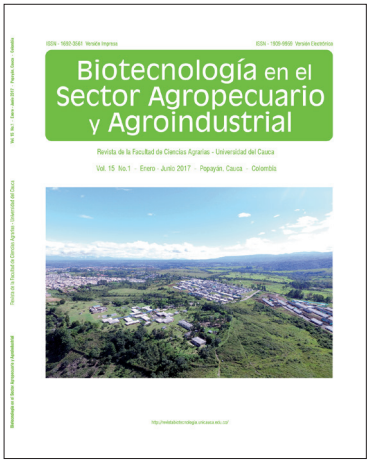


PORTADA

José Vivas Quila – Ph. D.
Universidad del Cauca
Imagen de la Facultad de Ciencias Agrarias

Dirección Revista
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad del Cauca
Calle 5 No.4-70 Popayán, Colombia
Teléfono (928) 245976
e_mail: biotecnofaca@unicauca.edu.co
pagina web:
http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/

Revista Biotecnología
Revista Biotecnología
Revista Bsaa

Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial publica un volumen cada año con dos ediciones:
Primera: Enero - Junio
Segunda: Julio - Diciembre

Suscripción a la revista e intercambio de revista comunicarse
e_mail: biotecnologia@unicauca.edu.co
biotecnofaca2009@gmail.com
Inscribir a la pagina
http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/

- VRI - Vicerrectoría de Investigaciones
Universidad del Cauca

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad del Cauca

ISSN - 1692-3561
Versión Impresa

ISSN - 1909-9959
Versión Electrónica

Universidad del Cauca

Vol 15 No. 1 Enero - Junio 2017

Héctor Samuel Villada - PhD.
Editor de la Revista

COMITÉ EDITORIAL

Héctor Samuel Villada - Ph. D.
Universidad del Cauca
Departamento de Agroindustria

Silvio Andres Mosquera M. Sc.
Universidad del Cauca
Departamento de Agroindustria

Sandra Morales Velasco M.Sc.
Universidad del Cauca
Departamento de Ciencias Agropecuarias

Consuelo Montes M. Sc.
Universidad del Cauca
Departamento de Ciencias Agropecuarias

Diana Paola Navia, M. Sc.
Universidad San Buenaventura
Cali, Colombia

Jhon Wilder Zartha S. - M. Sc.
Univerisdad pontificia bolivariana (UPB)

Michael Peters – Ph.D.
Universidad de Giessen – CIAT

Ángel Pérez – Ph. D.
Universidad de Holguín de Cuba

José Ángel Gómez Ruiz – Ph.D
Universidad Autónoma de Madrid,España

Diofanor Acevedo Correa. Ph. D.
Universidad de Cartagena
Departamento de Química

Jaime Ricardo Rosero Noguera - Ph.D.
Universidad Nacional – Sede Medellín

COMITÉ CIENTÍFICO

Nelson Vivas Quila – Ph. D.
Universidad del Cauca
Departamento de Ciencias Agropecuarias

Misael Cortés Rodríguez - Ph. D.
Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín

Alfredo Ayala Aponte Ph. D.
Universidad del Valle
Escuela de Ingeniería de Alimentos

Xuebing Xu - Ph. D. Biocentrum.
Instituto de Biotecnología de Dinamarca

Henry Armando Jurado Gámez-Ph.D.
Universidad de Nariño

Vijaya Raghavan - Ph. D.
Universidad de Mcgill de Canadá

Byong Lee - Ph. D.
Universidad de Mcgill de Canadá

Francisco J. Moreno Andújar - Ph.D.
Instituto de fermentaciones industriales Madrid, España

Maria del Mar Villamiel G. Ph.D.
Universidad Complutense de Madrid

Asistente Editorial
Willian Enrique Sotelo O.

Diseño y Diagramación
Santiago Burbano M.

IMPRESO
SAMAVA EDICIONES
Calle 1 No.2-99 - Popayán - Colombia

UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Rector
JUAN DIEGO CASTRILLON ORREGO

Vicerrector Académico
EDGAR VELASQUEZ RIVERA

Vicerrectora Administrativa
YANETH NORGUERA RAMOS

Vicerrector de Investigaciones
ALFONSO RAFAEL BUEELVAS GARAY

Vicerrector de Cultura y Bienestar
MILTON ARANGO

Secretaria General
LAURA ISMENIA CASTELLANOS VIVAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Decano
LUIS ALFREDO LONDOÑO VELEZ

Secretaria General
TANIA MARITZA PABÓN GÓMEZ

Jefe Departamento Agroindustria
CARLOS ALBERTO GONZALES

Jefe Departamento Ciencias Agropecuarias
ROMÁN STECHAUNER

Coordinador Programa Ingeniería Forestal
JOSÉ FRANCO ALVIS GORDO

Coordinador Programa de Ingeniería Agroindustrial
CARMENZA LILIANA LÓPEZ PATIÑO

Coordinador Programa de Ingeniería Agropecuaria
HUGO HERNÁN ERAZO GÓMEZ

Coordinador Programa de Tecnología Agroindustrial
RAQUEL EUGENIA DE LA CRUZ NOGUERA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
REVISTA DE BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL
NORMAS DE PUBLICACIÓN

La Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial es una publicación arbitrada perteneciente a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca, acepta trabajos originales producto de investigación en el campo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología que tengan un impacto en el sector agrario regional, nacional e internacional. La revista acepta trabajos en: Agroindustria alimentaria y no alimentaria, Ciencias agrícolas y pecuarias, Ciencias Forestales, Energía y Medio Ambiente, Computación Aplicada, Biotecnología, Equipos y Procesos, Administración Industrial, en idiomas español, inglés, y portugués.

Políticas editoriales

Compromiso de tipo formal. Con el envío del trabajo a ser considerado para publicación, los autores aceptan la totalidad de las condiciones estipuladas en las normas.

Compromiso de tipo ético. Con el envío del trabajo, los autores deben establecer un compromiso de tipo ético en cuanto a la originalidad del trabajo sometido a evaluación. En la carta de presentación se debe aceptar este compromiso: *''El autor(es) firmante(s) declara que el artículo presenta resultados originales de una investigación, que no han sido publicados ni están siendo considerados para publicación en otra revista, ajustándose además a las normas éticas internacionales de propiedad intelectual y autoría''.* En la carta se deben incluir los datos personales de cada uno de los autores: nacionalidad, escolaridad, correo electrónico, teléfonos para su ubicación o dirección postal y filiación institucional, o en su defecto, la dirección Web donde pueden ser consultados.

Derechos de Autor. Con el envío de los trabajos, los autores(as) conceden "Derechos de Autor" a la revista, por lo que los trabajos no pueden tener derechos otorgados a terceros, a la fecha de envío del artículo. La concesión de Derechos de Autor significa la autorización para que la revista pueda hacer uso del artículo, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica- tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los(as) autores(as).

Tipos de artículos

Artículos de investigación científica. Documento que presenta, de manera detallada, los resultados originales de proyectos terminados de investigación. La estructura generalmente utilizada contiene cuatro apartes importantes: introducción, metodología, resultados y conclusiones.

Artículo de reporte de caso. Documento que presenta los resultados de un estudio sobre una situación particular con el fin de dar a conocer las experiencias técnicas y metodológicas consideradas en un caso específico. Incluye una revisión sistemática comentada de la literatura sobre casos análogos.

Artículos de reflexión. Documento que presenta resultados de investigación terminada desde una perspectiva analítica, interpretativa o crítica del autor, sobre un tema específico, recurriendo a fuentes originales. Debe presentar una revisión bibliográfica de por lo menos 30 referencias.

Artículo de revisión (Review). Documento resultado de una investigación terminada donde se analizan, sistematizan e integran los resultados de investigaciones publicadas o no publicadas, sobre un campo en ciencia o tecnología, con el fin de dar cuenta de los avances y las tendencias de desarrollo. Se caracteriza por presentar una cuidadosa revisión bibliográfica de por lo menos 50 referencias.

Artículo corto. Documento breve que presenta resultados originales preliminares o parciales de una investigación científica o tecnológica, que por lo general requieren de una pronta difusión. La extensión máxima es de 5 páginas.

Cartas al editor. Posiciones críticas, analíticas o interpretativas sobre los documentos publicados en la revista, que a juicio del Comité editorial constituyen un aporte importante a la discusión del tema por parte de la comunidad científica de referencia.

Editorial. Documento escrito por el editor, un miembro del comité editorial o un investigador invitado sobre orientaciones en el dominio temático de la revista, sobre aportes a los investigadores en cuestiones de presentación y estructura de sus artículos, sobre reflexiones sobre la presentación de documentos escritos, su normatividad, su importancia y otros.

