.; Heredia, E.; Aguirre, M.H. "TEM, Chemical Etching and FTIR Characterization of ZnTe Grown by Physical Vapor Transport"; Crystal Research and Technology, Vol. 45(8), p. 817-824, 2010.
10. Trigubó, A.B.; D'Elía, R.; Heredia, E. *Comunicación Personal*.

Recibido: 30/10/2013

Aprobado: 14/12/2013

Impacto en el presupuesto de medicamentos para el tratamiento de la Cardiopatía Isquémica, debido al aumento de camas en la Unidad de Terapia Intensiva de un hospital provincial. Comparación entre los años 2009 y 2011

Impact on the budget of drugs for the treatment of Ischemic Heart Disease, due to the increase of the number of beds in the Intensive Care Unit of a provincial hospital. Comparison between the years 2009 and 2011

Carina S. Chichalof¹, Roberto Bagnasco¹, Carolina B. Romañuk^{2,*}

1- Hospital Domingo Funes, Villa Caeiro, Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina.

2- Unidad de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología Farmacéutica (UNITEFA-CONICET), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

* E-mail: carovsky@gmail.com

Resumen

El objetivo del presente trabajo es analizar el impacto de la variación de costos farmacológicos en pacientes con cardiopatía isquémica en el presupuesto del Servicio de Farmacia, ocasionado por el aumento en el número de camas de la UTI.

Se llevó a cabo un estudio observacional, descriptivo y transversal en la UTI del hospital Domingo Funes, Córdoba-Argentina. Se realizó un análisis comparativo del consumo de medicamentos en los años 2009 (UTI con 4 camas) y 2011 (UTI con 11 camas) en base al correspondiente protocolo de actuación.

Las patologías cardíacas representaron un mayor porcentaje en el perfil de atención de UTI, tanto para el año 2009 como para el 2011, determinándose como patología prevalente la cardiopatía isquémica.

La ampliación de la UTI significó un incremento superior al 70% del gasto en medicamentos, impactando directamente en los costos del Servicio de Farmacia. Con el aumento en la cantidad de camas, el número de pacientes anuales se incrementó entre un 90% y 120%, tanto en el total de pacientes como en el grupo con patologías cardiovasculares, respectivamente.

Palabras clave: Servicio de farmacia de hospital; Costos; Unidad de terapia intensiva; Cardiopatía isquémica; Utilización de medicamentos.

Abstract

The aim of this study was to analyze the economic impact on the budget of the Pharmacy Service caused by the increase in the number of beds in the ICU, identifying the treatment expenditure in the prevalent pathology. An observational, descriptive and cross sectional study was conducted in the ICU of the hospital Domingo Funes in Cordoba-Argentina. This study shows a comparison analysis between 2009 (ICU with 4 beds) and 2011 (ICU with 11 beds) based on the corresponding protocol. Heart diseases accounted for a higher percentage in the attention profile of the ICU in recent years. Myocardial ischemia was detected as the prevalent disease. The cost of the expansion of the ICU room was 70% higher than the expenditure on drugs, this had a direct impact on the budget of the institution. With the increase in the number of beds, the number of patients per year will increase between 90% and 120%, both in the total number of patients and in the group with cardiovascular pathologies, respectively.

Keywords: Pharmacy service, Hospital; Costs and cost analysis; Intensive care; Myocardial ischemia; Drug use.

Introducción

El Hospital Provincial Domingo Funes está situado en Villa Caeiro en la localidad de Santa María de Punilla, a 500 metros de la Ruta Nacional 38, enclavado al pie del cordón montañoso de las Sierras Chicas, provincia de Córdoba. En el año 1939, se inaugura como hospital monovalente de afecciones tuberculosas [1] y en el año 1971 se transforma a polivalente, siendo en la actualidad referente de zona del departamento Punilla.

Depende del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba, regulado por la Ley N° 7625 que comprende al equipo de Salud y la Ley N° 7233 de empleados públicos administrativos y servicios generales. Cuenta con una complejidad de Tercer Nivel de Atención – 2do Nivel de Referencia [2], posee 93 camas para internación que incluyen los Servicios de Cirugía, Neonatología, Ginecología y Obstetricia, Emergencia, Pediatría y Clínica Médica y la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) de adultos.