Forma y preparación de manuscritos

Todo documento remitido a **BIOTECNOLOGÍA EN EL SECTOR AGROPECUARIO Y AGROINDUSTRIAL** debe cumplir con:

Originalidad: el aporte debe ser totalmente inédito, no publicado en ninguna otra publicación, excepto casos justificados.

Consistencia metodológica: en donde se haga evidente el uso de métodos y técnicas de investigación válidos.

Significación del asunto tal que informe o ilustre situaciones relevantes en el sector Agropecuario y Agroindustrial.

Impacto para un amplio sector de la academia, la investigación y estudiantes.

Avance del campo: en el cual sea claro y evidente el aporte a consideraciones y prácticas de mejora en el campo de investigación Agropecuario y Agroindustrial.

Consideraciones éticas.

Estilo de redacción claro, conciso y ordenado, evitando jergas personales y expresiones locales.

La estructura de los artículos debe ser:

Los **artículos de investigación científica**, de **reporte de caso** y **cortos**, deben cumplir con la siguiente estructura: la **INTRODUCCIÓN** debe resaltar la importancia de la investigación, presentar la literatura relacionada y entregar antecedentes necesarios para comprender la hipótesis de los autores, terminando con un párrafo que indique claramente los objetivos de la investigación. El **MÉTODO** debe tener suficiente información que permita a otro investigador replicar el ensayo y lograr los mismos resultados, así como la inclusión del diseño experimental, el análisis estadístico y las referencias de los métodos ya publicados. Los **RESULTADOS** se deben presentar en forma clara, apoyados con cuadros y figuras, con el análisis estadístico y los antecedentes de otros investigadores. Las **CONCLUSIONES** deben redactarse de acuerdo con los objetivos de la investigación explicando claramente los principales resultados de la investigación. Las **REFERENCIAS** deben contener todos los documentos consultados.

Los **artículos de reflexión** deben mostrar: a)intención analítica; b) propósito interpretativo; c)posición crítica. La estructura: **RESUMEN, INTRODUCCIÓN, DESARROLLO DEL TEMA, CONCLUSIONES y REFERENCIAS**.

Los **artículos de revisión** deben tener: **RESUMEN, INTRODUCCIÓN, DESARROLLO DEL TEMA, CONCLUSIONES y REFERENCIAS**.

Los elementos normativos a seguir en todos los artículos son:

Extensión y formato. La extensión debe ser de mínimo cinco (6) y máximo de once (11) páginas tamaño carta (21,59 cm de ancho y 27,94 cm de alto), escritas con interlineado sencillo y su contenido a doble columna (7,5 cm de ancho de columna) a partir de la introducción, escrito en Arial recta (excepto los nombres científicos) de 11 puntos, márgenes de 3 cm en el borde superior, 2 cm en el inferior y 2,5 cm en las márgenes laterales.

Título del artículo. Debe hacer referencia al contenido de una forma clara y concisa, escrito en Arial recta (excepto los nombres científicos) 11 puntos, mayúscula, negrilla y centrado; no debe exceder 15 palabras: si ello no es posible, deberá incluir un subtítulo luego de dos puntos; inmediatamente después deben ir las traducciones del idioma original.

Información del autor (es). Debajo del título a dos interlíneas, centrada, en mayúscula e incluir primer y segundo nombre si lo tiene, primer y segundo apellido separados por un guión medio. Los autores se nombran de acuerdo con la importancia de su contribución en la investigación o en la preparación del artículo, separados entre sí por comas y enumerados con superíndice. En nota de pie de página (Arial 8 puntos, justificada a ambos márgenes y en la parte inferior de la página) se indicará de cada autor: institución a la cual pertenece, dependencia, grupo de investigación, último título académico, ciudad y país, todos ellos separados por un punto. En otra línea, luego de la palabra **Correspondencia** (en negrilla) y dos puntos, debe aparecer el correo del autor elegido para el envío de correspondencia.

Resumen. Debe ser conciso, escrito en Español, Inglés (**ABSTRACT**) y Portugués (**RESUMO**), en un solo párrafo justificado sin exceder de 200 palabras. Incluirá la justificación, objetivos, metodología, resultados precisos y conclusiones de la investigación haciendo énfasis en los logros alcanzados, así como los límites de la validez y las implicaciones de los resultados. Los títulos deben justificarse al margen izquierdo, en mayúscula y negrilla, iniciando la escritura luego de dos interlíneas.

Palabras clave. Sirven para identificar el artículo en bases de datos internacionales de manera que un potencial usuario pueda llegar en forma efectiva al artículo. Van debajo del resumen, mínimo tres (3) y máximo cinco (5) palabras clave que no deben hacer parte del título del artículo, incluyendo en ellas los nombres científicos en cursiva. El título en mayúscula, negrilla, en Español (**PALABRAS CLAVE**), Inglés (**KEYWORDS**) y Portugués (**PALAVRAS-CHAVE**) seguido de dos puntos. La primera letra de cada palabra en mayúscula, separadas por coma y con punto al final.

Cuadros y figuras.Deberán aparecer dentro del texto y procesarse en el formato original con buen contraste para evitar policromías y facilitar la diagramación, en blanco y negro, escala de grises o tono maté. El título va en la parte superior y no debe superar dos líneas, en Arial recta normal 9, separado por una interlinea y con punto final; debe incluir la palabra Cuadro o Figuraseguido del número arábigo consecutivo (en negrilla), un punto y una breve descripción (Ej: **Cuadro 1.** Título descriptivo). Se deben usar líneas horizontales y verticales para separar las entradas del cuadro y cada columna debe tener encabezado (en negrilla, con mayúscula inicial). El tamaño de fuente al interior de un cuadro es arial 9 puntos normal y, en el caso de necesitarse algún pie de cuadro/figura o fuente de consulta, debe estar escrito en Arial 8 puntos normal.

Títulos.Los de segundo nivel se escriben con mayúscula inicial, Arial recta 11 puntos,negrilla y sin punto final, separados del texto por dos interlineas. Los títulos de tercer nivel se escriben con mayúscula inicial en arial recta 11 puntos y un punto, continuando el texto en el mismo renglón luego de un espacio.

Formulas, expresiones matemáticas y números. Las fórmulas y expresiones matemáticas deben ser escritas dejando dos espacios sobre, debajo y entre cada una de ellas y se debe utilizar el editor de ecuaciones de MS Word. Deben seguir un formato uniforme, justificarse al margen izquierdo y usar la expresión (Ec.1) con números arábigos consecutivos justificada al margen derecho, citándolas en el sitio oportuno. Las ecuaciones de deben insertar en un cuadro de dos columnas (sin bordes) para ajustar su forma más fácilmente. El significado de las variables y sus respectivas unidades deben aparecer luego de que se utilicen por primera vez, para lo cual se sugiere seguir el Sistema Internacional de Unidades (SI).Las cifras decimales se separan con coma.

Conclusiones. Se describen de forma clara y precisa las principales conclusiones del estudio presentado, derivado del análisis de los resultados.

Agradecimientos. Si el autor(es) lo desea (n), se podrá incluir una sección de Agradecimientos, redactada en forma sobria, de no más de 4 líneas, justo después de las Conclusiones.

Referencias. Evitar referencias innecesarias, tesis, informes locales y de poco alcance, y trabajos de congresos (denominada literatura gris), a menos que sea necesario; se debe dar preferencia a publicaciones recientes de los últimos tres años (mínimo el 70%), en revistas científicas de corriente principal que puedan respaldar lo escrito.

Deben citarse en el documento según el orden de aparición y encerradas entre corchetes [1,2], notación que se mantendrá en la sección de referencias. Se debe citas autor y año entre paréntesis redondos, por ejemplo: Villegas (2011) si es un autor, Villegas y Troncoso (2012) sin son dos autores y Villegas *et al*., (2014) cuando existan más de dos autores. En el listado de referencias se mencionan todos los autores del documento de acuerdo con el formato indicado. Si en el texto se mencionan más de dos referencias al tiempo, se citan como (Ruano *et al*., 2012; Prado, 2013; Zapata y Torres, 2014). Si los mismos autores tienen más de una referencia en el mismo año, se citan con el nombre del o los autores y con el año seguido de letras en orden correlativo: Prado *et al*. (2004a, 2004b).

En la sección de referencias, se enumeran cronológicamente y se detalla la información de cada una de ellas en el siguiente orden:

Autor (es). Apellido en mayúscula, luego la (s) inicial (es) del nombre (s) seguida (s) de un punto. Se deben citar todos los autores de la referencia separados entre sí por coma, excepto entre los últimos que incluye la conjunción en el idioma original (y, and, e).

VIDAL-CASAS, F.A.

VIDAL, F.A. y YAYA, A.

VIDAL, F.A., YAYA, A. and SOTO, E.

Título. Luego de dos espacios, la primera letra se escribe con mayúscula, así como los nombres propios, de instituciones o en los casos que el idioma lo establezca. Los nombres científicos en cursiva.