El hospital dispone de un Servicio de Farmacia (SF), a cargo de un Director Técnico Farmacéutico, auxiliares idóneos y administrativo. Dentro de las numerosas actividades realizadas por el SF, se destacan la provisión de medicamentos y productos médicos para la atención del paciente internado [3,4,5,6].

En el año 2009 comenzó una reforma edilicia para refuncionalizar el ala sur. El Servicio de UTI inicialmente situado en el 3er piso, área central, contaba con 4 camas y luego de las reformas de este sector, en el año 2010, se habilitó la UTI con 11 camas.

Como expresan algunos autores, en las unidades de terapia intensiva se concentran la mayor parte de los recursos materiales, humanos y tecnológicos de los establecimientos asistenciales con internación de pacientes y se le suele atribuir un alto porcentaje de los recursos destinados al financiamiento hospitalario. Esto determina la importancia de encaminar esfuerzos que se propongan el uso eficiente de los recursos [7, 8].

Como era de esperar, la ampliación del ala sur demandó una mayor cantidad de recursos, tanto en el presupuesto general del hospital como en el SF en particular. Tal incremento se relaciona directamente con mayores demandas de recursos humanos, infraestructura, volúmenes de compra de insumos, entre otros. Sin embargo, ante este incremento de camas en la UTI, se desconoce la incidencia en el consumo de productos sanitarios [9] para satisfacer la demanda de prestaciones luego de la ampliación.

En una UTI son numerosas las patologías que se presentan. En esta institución hospitalaria se tratan principalmente patologías cardiovasculares, respiratorias, postoperatorias, shock, digestivas, renales, traumatológicas, sepsis y metabólicas. El grupo de las cardiovasculares abarca diversas patologías dentro de las que podemos mencionar la cardiopatía isquémica (CI), insuficiencia cardíaca, arritmias, hipertensión arterial, pericarditis, shock

cardiogénico, miocardiopatías, entre otras [10].

La hipótesis de este trabajo es que debido a la ampliación de la UTI en el año 2010 se produciría un incremento en el consumo de productos sanitarios con el consecuente aumento en el gasto hospitalario debido a la ocupación de las camas con pacientes que requieran internación en una UTI (Ej.: cardiovasculares, respiratorios, infecciones, etc.).

El objetivo general es analizar la variación de costos farmacológicos en el presupuesto del SF, ocasionado por el aumento de camas en la UTI, identificando el gasto del tratamiento en la patología prevalente.

Los objetivos específicos consistieron en:

- Estimar la ocupación efectiva/real de las camas en la UTI ampliada para el tratamiento de pacientes que requieren monitoreo intensivo.
- Obtener información de costos producidos por consumo de medicamentos, según protocolo de tratamiento farmacológico de la patología prevalente en ambos años.
- Relacionar el aumento de camas de UTI con el aumento del gasto, a partir del análisis del consumo de medicamentos, para la estimación de necesidades.
- Generar información de utilidad al Servicio Contable de la institución, a los efectos de mejorar las estimaciones presupuestarias.

Materiales y metodología

Este trabajo corresponde a un estudio observacional, descriptivo y transversal. Se llevó a cabo en la UTI perteneciente al hospital Domingo Funes con datos obtenidos del año 2009 y 2011 de pacientes internados tomando como referencia la patología prevalente. El criterio para esta elección es que el mismo resulta representativo de la mayoría de los pacientes internados.

La patología prevalente se determinó mediante el análisis exhaustivo de los datos provistos por el libro de internación en el cual se clasifican y registran todos los pacientes atendidos en los años bajo análisis resultando ser la Cardiopatía Isquémica.

Se realizó una evaluación de costos, comparando los gastos en medicamentos de ambos años [11]. Para ello se estimó el consumo comparando el año 2009 (UTI con 4 camas) con el año 2011 (UTI con 11 camas) en base al correspondiente protocolo de tratamiento farmacológico, acordado en los primeros 7 días, para el tratamiento de la CI en el HDF, esquematizado en la Tabla 1. Para la valoración de pacientes con más días de internación se realiza una revisión de pautas que no están contempladas en este trabajo.

Tabla 1: Protocolo de tratamiento farmacológico para el tratamiento de la cardiopatía isquémica en el HDF.