Subtítulo. Luego de dos puntos y un espacio.

Nombre de la publicación. Luego de punto y un espacio se indica el nombre completo de la publicación, seguido de coma.

Edición. Luego de un espacio se escribe con números arábigos seguido de la abreviatura ed. para el caso de libros. En el caso de revistas se escribe el volumen seguido del número entre paréntesis, ejemplo 4(5).

Pie de imprenta. Luego de dos espacios siguen el lugar de la publicación (seguido de dos puntos): nombre del editor o de la imprenta sino existe el editor (seguido de coma), año de publicación (seguido de coma) y en números arábigos incluir el número total de páginas (89 p.) o las páginas consultadas (p. 34-35).

Serie o colección. Cuando el documento forma parte de una serie o colección la mención se coloca entre paréntesis, separada del título por un punto y dos espacios así: número del libro, folleto o informe dentro de la serie, en números arábigos precedido por la abreviatura no., escrita con minúsculas y separada del título por un espacio, punto y coma (;) y un espacio.

Artículo de revista

SMITH, J.S., SORIA, R. and WEBBER, A. Chaos in a model offorced quasi-geostrophic flow over topography: an application of Melinkov's method. Food Control, 2 (3), 1991, p. 511-547.

Libro

BILLAS, G.L. y GOSPS, J. Física cuántica. 4 ed. Madrid (España): Acribia, 1990, 450 p.

Capítulo de libro

LEWIS, P. and STEVENS, J.G. En: Time Series Prediction. Modeling time series by using Multivariate Adaptive Regression Spiines (MARS). 1 ed. Madrid (España): Iberoamericana, 1994, p. 297-318.

Memoria de evento

ÁLZATE, N., BOTERO, T. y CORREA, D. El arte de la escritura de artículos. Memorias XIX Congreso Latinoamericano de Ponencias Científicas. Córdoba (Argentina): Tomo II, 2000, p. 219-228.

Normas técnicas

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). ASTM D1434–82: Standard test method for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting. Pennsylvania (USA): 2009, 13 p.

Reporte de un organismo o Gobierno

COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. La situación de la provisión de alimentos en un mundo moderno. Bogotá (Colombia): 1997, 57 p.

Tesis

JACOBS J. Regulación of life history strategies within individuáis in predictable and unpredictable environments [Ph.D. Thesis Social Communication]. Seattle (United States): University of Washington, Faculty of Humanities, 1996, 345 p.

Patentes

MOREIRA, G.eMATOS, T.Embalagem biodegradável de amido de inhame.US 6.444.567, Clases 343, 356. Sao Paulo (Brasil): 2001.

Artículo revista electrónica

JUAREZ, T.R.Mejoramiento de las condiciones operación en plantas industriales[online]. RevistaAgrip, ISSN: 0655-6782, 37(3), 2003. Disponible: http://www.ciencia.mx/ aceites. htm. [citado 5 de Mayo de 2004].

Monografías electrónicas

MACIAS, J.C., SANTOS, J.M. and WILD, E. Handbook of Nanomaterials [online]. 1996. Disponible: http://nano.hb/handbook/ kewat.com/ [citado 4 de abril de 2004].

Otras referencia electrónicas

NOAA-CIRES. Climate Diagnostics Center. Advancing Understanding and Predictions of Climate Variability [online]. 2010. Disponible: http://www.cdc.noaa.gov [citado 8 de Agosto de 1998].

ASHWELL, M. ILSI Europe Concise Series. Concepts of functional foods [online]. 2002. Disponible:http://www.ilsi.org/Europe/Publications/C2002Con_Food.pdf. [citado 13 mayo de 2009].

Publicación artículos

Costo de publicación. Cada artículo publicado tiene un costo de $ 150.000: el comprobante del pago debe ser enviado por correo electrónico (biotecnofaca@unicauca.edu.co o biotecnofaca2009@gmail.com.)una vez el artículo sea aprobado para publicación, como requisito para proceder a realizar el proceso indicado. Cuenta de ahorros del Banco Popular No. 290-72027-5 o Cuenta de Ahorros del Banco de Bogotá No.520-36672-5.

Proceso de Evaluación y Edición. El proceso de aceptación y evaluación de los trabajos enviados inicia con la revisión por parte del Comité Editorial que se reserva el derecho de rechazar un artículo (que no cumpla las normas de publicación, citas y referencias adecuadas y pertinentes)o sugerir modificaciones con el objeto de lograr una mejor presentación e impacto en cuanto a título, resumen, palabras claves, figuras, cuadros y referencias. Si es aceptado el artículo, proseguirá con el proceso de asignación de árbitros quienes emitirán sus conceptos y sugerirán las correcciones al documento que nuevamente se remite con todas las consideraciones. La revista se reserva el derecho de no responder cuando no se cumplan las Normas establecidas para el envío de los trabajos.

No se permitirá la evaluación simultánea de mas de dos artículos por cada autor proponente.

Envío de manuscritos. El texto completo de los trabajos, incluyendo figuras y cuadros debe enviarse en formato Word a: Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias sede Las Guacas, Popayán, Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Ph.D. Héctor Samuel Villada Castillo, por correo electrónico. Los autores deben enviar la Carta de Presentación (ver formatos) firmada, que incluye un compromiso ético relacionado con la autoría cuando por algún motivo esto sea imposible, basta con un correo electrónico del autor, en el que confirme su participación tanto en el artículo original como en el artículo corregido según las observaciones de los pares evaluadores.

Acuso de recibo. Al recibo de los trabajos se enviará un acuso de recibo por correo electrónico. Una vez aceptado el trabajo para publicación se comunicará a los autores y una vez publicado en nuestros sitios en Internet se enviará una versión física.

Evaluación. Los trabajos que cumplan con las normas serán evaluados por árbitros especializados quienes determinarán la calidad del artículo en cuanto a su atractivo científico y tecnológico, la rigurosidad del tratamiento del tema, el ajuste a las normas de la revista y su contribución al desarrollo de la ciencia, la ingeniería y la tecnología.

Comunicación de los autores. Se mantendrá contacto permanente con el autor indicado para envío de correspondencia para intercambio de información. Se solicita a los autores dar un tiempo prudente para realizar en buena forma el proceso de evaluación que puede tomar entre 6 y 12 meses, dependiendo del cumplimiento de las normas y la agilidad de los árbitros.

Envío de la versión corregida. Los autores cuyos trabajos hayan sido aceptados deberán hacer las correcciones solicitadas por los evaluadores y por el Editor, cuando les fue aceptado el manuscrito original: si transcurren tres meses sin respuesta de los autores, el editor a discreción tratará el manuscrito como caducado y debe ser presentado nuevamente siguiendo el proceso indicado. Junto con la versión corregida, los autores deberán enviar una carta explicando los cambios realizados con máximo detalle posible, de manera de facilitar la revisión final y no retrasar la aceptación y publicación. Si algunas de las sugerencias o cambios pedidos por los evaluadores no son atendibles se deberá explicar los motivos en forma clara y detallada.

Suscripción

Instrucciones para Suscribirse a la Revista (2 ediciones por año):

1. Con el número de cédula, solicitar a la dirección de la revista la generación del recibo según el concepto deseado. A vuelta de correo, se remitirá el formato para la cancelación respectiva y posterior devolución escaneada por vía electrónica.

2. Consignar $ 35.000 por la suscripción anual o $ 20.000 por cada edición, en efectivo en la cuenta No. 520-366725 del Banco de Bogotá a nombre de la Universidad del Cauca.

3. Descargar Cupón de Suscripción

Contenido

11 **Artículos de Investigación Científica y Tecnológica**

11 **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PITAHAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus* Haw.) EN LA PROVINCIA DE LENGUPÁ, BOYACA-COLOMBIA**
Ana Cruz Morillo-Coronado, Yeily Paola Tovar-León, Yacenia Morillo Coronado

19 **INFLUENCIA DE MICROORGANISMOS EN LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN PLÁNTULAS DE CAFÉ *Coffea arabica***
Carlos A. Cisneros R., Jaime Martín Franco, Marcela Realpe Fernández, Juan Carlos Fuenmayor

27 **ELABORACIÓN DE QUESITO ANTIOQUEÑO REDUCIDO EN SODIO Y ADICIONADO CON *Bifidobacterium lactis***
Edinson Eliécer Bejarano-Toro; José Uriel Sepúlveda-Valencia; Guillermo Correa-Londoño

36 **ACTIVIDAD LIPOLITICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON GRASAS**
Carmen Julia Pedroza-Padilla, Magally Romero-Tabarez, Sergio Orduz

45 **CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE QUESO DOBLE CREMA Y QUESILLO COLOMBIANO**
Mayra-Fuentes Fanegas, Andrés-Londoño Zapata, Mónica-Durango Zuleta, Margarita-Gutiérrez Buriticá, Susana-Ochoa Agudelo, José-Sepúlveda Valencia

56 **EFECTO ANTIMICROBIANO DEL CLAVO Y LA CANELA SOBRE PATÓGENOS**
Yenis Ibeth Pastrana-Puche, Alba Manuela Durango-Villadiego, Diofanor Acevedo-Correa.