Productos sanitarios	Número de dosis
Alprazolam 1 mg	3 comprimidos/día
Ácido acetil salicílico 100 mg	1 comprimido/día
Atenolol 50 mg	1 comprimido/día
Atorvastatina 20 mg	1 comprimido/día ^a
Clopidogrel 300 mg	1 comprimido/tratamiento ^b
Clopidogrel 75 mg	1 comprimido/día ^c
Dobutamina 250 mg	2 ampollas /tratamiento
Dopamina 200 mg	4 ampollas/tratamiento
Enalapril 20 mg	1 comprimido/día
Espironolactona 25 mg	1 comprimido/día
Furosemida 20 mg	1 ampolla/día
Nitroglicerina 25 mg	4 ampollas/día
Ranitidina 50 mg	3 ampollas/día
Solución de dextrosa 5 % x 250 ml	3 sachet/día
Solución de dextrosa 5 % x 500 ml	1 sachet/día
Solución fisiológica x 250 ml	3 sachet/día
Estreptoquinasa 1.500.000 UI	1 frasco ampolla/tratamiento ^d

a) Dosis disponible de acuerdo a protocolización local y no con guías internacionales

b) El primer día

c) Durante los restantes 6 días

d) Según corresponda, en base al estadio de la CI

Fuente: elaboración propia

Para ambos años de estudio, se valoró en términos monetarios las actuaciones con medicamentos calculando el costo por día del tratamiento farmacológico de acuerdo al protocolo expresado en la tabla 1. Luego, de acuerdo a los días de internación de cada paciente en particular, se calculó el costo de su tratamiento. El incremento se midió en términos del gasto, en pesos argentinos constantes ajustados a noviembre de 2011 y traducidos a porcentaje.

El porcentaje de incremento de gastos en el SF se calculó de acuerdo a la ecuación 1.

$$\% \text{ Incremento del gasto} = \frac{\text{Consumo 2011} - \text{Consumo 2009}}{\text{Consumo 2009}} \times 100 \text{ (Ecuación 1)}$$

Definición de variables

Caso de cardiopatía isquémica (CI): se considera a todo paciente diagnosticado con esta patología y sus tipos. La CI es la enfermedad del miocardio producida por la falta de riego sanguíneo en él, o más concretamente por la desproporción entre el aporte del flujo sanguíneo coronario (que puede ser normal) y las necesidades miocárdicas (que pueden estar muy elevadas). Puede manifestarse en forma de episodios agudos, temporales o crónicos [12, 13].

Cálculo de costos: se realiza con base en los precios unitarios de la cotización mensual suministrada por el servicio de compras del hospital correspondiente al mes de noviembre de 2011. Para poder realizar la comparación de los precios unitarios se estimaron a la fecha de la cotización de los meses noviembre y diciembre de 2011.

Captura de la información: planillas de estadísticas

anuales del servicio de UTI, libro de registro de pacientes ingresados a la UTI, planillas de cotizaciones mensuales, cuaderno de registro de entrega de insumos especiales a UTI, planillas de estadísticas de atención en UTI, entre otros.

Criterios de inclusión: pacientes internados del grupo cardiovasculares diagnosticados con CI, con o sin comorbilidades, registrado durante el tiempo y el lugar de estudio señalados.

Criterios de exclusión: pacientes del grupo cardiovasculares con diagnósticos diferentes a CI.

Resultados y discusión

Se registraron 283 pacientes en 2009 y 554 en 2011. En ambos años, coincidieron como prevalentes las patologías cardiovasculares (104 y 227 pacientes respectivamente), y dentro de ellas, la CI con 52 y 100 pacientes respectivamente.

Las patologías cardíacas representaron el mayor porcentaje en el total de pacientes atendidos en UTI, tanto para el año 2009 como para el 2011 (Tabla 2). En ambos años se mantiene esta tendencia, por lo que la comparación resultaría útil.

Tabla 2: Grupos terapéuticos de patologías tratadas en el servicio de UTI del Hospital Domingo Funes (años 2009 y 2011).

Pacientes internados según diagnóstico principal de ingreso por grupo terapéutico					
Año 2009			Año 2011		
Grupo	Nº pacientes	(%)	Grupo	Nº pacientes	(%)
Cardiovascular	104	36,7	Cardiovascular	227	41,0
- Cardiopatía isquémica	52		- Cardiopatía isquémica	100	
- Insuficiencia cardíaca	21		- Insuficiencia cardíaca	66	
- Arritmias	17		- Arritmias	46	
- Crisis hipertensivas	4		- Crisis hipertensivas	8	
- Pericarditis	2		- Pericarditis	0	
- Shock cardiogénico	8		- Shock cardiogénico	7	
Respiratorios	41	14,5	Respiratorios	84	15,2
Post operatorios	34	12,0	Post operatorios	54	9,8
Shock	24	8,5	Shock	38	6,9
Neurológico	8	2,8	Neurológicos	35	6,3
Infecciones/sepsis	20	7,1	Infecciones/sepsis	15	2,7
Digestivos	13	4,6	Digestivos	26	4,7
Renales	9	3,2	Renales	9	1,6
Trauma	8	2,8	Trauma	14	2,5
Metabólicos	7	2,5	Metabólicos	24	4,3
Intoxicaciones	2	0,7	Tóxicos	15	2,7
Otros*	13	4,6	Otros*	13	2,3

* Otros: gineco-obstétricos, hematológicos, trastornos hidroelectrolíticos, tumores.
Fuente: elaboración propia en base a datos extraídos del libro de internación.

El costo total en medicamentos para los pacientes atendidos con CI es de \$ 33.759,38 en el año 2009 y de \$ 58.797,73 en el año 2011, según la cantidad de días de internación de cada paciente.

De acuerdo a la ecuación 1, se determinó para el año 2011 un 74,2% de incremento de los costos totales en relación a los costos de 2009.

Por otra parte, se determinó el promedio de días de internación para esta patología en ambos años; siendo 2,9 y 3,3 días para el año 2009 y 2011 respectivamente.

Adicionalmente, el porcentaje de ocupación de las camas de la UTI, teniendo en cuenta todos los pacientes internados, se determinó en un 92,4% para el año 2009 y en un 57,1% en el año 2011, con 4,0 y 4,2 días de internación promedio respectivamente.

La evaluación económica [14] de las patologías prevalentes es necesaria para proveer información a las autoridades sanitarias a fin de establecer protocolos de trabajo que tengan como objetivo garantizar una mejor asignación de recursos, necesariamente limitados, que garanticen la utilización de los mismos en aquellas acciones que provean el beneficio máximo [15,16,17,18].

La utilización de medidas de actuación unificadas ante determinadas patologías, unifica los criterios y ante posibles cambios, son evaluados en revista de sala fomentando un uso racional de medicamentos, siendo premisa del SF la utilización efectiva de los recursos disponibles.

En cuanto a las características demográficas y socio-económicas de la población de pacientes que concurrieron al hospital y requirieron internación en UTI, en ambos períodos, no presentaron una variación notoria, por lo que los datos son comparables.

El año 2010 no fue tenido en cuenta en esta evaluación ya que se lo considera un año de transición y no refleja el real cambio en el número de pacientes internados.

Los resultados presentados en este estudio dan a conocer una aproximación del porcentaje de incremento en el consumo de productos sanitarios como consecuencia del aumento del número de camas de un servicio crítico. Dada la evidente urgencia de reevaluar las partidas presupuestarias, estos resultados pueden ser utilizados por el Servicio Contable para justificar potenciales aumentos presupuestarios. La información es parcial ya que sólo se consideran los costos directos de la atención ocurridos por el consumo de medicamentos en el tratamiento de la patología prevalente [19]. En este nuevo escenario, no se analizaron los requerimientos referidos a recursos humanos en el SF. Otra limitación del trabajo fue tomar a todos los pacientes que presentan la patología definida como pacientes ideales, sin destacar menor o mayor gravedad en el tratamiento, complicaciones, ni comorbilidades.

Este trabajo no es una evaluación económica dado que sólo analiza parcialmente los costos incurridos por los pacientes atendidos con una patología en particular. Se propuso demostrar variaciones en el consumo de fármacos vinculados con aumentos en el número de camas de la UTI a los efectos de que futuras intervenciones, logren brindar una mayor calidad en salud a todos los pacientes atendidos mediante la asignación eficiente de los recursos sanitarios [20], por lo general limitados ante una demanda creciente [21]. La intención es aportar datos acerca de la

ampliación de la UTI y brindar a los expertos herramientas para posibles intervenciones sanitarias.