66 **PROPIEDADES FÍSICO-MECÁNICAS DE LA MADERA DE URACO *(Ocotea brevipetiolata* van der Werff*)*, MUNICIPIO DE SIBUNDOY, PUTUMAYO**
José Franco Alvis-Gordo, Laura Daniela Cabas-Giraldo, Diana Paola Valencia-Ramos

76 **ANALYTICAL APPROACH OF THE VOLATILE FRACTION OF *Solanum quitoense* BY HS-SPME/GC-MS**
Eduardo Corpas-Iguarán, Gonzalo Taborda-Ocampo, Omar Tapasco-Alzate

85 **DIVERSIDAD GENÉTICA EN PATRONES DE CÍTRICOS MEDIANTE MICROSATÉLITES AMPLIFICADOS AL AZAR (RAMs)**
Jeisson Steevens Gallego-Colonia, Ayda Lilia Enríquez-Valencia, Álvaro Caicedo-Arana, Andrés Mauricio Posso-Terranova, Jaime Eduardo Muñoz-Florez

95 **ISOTERMAS Y CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORCIÓN DE AGUA DE ALMIDÓN DE QUINUA**
Augusto Pumacahua-Ramos, Katherine Milusca Limaylla-Guerrero, Javier Telis-Romero, José Fransciso Lopes Filho

105 **MÉTODO DELPHI EN ESTUDIOS DE PROSPECTIVA TECNOLÓGICA: Una aproximación para calcular el número de expertos y aplicación del coeficiente de competencia experta "K"**
Jhon Wilder Zartha - Sossa, Juan Manuel Montes - Hincapié, Ivan Dario Toro - Jaramillo, Raul Hernandez - Zarta, Hector Samuel Villada – Castillo, José Luis Hoyos – Concha

116 **ANÁLISIS DE LAS FUERZAS DEL MERCADO DENDROENERGÉTICO EN LA VEREDA CAJETE DEL MUNICIPIO DE POPAYÁN**
Alex Enrique Ordoñez-Hoyos, Ronald Alejandro Macuacé-Otero, Román Ospina-Montealegre

123 **COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LA FRACCIÓN PROTEÍCA DEL GRANO DE AMARANTO EXTRAÍDA MEDIANTE MOLIENDA HÚMEDO-ÁCIDA**
Diego-Roa, Vicente-Ortiz, Marcela-Tolaba

131 **DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL BLV EN MUESTRAS DE LECHE EN UNA POBLACIÓN DE VACAS HOLSTEIN, ANTIOQUIA.**
Cristina Úsuga-Monroy, Lina Marcela López-López, Karen Yepes-Luna, José Julián Echeverri-Zuluaga, Albeiro López-Herrera

138 **PROPIEDADES MECÁNICAS Y VISCOELÁSTICAS DE QUESO FRESCO ELABORADO CON LECHE DE BUFALA Y VACA**
Roger De Hombre, Armando Alvis-Bermudez, Carlos García-Mogollon

Editorial

La firma de un Acuerdo para la Paz entre el Gobierno Colombiano y la guerrilla de las FARC, puso fin a un conflicto armado de 52 años y abrió una ventana de nuevas oportunidades para el campo. Estas expectativas surgen al incluirse en el documento varios temas estratégicos que resaltan el papel de los territorios rurales en tiempos de paz.

Las Universidades y Centros de Investigación, deberán desempeñar roles protagónicos en el postacuerdo, su participación demandará el diseño y acompañamiento de programas académicos flexibles para las comunidades campesinas, indígenas y afro, muchas de las cuales han sido excluidas durante décadas de los procesos educativos universitarios por "causa" del conflicto armado; también se tendrán que explorar alternativas para capacitar a los desmovilizados, quienes desde ahora deberán vincularse a proyectos productivos agropecuarios, forestales y agroindustriales, que les permita encontrar nuevas oportunidades sociales y económicas. La investigación de las instituciones de educación superior velará no sólo por generar altos impactos sociales; sino por emprender procesos de desarrollo e innovación orientados a mejorar la competitividad del sector agrario, que al mismo tiempo permitan generar nuevos puestos de trabajo y dinamizar las economías rurales.

En este número de la Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad del Cauca, se presentan un conjunto de 15 artículos que recogen las investigaciones que se han desarrollado en distintas instituciones de educación superior y se focalizan en atender problemáticas y buscar oportunidades para el sector rural.

Un primer grupo de artículos se relacionan con las frutas de Colombia; Corpas, Taborda y Tapasco realizan una aproximación analítica de la fracción volátil que otorga identidad a las características organolépticas del lulo, esta identificación resulta determinante en los criterios de selección del consumidor y en nuevas alternativas de procesamiento agroindustrial; Morillo, Tobar y Morillo realizan una caracterización molecular de la pitahaya amarilla que se produce en la provincia de Lengupá, departamento de Boyacá, con el interés de reconocer la diversidad genética en este territorio; con un propósito similar Gallego et al. realizan estudios genéticos de los patrones de cítricos mediante la identificación de microsatélites amplificados al azar, este trabajo tiene una gran preponderancia en procesos de selección y mejoramiento genético en este tipo de frutas, lo cual tiene un gran impacto no sólo en términos de producción primaria, sino desde el procesamiento agroindustrial.

Los granos andinos tienen una gran relevancia en la Soberanía y Seguridad alimentaria de los países de Suramérica, en este número de la revista se evalúa su comportamiento bajo ciertas variables de procesamiento, esta información resulta necesaria para explorar nuevas oportunidades en la industria alimentaria, en este sentido Roa, Ortiz y Tolaba estudian las propiedades funcionales del Amaranto procesado mediante molienda húmedo - ácida; mientras que Ramos et al. identifican las isotermas y el calor isostérico de absorción de agua del almidón de quinua.

Las tendencias mundiales que buscan contar con alimentos libres de conservantes químicos, han orientado múltiples investigaciones hacía la búsqueda de electrolitos y microorganismos banales que cumplan parcial o totalmente con esta función, bajo esta perspectiva en este número de la revista se presentan dos trabajos muy interesantes, el primero relacionado con la capacidad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas BAL propias del queso doble crema y el quesillo colombiano; y el segundo sobre la incidencia del clavo y la canela en el desarrollo de microorganismos patógenos. La primer investigación fue abordada por Fuentes et al., mientras que la segunda fue realizada por Pastrana, Durango y Acevedo.

Sobre el procesamiento de quesos se presentan los resultados de dos investigaciones muy interesantes, Bejarano, Sepúlveda y Correa exploran las alternativas para producir quesito antioqueño reducido en Sodio y enriquecido probióticamente con Bifido bacterias; De Hombre, Alvis y García evalúan las diferencias en las propiedades mecánicas y viscoelásticas obtenidas entre el queso fresco elaborado con leche de vaca y el preparado con leche de búfala.

Respecto al sector forestal, Ordóñez, Macuacé y Ospina analizan el consumo de leña como fuente de energía en una vereda próxima a la ciudad de Popayán, Colombia; mientras que Alvis, Cabas y Valencia miden las propiedades físico - mecánicas de la madera de Uraco, propia del municipio de Sibundoy, Departamento del Putumayo, estos elementos resultan relevantes para identificar la calidad de este recurso forestal y sus posibles usos.

Respecto al tema sanitario, Monroy et al. participa en esta edición con los resultados de la detección del virus de la Leucosis Bovina por vía serológica en muestras de leche, tomando como muestra vacas Holstein ubicadas en el departamento de Antioquia.

De manera aislada en las temáticas, encontramos la investigación de Pedroza, Romero y Arduz sobre la actividad lipolítica de microorganismos aislados de aguas residuales contaminados con grasas. Zartha et al. realiza un aporte metodológico al método Delphi, empleado como herramienta estudios de prospectiva; mediante el establecimiento de una guía en el cálculo del número de expertos y el coeficiente de competencia experta K.

Esperamos que este nuevo número de la Revista Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial sea de su interés y sea un medio para llevar nuevos conocimiento a los territorios rurales.

Ph.D. José Fernando Grass Ramírez
Profesor titular
Coordinador del Doctorado en Ciencias Agrarias y Agroindustriales
Universidad del Cauca, Colombia

Artículos de Investigación Científica y Tecnológica

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA PITAHAYA AMARILLA (*Selenicereus megalanthus* Haw.) EN LA PROVINCIA DE LENGUPÁ, BOYACA-COLOMBIA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF YELLOW PITAHAYA (*Selenicereus megalanthus* Haw.) IN THE LENGUPÁ

PROVINCE, BOYACÁ-COLOMBIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PITAIAIÁS AMARELO (*Selenicereus megalanthus* Haw.) NA PROVÍNCIA LENGUPÁ, BOYACÁ-COLOMBIA

ANA CRUZ MORILLO-CORONADO[1], YEILY PAOLA TOVAR-LEÓN[2], YACENIA MORILLO CORONADO[3]

RESUMEN

En los últimos años, la fruticultura se ha ido posicionando en Colombia, como una opción de crecimiento y reactivación agrícola, dentro de éstos la pitahaya amarilla (Selenicereus megalanthus Haw.) que es un cactácea silvestre, nativa de la región andina se ha constituido en un renglón importante para la economía del departamento de Boyacá. La presente investigación busca identificar la diversidad genética existente en los municipios productores de la provincia de Lengupá. Para lo cual se seleccionaron 12 materiales de pitahaya amarilla los cuales se caracterizaron con siete marcadores RAMs. Se generaron un total de 154 bandas con pesos moleculares entre 300 y 1450 Kb. A un coeficiente de similaridad de 0,60, se conformaron dos grupos de forma muy laxa. El número de loci polimórficos varió entre 15 y 22 para los cebadores AG y CA, respectivamente, en general la

Recibido para evaluación: 22 de febrero de 2016. **Aprobado para publicación:** 2 de Junio de 2016.

1 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Grupo de Investigación CIDE. I.A, PhD. Fitomejoramiento. Tunja, Colombia.
2 Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Grupo de Investigación CIDE. Ing. Agrónomo. Tunja, Colombia
3 Universidad de los Llanos, Grupo de investigación en Biotecnología Vegetal. I.A, PhD. Fitomejoramiento. Villavicencio, Meta Colombia.

Correspondencia: ana.morillo@uptc.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (11-18) Enero _ Junio 2017

variación encontrada con todos los marcadores fue alta con porcentajes de loci polimórficos comprendidos entre 76% (TG y CCA) Y 98% (CT). El valor promedio de heterocigosidad fue de 0,34 mucho más bajo que lo reportado en otros estudios de diversidad genética en cactáceas, pero más alto que lo encontrado hasta el momento en pitahayas en Colombia usando la técnica RAMs. Por lo tanto, existe variabilidad genética en los materiales de pitahaya amarilla de la provincia de Lengupá la cual puede ser aprovechada en estrategias de mejoramiento genético que busquen la identificación de materiales élite que respondan a las necesidades del mercado.

ABSTRACT

In the last years, the fruit cultivation in Colombia has positioned as an option for growth and agricultural reactivation, within these the yellow pitahaya (Selenicereus megalanthus Haw.) which is a wild, native cactus in the Andean region has become an important sector for the economy of Boyacá. The current investigation seeks to identify the genetic diversity in producers municipalities the province of Lengupá. For that, were selected 12 yellow pitahaya materials it was characterized with seven markers RAMs. A total of 154 bands with molecular weights from 300 to 1450 Kb were generated. A similarity coefficient of 0,60, two groups of very lax manner were formed. The number of polymorphic loci ranged from 15 to 22 for the AG and CA primers, respectively, in general, the variation found with all markers was high with percentages of polymorphic loci ranging between 76% (TG and CCA) and 98% (CT). The average heterozygosity value of 0,34 was much lower than reported in other studies of genetic diversity in Cactaceae, but more higher that founded in pitahayas since now in Colombia using the technique RAMs. Therefore, genetic variability exists in yellow pitahaya materials from province of Lengupá, which can be exploited in breeding strategies seeking the identified of elite materials that responses to the market needs.

PALABRAS CLAVE:
Cactácea, Diversidad Genética, Microsatélites RAMs.

KEY WORDS:
Cactacéa, Genetic Diversity, Microsatellites RAMs.

PALAVRAS-CHAVE:
Cactaceae, Diversidade genética, Microssatélites RAMs.

RESUMO

Nos últimos anos, a fruticultura tem se posicionado na Colômbia, como uma opção de crescimento e renascimento agrícola dentro destes pitahaya amarela (Selenicereus megalanthus Haw.) É um selvagem, cactos nativos da região andina foi constituída em uma linha importante para a economia do departamento de Boyacá. Esta pesquisa tem como objetivo identificar a diversidade genética nos municípios produtores da Província Lengupá. Para trazer a 12 os materiais pitaiaiás amarelos que foram caracterizados com sete marcadores foram selecionados RAMs. Um total de 154 bandas com pesos moleculares de 300-1450 kb foram gerados. Um coeficiente de similaridade de 0,60, dois grupos de forma muito solta é formado. O número de loci polimórficos variou de 15 a 22, para o PG e CA, respectivamente iniciadores, em geral, a variação encontrada com todos os marcadores foi elevadas percentagens de loci polimórficos que variam entre 76% (TG e CCA) e 98% (CT) O valor médio de heterozigosidade foi de 0,34 muito menor do que a relatada em outros estudos de diversidade genética em cactos, mas maior do que o encontrado até agora em Pitahayas na Colômbia utilizando a

técnica de RAMs. Portanto, existe variabilidade genética nos materiais de pitahaya amarela Lengupá província que podem ser exploradas em estratégias de melhoramento que visam identificar materiais de elite para atender as necessidades do mercado.

INTRODUCCIÓN

La pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw.) es un cactácea silvestre, nativa de la región andina que se encuentra distribuida geográficamente en Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela. Es considerada un frutal exótico, debido principalmente a sus características como sabor, apariencia, calidad y propiedades nutraceúticas y con un gran potencial de mercado tanto a nivel nacional como internacional [1]. Colombia ha sido el país pionero en la producción de pitahaya amarilla (*S. megalanthus*), para el año 2013, contó con 691 hectáreas sembradas con este frutal, distribuidas

principalmente en los departamentos de Valle del Cauca, Cundinamarca, Huila, Santander y Boyacá, siendo este último el de mayor área cultivada [2]. Boyacá es uno de los departamentos más ricos en recursos naturales, con una infraestructura energética, vial y de servicios adecuados y una posición geográfica privilegiada que le ha permitido centrar su actividad económica en una agricultura tradicional, en él son 12 los municipios productores de pitahaya a saber: Berbeo, Briceño, Buenavista, Chitaraque, Coper, Miraflores, Otanche, Páez, San Eduardo, Santana, Tunungua y Zetaquira, los cuales tienen el potencial productivo para hacer de la pitahaya un cultivo económicamente rentable [2].

En el plan tecnológico de la cadena productiva de la pitahaya amarilla desarrollado por el Centro Regional de Gestión para la Productividad e Innovación de Boyacá (CREPIB) y el grupo de investigación GIBSO, se llegó a la identificación de la pitahaya como una de las cadenas más productivas para la provincia de Lengupá (Miraflores, Berbeo, Zetaquira, Paéz, San Eduardo) y de algunos problemas relacionados con la calidad de la fruta, el nivel tecnológico, la asociatividad y la falta de material de siembra lo cual conlleva a una baja productividad [3]. Las Universidades y Centros de Investigación han desarrollado trabajos en las áreas de fisiología, fitopatología, genética y agronomía entre otras, con el fin de tratar de dar solución a estos problemas [4,5,6,7]. Estos estudios muestran que sólo existe una variedad de pitahaya y que esto la hace vulnerable a los problemas fitosanitarios por lo cual es necesario llevar a cabo estudios genéticos que conlleven a la identificación de materiales élite que satisfagan las necesidades de la cadena.

La caracterización de la diversidad genética de las poblaciones y la identificación de las especies de pitahaya se hizo anteriormente con base en características morfológicas, sin embargo éstas son fuertemente influenciadas por el ambiente, por lo tanto la identificación molecular se ha convertido en la principal herramienta para la caracterización y manejo de colecciones de germoplasma de muchas especies frutales [8]. La aplicación de este tipo de herramientas biotecnológicas ha permitido identificar las relaciones genéticas entre los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*, evaluar la fertilidad de híbridos triploides y aneuploides entre *Hylocereus polyrhizus* y *Selenicereus megalanthus*, demostrar el origen alopoliploide de estas especies [9,10]. El uso de marcadores moleculares como AFLPs, RAPDs y la secuenciación de regiones específicas del cloroplasto han mostrado existencia de variabilidad genética en las especies de estos géneros [11, 12].