Acciones eficaces y efectivas aseguran intervenciones que sean beneficiosas en pos de una mejora de la salud en la población atendida [22, 23].

Los datos económicos no deben ser números desconocidos por los profesionales de la salud. Muy lejos de ser condicionantes de la libertad clínica, son herramientas en la adopción de criterios de eficiencia en la toma de decisiones [24].

Conclusiones

El incremento en el número de camas en la UTI llevó a un aumento en la cantidad de pacientes atendidos y, en consecuencia, en el consumo de productos sanitarios, lo cual se tradujo en un incremento del consumo de fármacos.

La correlación entre el aumento en el número de pacientes atendidos y la cantidad de camas ocupadas efectivamente evidenció la necesidad de la ampliación. Prácticamente las camas se triplicaron, el personal se duplicó y el número de pacientes anuales aumentó entre un 90% y un 120%, tanto en los totales como en el grupo con patologías cardiovasculares, respectivamente.

La ampliación de la UTI significó un incremento superior al 70% del gasto en medicamentos del SF, impactando directamente en el presupuesto de la institución.

La información generada se elevó al Servicio Contable a los fines de justificar una mayor demanda presupuestaria.

A partir de estos incrementos, es necesario continuar ajustando la provisión del SF atendiendo a los potenciales cambios que ocurran en el hospital tales como futuros traslados de otros servicios al ala sur, recientemente reformada.

Las estimaciones de costos no deben tener como único objetivo contener el gasto farmacéutico, sino también lograr mayor eficiencia en términos de los resultados de salud. Si bien algunas medidas, como la expansión en el número de camas pueden incrementar el gasto sanitario en lo inmediato, se pretende que las mismas se traduzcan en beneficios para la población con la premisa del uso racional del medicamento y la utilización eficiente de los insumos disponibles. El SF se propone la valoración de las opciones terapéuticas con el principio de equidad para la población a cargo, como aporte a la eficiencia institucional.

Agradecimientos

Al Dr. Claudio Rodríguez y a la Mgter. Sonia Uema por las sugerencias realizadas a este trabajo. Al Dr. Alberto Scarello (Jefe de la UTI) por facilitar información de su servicio y bibliografía específica.

Referencias bibliográficas

1. Hospital Domingo Funes. *Calendario 80° aniversario de la colocación de la piedra fundamental en 1932*. 2012.
2. Ministerio de Salud y Seguridad Social. *Resolución N° 1248*. Provincia de Córdoba. 1997.
3. OPS 5.2. *Guía para el Desarrollo de Servicios Farmacéuticos Hospitalarios: Logística del Suministro de Medicamentos*. Serie Medicamentos Esenciales y Tecnología; Octubre, 1997.
4. Directriz de Organización y Funcionamiento de Farmacias Hospitalarias de Establecimientos Asistenciales con Internación. *Resolución 1023/2012*. Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina (Julio 04, 2012).
5. Directivas para Farmacias en Establecimientos Asistenciales. *Resolución 166/2012*. Dirección de Jurisdicción Farmacia, Ministerio de Salud, Provincia de Córdoba, República Argentina, 2012.
6. Normas de Organización y Funcionamiento de Farmacia en Establecimientos Asistenciales. *Resolución 641/2000* Ministerio de Salud de la Nación, República Argentina, Agosto 22, 2000.
7. Amador Morán, R.; Labrada Despaigne, A.; Campo González, A. y Díaz Aguilar, R. *Costo-beneficio en una unidad de cuidados intensivos neonatales*, Revista Cubana de Pediatría 83 (1): p. 166-172. 2011.
8. Alvear Vega, S.; Canteros Gatica, J.; Jara Martínez, J.; Rodríguez Cuellar, P.; Mujica Escudero, V. y Vorpal Albrecht, U. *Determinación y análisis de costos reales de tratamientos intensivos por paciente y día cama*. Revista Chilena de Medicina Intensiva 27 (1): p. 7-14. 2012.
9. Poder Ejecutivo provincia de Córdoba. *Decreto reglamentario N° 175/1994 de la ley 8302*, Anexo B, Título 1, de las Farmacias, artículo 4°.
10. Ministerio de Salud y Ambiente. *Clasificación estadística de problemas de salud, atención primaria*. 2a edición. Buenos Aires: Ministerio de Salud y Ambiente - OPS; 2005.
11. Navarrete Navarro, S. y Armengol Sánchez, G. *Costos secundarios por infecciones nosocomiales en dos unidades pediátricas de cuidados intensivos*. Salud Pública de Méjico 41 (1): p. 51- 58. 1999.
12. Discapnet; Cardiopatía isquémica. Disponible en: http://salud.discapnet.es/Castellano/Salud/Enciclopedia/C/Paginas/Cardiopatía%20isquémica.aspx#_top [Consultado 22 marzo 2013].
13. Harrison. *Principios de medicina interna*; Capítulo 7, Sección 1: enfermedades del corazón; Editorial Interamericana, McGraw Hill, p. 1089-1269. 13^{ed} 1994.
14. Rubio-Terres, C.; Sacristán, J.; Badía, X.; Cobo E. y García Alonso, F. *Métodos utilizados para realizar evaluaciones económicas de intervenciones sanitarias*. Evaluación Económica para Clínicos, Med. Clin. Barc. 122 (15): p. 578-583. 2004.
15. Zambrana, M. y Zurita B. *Gasto hospitalario de cinco patologías de alto impacto económico*, Rev. Med Inst. Méx. Seguro Social 46 (1): p. 43-50. 2008.
16. Giachetto, G. y Cruz, L. *Impacto de la estrategia plan de Invierno en el uso de medicamentos en el Hospital Pediátrico del Centro Hospitalario Pereira Rossell (CHPR)*, Rev. Med. Uruguay 18: p. 148-153. 2002.
17. Miravittles, M.; Figueras, M. *El coste de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en España*. Opciones para una optimización de recursos, Arch. Bronconeumol. 37: p. 388-393. 2001.
18. Prieto, L.; Sacristán, J.; Pinto, J.; Badía, X.; Antoñanzas, F. y Del Llano, J. *Análisis de costes y resultados en la evaluación económica de las intervenciones sanitarias*. Evaluación Económica para Clínicos. Med. Clin. Barc. (11): 423-429. 2004.
19. Brenner Friedmann, P.; Nercelles, M.P.; Pohlenza, A.M. y Otaiza, F. *Costo de las infecciones intrahospitalarias en hospitales chilenos de alta y mediana complejidad*, Rev. Chil. Infect. 20 (4): 285-290. 2003.
20. Delgado, O.; Escrivá, F.; Puigventós, F.; Ginés, A.; Boronat, J.; Vargas, F.; Díaz, F. y Barroso, M. *Gestión Económica de Medicamentos*, El Farmacéutico Hospitales, 131: p. 1-7. 2002.
21. Hospital Nacional Dr. Alejandro Posadas. *Política presupuestaria de la entidad 908*. 2012.
22. Sacristán, J.; Ortún, V.; Rovira, J.; Prieto, L. y García-Alonso, F. *Evaluación económica en medicina*. Evaluación Económica para Clínicos, Med. Clin. Barc. 122 (10): 379-382. 2004.
23. Schmunis, G.; Gordillo, A.; Acosta-Gnass, S.; Bologna, R.; Ruvinsky, S.; Aragon, J.; Zurita, J.; Douce, R.; Sánchez, O.; Falconi, G.; Guerrero, F.; Mejía, C.; Silvestre, M.; Villafañe, M. y Mogdazi, C. *Costo de la Infección nosocomial en unidades de cuidados intensivos de cinco países de América Latina: llamada de atención para el personal de salud*. Rev. Panam. Infectol. 10 (1): p. 70-77. 2008.
24. Sacristán, J.; Rovira, J.; Ortún, V.; García-Alonso, F.; Prieto, L. y Antoñanzas, F. *Utilización de las evaluaciones económicas de intervenciones sanitarias*. Evaluación Económica para Clínicos. Med. Clin. Barc. 122 (20): p. 789-795. 2004.

Recibido: 22/04/2013

Aprobado: 14/08/2013