Entre los marcadores microsatélites los RAMs son muy útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales e identificar relaciones entre familias, especies y al interior de la especie, además es una metodología factible para pequeños laboratorios, no requiere información previa. Trabajos sobre la diversidad genética en especies frutales sugieren que la técnica es útil para identificar materiales o accesiones duplicadas dentro de las colecciones de germoplasma y establecer relaciones entre las especies [13,14]. En la provincia de Lengupá no se ha realizado una colecta de materiales silvestres y cultivados para caracterizarlos e identificar su diversidad genética como un punto de partida hacia la identificación de materiales élite. Dentro de este contexto, el objetivo principal de este estudio fue la caracterización de la diversidad genética de los materiales de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) en la provincia de Lengupá, el cual fue desarrollado dentro de un enfoque multidisciplinar en donde participaron la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia con el grupo de investigación CIDE, el CREPIB y los productores de la provincia de Lengupá, Pitafcol y Piedras Verdes, para lograr una primera aproximación al planteamiento de estrategias que conduzcan al mejoramiento genético de estas especies.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (11-18) Enero _ Junio 2017

MÉTODO

Colecta del material vegetal

La colecta de los genotipos de pitahaya amarilla (*S.megalanthus*) se realizó en los municipios productores del departamento de Boyacá como son Berbeo, Zetaquira, Páez, San Eduardo y Miraflores, en fincas de agricultores en donde se seleccionó semilla vegetativa (Cuadro 1).

Establecimiento de la Colección en campo

La siembra del material vegetal se realizó en la finca El pedregal, vereda Rusa en el municipio de Miraflores Boyacá ubicado a 1432 msnm, latitud 5°11' y longitud 73°08', el cual presenta una precipitación promedio de 2500 mm, una temperatura que oscila entre los 18 y 24°C y humedad relativa media de 87%.

Se establecieron un total de 12 materiales de pitahaya provenientes de las fincas de los productores de pitahaya de la zona en estudio.

Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó en los laboratorios de investigación en Biología Molecular de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Dellaporta *et al*. (1983) [15], este se visualizó en geles de agarosa al 0,8% en una cámara Maxicell Primo EC-340 Electroforesis Gel System. La determinación de su concentración se hizo en el fluorómetro Hoefer Dyna Quant 200 y se diluyo en agua HPLC a un volumen total de 100μl a 10 ng/μL y se almacenó a -20°C. Para el análisis RAMs se utilizaron siete cebadores sintetizados por Technologies Inc. Bioneer (Cuadro 2).

Cuadro 1. Sitios de colecta de los materiales de pitahaya amarilla en la provincia de Lengupá.

	Municipio	Vereda	Ubicación geográfica
1	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
2	Berbeo	Batatal	05°13´36"N-73°07´34"W
3	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
4	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
5	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
6	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
7	Zetaquira	Hormigas	05°16´56"N-73°10´08"W
8	Paéz	Yamunta	05°06´04"N-73°03´04"W
9	San Eduardo	Rusa	05°12□00□N-73°03´00"W
10	Miraflores	Rusa	05°31´40"N 74°06´51"W
11	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W
12	Miraflores	Rusa	05°31´40"N -74°06´51"W

Cuadro 2. Primers utilizados en la técnica Microsatélites RAMS.

Cebadores	Secuencia (5´a 3´)
CCA	$DDB(CCA)_5$
CGA	$DHB(CGA)_5$
ACA	$BDB(ACA)_5$
AG	$HBH(AG)_7A$
CT	$DYD(CT)_7C$
TG	$HVH(TG)_7T$
CA	$DBDA(CA)_7$

Las siguientes designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T).

Para la amplificación se preparó el cóctel en un tubo estéril de microcentrífuga (1,5 mL) para un volumen final de 25 μL. La mezcla de reacción se preparó con buffer 1X, $MgCl_2$ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, Taq Polimerasa 1U, cebador 2μM y ADN genómico 10 ng. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 Programmable Termal Controller de MJ Research, Inc. La desnaturalización inicial fue de 95ºC durante 5 minutos; 37 ciclos de desnaturalización a 95ºC por 30 segundos, Hibridación: 58ºC (Primer GT, CGA), 50ºC (Primer AG, CA, ACA), y 55ºC (Primer CCA, TG, CT) durante 45 segundos. Con una extensión de 72ºC por 2 minutos y la extensión final a 72ºC durante 7 minutos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 1,5% a 100 voltios durante 3 horas visualizándose en un transiluminador.

Análisis estadístico de datos

Se generó una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0). La similitud genética entre los materiales evaluados se calculó con el coeficiente de Nei y Li (1979) [16]. El análisis de agrupamiento se realizó por el método UPGMA y se generó un dendrograma empleando el paquete estadístico NTSYS (Numerical Taxonomy System for personal Computer, versión 2.02 PC). Los parámetros de diversidad genética que se estimaron con el programa TFPGA (Tools

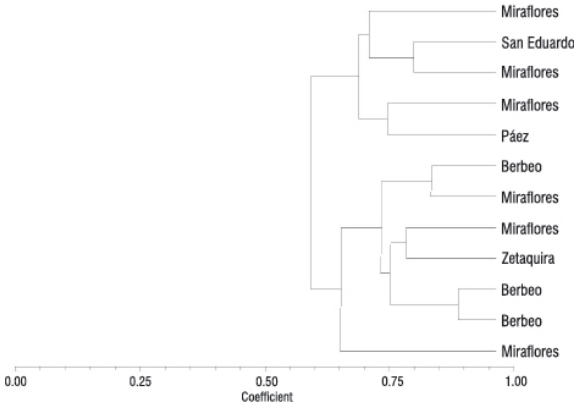
For Population Genetic Analysis, versión 1.3, 1997) fueron el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad insesgada. Se determinó el valor de "F" estadístico insesgado con un intervalo de confianza de 95%. El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se hizo con el programa GenAlEx 6.41.

RESULTADOS

El análisis mediante el coeficiente de Nei-Li [16] a un nivel de similitud del 0,60 originó dos grupos, en el primero encontramos las pitahayas amarillas colectadas en los municipios de San Eduardo, Miraflores y Paéz y en el segundo se incluyen además materiales procedentes de las zonas de Bermeo y Zetaquira (Figura 1). Este nivel de similitud que va desde cero (muestras a idénticas) a uno (muestras distintas) es alto sin embargo es menor a lo reportado en otros estudios de diversidad genética en pitahaya amarilla [6] por lo cual existe variabilidad en los materiales evaluados en la zona de estudio.

Estos materiales están siendo evaluados en un estudio de caracterización morfológica, en donde estos caracteres han mostrado una estructura bastante homogénea, sin embargo se han encontrado caracteres variables en relación al fruto, la pulpa y la semilla (datos sin publicar). Estudios de caracterización morfológica en materiales de pitahaya amarilla procedentes de los departamentos de Boyacá, Huila, Valle del Cauda y Santander, muestran que existe una baja variabilidad la cual no pudo ser separada por sitios geográficos ya que mantienen una misma diversidad genética [6].

Figura 1. Dendrograma de *Pitahaya amarilla* basado en el coeficiente de similitud de Nei-Li y calculado con siete marcadores RAMs, con el método de clasificación UPGMA, SAHN y TREE de NTSYs-pc Versión 1.8.



El agrupamiento encontrado en este estudio muestra que a pesar de la uniformidad morfológica observada y los índices de similitud tan altos (0,79), a que es una especie autógama, con reproducción preferentemente asexual, existe variabilidad lo cual se ve reflejado en que no hay una formación consistente de grupos por origen geográfico sino que hay una distribución laxa de los materiales a través de los sitios evaluados y que hay variabilidad entre los materiales de una misma vereda la cual puede ser aprovechada en la obtención de nuevos materiales de siembra.

Los siete cebadores RAMs utilizados para la caracterización molecular de los materiales de pitahaya amarilla procedentes de la provincia de Lengupá, generaron una matriz de 1848 entradas y se obtuvieron un total de 154 bandas de las cuales se seleccionaron 127 las cuales representan el 82% de polimorfismo. El número de bandas por cebador varió de 19 para el AG y 27 para el CGA, con pesos moleculares entre 300 y 1450 Kb. El número de bandas obtenido en este estudio se consideró adecuado para la estimación de los parámetros genéticos al ser comparados con otros estudios de diversidad genéticas en donde se han usado estos marcadores mandarina (106 bandas) [13], Caducifolios (121 bandas) [14], pitahaya (111 bandas) [17] entre otros. El porcentaje de loci polimórficos para los siete cebadores estuvo comprendido entre 76% (CCA y TG) y 98% (CT), con una heterocigosidad promedio esperada de 0,32 a 0,41 para los cebadores CCA y CT, respectivamente. El cebador CT fue el que permitió encontrar una mayor diferenciación entre los materiales con un Fst de 0,67 (Cuadro 3), lo cual signfica que puede ser útil para estudios de diversidad genética en el género *Hylocereus*. Los estimativos de diferenciación genética fueron muy disímiles para los cebadores (ACA= 0,02 y CT= 0,67), lo cual puede ser debido a la naturaleza misma de cada uno de los marcadores (dominante), en donde la ausencia o presencia de una sola banda es significativa para la determinación de la variabilidad genética.

Para la población total el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad promedio esperada (He) fueron de 82% y 0,36 respectivamente, debido a la naturaleza genética de los materiales, el tipo de marcador, la cobertura del genoma, entre otros. El coeficiente de diferenciación genética obtenido (Fst) al evaluar los materiales de pitahaya con los siete marcadores RAMs fue de 0,34 con una desviación estándar de 0,04 (Cuadro 3). Según Wright (1978) [18], valores mayores de 0,25 muestran una gran diferenciación genética, mostrando así que los grupos formados presentan frecuencias alélicas diferentes.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (11-18) Enero _ Junio 2017

Cuadro 3. Heterosigosidad promedio estimada (*He*) y porcentaje de loci polimórficos para los siete cebadores RAMs evaluados en los materiales de Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*).

Cebador	N° Loci Polim	He estimada	% Loci polimórficos (95%)	Fst	SD
ACA	17	0,37	81	0,02	0,03
AG	15	0,34	79	0,11	0,04
CA	22	0,33	81	0,52	0,06
CCA	16	0,32	76	0,13	0,03
CGA	17	0,38	85	0,09	0,06
CT	21	0,41	98	0,67	0,05
TG	19	0,34	76	0,45	0,05
Total	127	0,36	82	0,34	0,04

El análisis de varianza molecular AMOVA muestra que el 69% de la variación observada en los materiales de pithaya amarilla es explicada por el componente dentro de grupos y tan solo un 31% por la diferenciación entre grupos por lo cual se hace necesario considerar niveles de subdivisión y jerarquización mayores a los contemplados en este estudio, además de altos niveles de variación a nivel intraespecífico, la cual debe ser aprovechada para el planteamiento de estrategias de manejo y conservación de este recurso fitogenético (Cuadro 4). Lo cual también ya habia sido reportando en otros estudios de diversidad genética usando este tipo de marcador [13, 14].

En estudios de diversidad genética en otras especies de la familia Cactacea se han encontrado valores heterocigosidad promedio esperada superior a la reportada en este estudio, en *Uebelmannia pectinifera.* Moraes *et al*. (2014) [19], obtuvieron valores de He entre 0,38 a 0,85, Lozano *et al*. (2015) [20], en la especie *Stenocereus gummosus*, reportaron valores de He entre 0,31 a 0,41 con Fst de 0,29 a 0,38, con estos parámetros genéticos se logró establecer la varibilidad genética presente en esta cactácea. Contreras *et al*. (2015) [21], usando isoenzimas y marcadores microsatélites estudiaron la diversidad genética y la estructura de poblaciones silvestres y cultivadas de *Polaskia chende* (Cactaceae) en México, encontrando más alta diversidad genética con los microsatélites (He= 0,651) que con las isoenzimas (He= 0,479), ambas presentaron mayores valores en las poblaciones silvestres que en las cultivadas. Entre los factores que influencian la alta diversidad genética presente en estas especies cactáceas podemos mencionar, la autoincompatibilidad, la polinización por abejas y la dispersión de las semillas por los pájaros, murciélagos y humanos.

Cuadro 4. Análisis de Varianza Molecular para los grupos formados con los siete marcadores RAMs.

Fuente	Gl	SS	MS	Est. Var.	%
Entre Grupo	1	92,186	92,186	11,461	31%
Dentro Grupo	10	253,314	25,331	25,331	69%
Total	11	345,500		36,792	100%

Hoy en día existen varios materiales de pitahayas en diferentes países, que han sido obtenidos a partir de las especies *Hylocereus*, también se han producido híbridos entre *Hylocereus* spp. y *Selenicereus* spp. Tel-Zur *et al*. (2004, 2005) [9,10]), establecieron las relaciones genéticas entre los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*, mostrando la cercanía genética entre los dos géneros. También evaluaron la fertilidad y potencial para mejoramiento de híbridos triploides y aneuploides entre *Hylocereus polyrhizus* y *Selenicereus megalanthus* encontrando que clones triploides y aneuploides produjeron semillas viables en tanto que el número de semillas por fruto dependió del donante de polen. Estos mismos autores mediante análisis RAPD demostraron la aloploidia más que la autopoliploidia con respecto al origen de estas especies. Con respecto a la diversidad genética de estas especies Legaria *et al*. (2005) [22], con materiales procedentes de México y Colombia encontraron 95% de polimorfismo usando la técnica AFLP.

García *et al.,* 2013 [12], realizaron una caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México utilizando las regiones del cloroplasto *matK, rbcL* y *psbA* y el espaciador intergénico *trn*L-F cómo código de barras. Los resultados encontrados permitieron

identificar distintos niveles de variación intra e interespecífica. Pereira *et al*. (2010) [23], estudiaron la diversidad genética de pitahayas nativas del Cerrado Brasilero con marcadores RAPD, se encontraron altas distancias genéticas debido a que los materiales evaluados no pertenecían todos a la misma especie, los grupos formado no correspondieron con su origen geográfico sin embargo se observó gran diversidad genética. Tao *et al*. (2014) [17], caracterizaron las relaciones genéticas de las accesiones de *Hylocereus* spp por caracteres morfológicos y marcadores ISSR encontrando una gran diversidad genética tanto a nivel morfológico como molecular. Los estudios anteriores ponen de manifiesto una alta variabilidad genética que debe ser usada para generación de nuevos materiales que permitan suplir las necesidades del mercado.

Caetano *et al*. (2011) [6], caracterizaron molecularmente el banco de germoplasma de pitahaya de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira usando la técnica RAMs, la cual permitió discriminar los materiales según el género que pertenecen *Selenicereus* (*S. megalanthus* de Colombia y *Seleniceresus* spp de Brasil) e *Hylocereus*. Además permitió detectar posibles accesiones duplicadas procedentes de los departamentos de Boyacá, Valle del Cauca y Risaralda. En el análisis de agrupamiento se observo que *S. megalanthus* muesta un menor coeficiente de variación con relación a *Hylocereus* spp . La heterocigosidad promedio para la población total fue de 0,14, revelando poco polimorfismo genético en los grupos analizados, lo que sugiere una baja variabilidad entre las accesiones de pithaya amarilla. Estos resultados pueden estar asociados a la naturaleza autógma de la plantas y al tipo de reproducción asexual preferencial en la multiplicación de materiales. El porcentaje de loci polimórficos fue de 53%. Los anteriores resultados son mucho menores a los encontrados en este estudio (He=0,34, loci polimórficos=82), lo cual sugiere que en la zona de estudio existe variabilidad genética, la cual puede ser usada dentro de las estrategias que conduzcan a la identificación de materiales élite adaptados a la zona con mejor producción y un buen comportamiento fitosanitario.

CONCLUSIONES

Los marcadores microsatélites amplificados al azar RAMs dividieron a los materiales evaluados en dos grandes grupos con una distribución laxa de individuos; el valor de heterocigosidad encontrado es más bajo que lo reportado en estudios de diversidad genética en cactáceas pero mucho más alto que lo encontrado en pitahayas en Colombia, lo cual quiere decir que en la provincia de Lengupá hay variabilidad genética debe ser conservada y aprovechada dentro de estrategias de mejoramiento que permitan la identificación de materiales élite que suplan las necesidades del agricultor, productor y consumidor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos al Centro Regional para la Productividad e Innovación de Boyacá (CREPIB), la asociación de productores de pithaya de la provincia de Lengupá (Pitafcol y Piedra Verdes), a los laboratorios de investigación en biología molecular BIOPLASMA y GEBIMOL, a los grupos de investigación Competitividad Innovación y Desarrollo Empresarial (CIDE) (UPTC) y Biotecnología Vegetal y Mejoramiento Genético (Unillanos) y al apoyo financiero de la Dirección de Investigaciones, DIN, de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

REFERENCIAS

[1] SUÁREZ, R. CAETANO, C., RAMÍREZ, H. y MORALES, J. Caracterización morfoanatómica y fisiológica de semilla sexual de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt and Rose. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, 24(2), 2012, p. 97-111.

[2] AGRONET. Red de Información y Comunicación Estratégica del Sector Agropecuario-Agronet-Colombia [on line]. 2013. Disponible: http://www.agronet.gov.co/www/htm3/ReportesAjax/VerReporte.aspx. [Citado 21 de diciembre de 2015].

[3] DUEÑAS, D., VIANCHA, Z. y OCHOA, F. Plan Tecnológico para la cadena productiva de la pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) en la provincia de Lengupá (2013-2018). Tunja (Colombia): Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2013, 48 p.

[4] TAKUMASA, K., MARTÍNEZ, M., MEDINA, J., REBOLLEDO, A. y CARDOZO, C. Manual técnico. Tecnología para el manejo de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran en Colombia [on line]. 2013. Disponible:http://people.scalenet.info/wp-content/uploads/2009/11/Manual-manejo-pitaya-amarilla_2013.pdf. [Citado 13 de Enero de 2016].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (11-18) Enero _ Junio 2017

[5] DALLOS, M., TIRADO, A., MICÁN, Y., FISCHER, G. y RODRÍGUEZ, R. Cactaceae, Pitahaya *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran (Cactaceae). Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales, 10(37), 2010, p. 105-135.

[6] CAETANO, C., TAMAYO, F., MUÑOZ, J., MORALES, J., SUÁREZ, R., SANDOVAL, C., MARTÍNEZ, M., CAÑAR, D., PEÑA, R., SÁNCHEZ, E., GALÍNDEZ, E., ROJAS, R., JIMÉNEZ, J., BENAVIDES, A. y PÉREZ, L. Enfoque multidisciplinario para solución en el agro colombiano: El caso Pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus*. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, 23(1), 2011, p. 52-64.

[7] MARTÍNEZ, R., LIVERA, M. y MÁRQUEZ, G. Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya (*Hylocereus undatus*). Agrociencia, 39(2), 2015, p.183-194.

[8] STANYS, V., FRERCKS, B., SIKSNIANIENE, B., STEPULAITIENE, I., GELVONAUSKIENE, D., STANIENE, G. and BOBINAS, C. Identification of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using AFLP and SSR markers. Žemdirbysté=Agriculture, 99(4), 2012, p.1392-1396.

[9] TEL-ZUR, N., ABBO, S., BAR, D. and MIZRAHI, Y. Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): evidence from hybridization and cytological studies. Annals of Botany, 94(4), 2004, p. 527-534.

[10] TEL-ZUR, A., ABBO, S. and MIZRAHI, Y. Cytogenetics of semi-fertile triploid and aneuploidy intergeneric vine cacti hybrids. Journal of Heredity, 96(2), 2005, p. 124-131.

[11] ZHANG, X. and SOMASUNDRAM, C. Extraction of genomic DNA from roots and leaves of *Hylocereus undatus.* Journal of Plant Science, 60(3), 2012, p. 345-348.

[12] GARCÍA, M., TERRAZAS, T., LEÓN, O., ARIAS, S., VIBRANS, H. y LÓPEZ, L. Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. Revista Fitotecnia Mexicana, 36(1), 2013, p.13-22.

[13] MORA, S., MORILLO, Y., MORILLO, A., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de 30 accesiones de mandarina (*Citrus reticulata*) del banco de germoplasma de Corpoica-Palmira. Investigación Agropecuaria, 10(2), 2013, p. 161-172.

[14] MORILLO, A., MORILLO, Y., GONZÁLEZ, L. y ÁVILA, I. Variabilidad interespecífica de duraznos (*Prunus pérsica* L. Batsch.) y ciruelos (*Prunus domestica*) usando RAMs. Revista Colombiana de Biotecnología, 17(1), 2015, p. 61-69.

[15] DELLAPORTA, S., WOOD, J. and HICKS, J. A plant DNA minipreparation: Versión II. Plant Molecular Biology Reporter, 1(4), 1983, p.19-21.

[16] NEI, M. and LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriccion endonucleasa. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(10), 1979, p. 5269-5273.

[17] TAO, J., QIAO, G., WEN, X., GAO, G., LIU, T., PENG, Z., CAI, Y., CHEN, N., YAN, F. and ZHANG, B. Characterization of genetic relationship of dragon fruit accesions (*Hylocereus* spp.) by morphological traits and ISSR markers. Scientia Horticulturae, 170(7), 2014, p. 82-88.

[18] WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations. Chicago (USA): University of Chicago Press, 1978, 566 p.

[19] MORAES, E., CIDADE, F., SILVA, G. and MACHADO, M. Polymorphic microsatellite markers for the rare and endangered cactus *Uebelmannia pectinifera* (Cactaceae) and its congeneric species. Genetics and Molecular Research, 13(4), 2014, p. 10359-10366.

[20] LOZANO, O., LEÓN, J., FAVELA, S. and GARCÍA, F. New interpretations about clonal architecture for the sour pitaya (*Stenocereus gummosus*, Cactaceae), arising from microsatellite markers of *de novo* isolation and characterization. Open Journal of Genetics, 5(1), 2015, p.1-11.

[21] CONTRERAS, G., RUÍZ, M., CABRERA, D., CASAS, A., VARGAS, O. and PARRA, F. Genetic diversity and structure of wild and managed populations of *Polaskia chende* (Cactaceae) in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico: insights from SSR and allozyme markers. Genetics Resources and Crop Evolution, 62(1), 2015, p. 85-101.

[22] LEGARIA, J., ALVARADO, M. y GASPAR, R. Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). Revista de Fitotecnia Mexicana, 28(3), 2005, p. 179-185.

[23] PEREIRA, K., GELAPE, F., VILELA, N., BELLON, G., DE LIMA, C. and DE SOUZA, L. Diversidade genética de pitayas nativas Do Cerrado com base em marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, 32(3), 2010, p. 819-824.

INFLUENCIA DE MICROORGANISMOS EN LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN PLÁNTULAS DE CAFÉ (*Coffea arabica*)

INFLUENCE OF MICROORGANISMS IN PHOSPHORUS AVAILABILITY OF COFFEE SEEDLINGS (*Coffea arabica*)

INFLUÊNCIA DE MICRORGANISMOS NA DISPONIBILIDADE DE FÓSFORO EM PLÂNTULAS DE CAFÉ (*Coffea arabica*)

CARLOS A. CISNEROS R.[1,2], JAIME MARTÍN FRANCO[3], MARCELA REALPE FERNÁNDEZ[4], JUAN CARLOS FUENMAYOR [4]

RESUMEN

En Colombia la mayoría de los suelos muestran deficiencia de fósforo disponible, fundamental para el desarrollo de las plantas. Para superar esta dificultad de orden natural y mitigar la demanda de fósforo del suelo, últimamente se adicionan microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF). En esta investigación, se estudiaron los microorganismos Kocuria sp., B. subtilis, S. diversispora y P. ochrochloron y el efecto que tienen sobre la disponibilidad de fósforo, en el desarrollo de plántulas de café, bajo condiciones de invernadero, con 23 tratamientos y 10 repeticiones, en diseño estadístico, completamente al azar. Los experimentos se desarrollaron en un suelo Typic Melanudand con pulpa de café descompuesta

Recibido para evaluación: 4 de Mayo de 2016. **Aprobado para publicación:** 13 de Septiembre de 2016.

1 Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Profesor Catedrático, Grupo de investigación en Micología. Químico M.Sc. y Doctor en Ciencias Agrarias. Cali, Colombia

2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Administración, Departamento de Ciencias Básicas, Profesor Asociado. Palmira, Colombia

3 Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Grupo de investigación Química y Biotecnología – Quibio. Profesor Catedrático, Doctor en Ciencias Química. Cali, Colombia.

4 Universidad Santiago de Cali, Facultad de Ciencias Básicas, Programa de Química, Químico. Cali, Colombia

Correspondencia: cacisnerosr@unal.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (19-26) Enero _ Junio 2017

y microorganismos (tratamientos 1-11), adición de roca fosfórica (tratamientos 12-22) y un testigo Typic Melanudand, fertilizado con fosfato diamónico (tratamiento 23). Los resultados mostraron que la aplicación de pulpa de café descompuesta con y sin roca fosfórica y microorganismos, favoreció la disponibilidad de fósforo, reflejándose en el crecimiento de las plántulas de café, en el análisis químico del suelo y en las variables de respuesta del fósforo y el área foliar. Se encontró además, una relación inversa entre la concentración de polifenoles y fósforo en suelo y planta.

ABSTRACT

Most soils in Colombia shown available phosphorus deficiency, which is a fundamental element for the plants development. In order of overcome this natural difficulty and mitigate the demand for phosphorus in the soils, phosphate solubilizing microorganisms (PSM) are added. In this research, were studied the microorganisms Kocuria sp., B. subtilis, S. and P. diversispora ochrochloron and the effect they have on the availability of phosphorus in the development of coffee seedlings under greenhouse conditions, with 23 treatments and 10 replications in statistical design, completely randomized. The experiments were carried out in Typic Melanudand soil with decomposed coffee pulp and presence or absence of microorganisms (treatments 1-11) and adding phosphate rock (12 to 22 treatments). Typic Melanudand was used as a witness in the treatment 23, fertilized with diammonium phosphate. The results showed that the application of decomposed coffee pulp with and without phosphate rock and microorganisms, favored the availability of phosphorus, reflected in the growth of coffee seedlings, in the chemical analysis of the soil and the response variables match and leaf area. There was an inverse relationship between polyphenols and phosphorus in soil and plant.

PALABRAS CLAVE:
Solubilizadores de fosfatos, Polifenoles, Suelo, Área foliar, Biofertilizadores, Fósforo disponible

KEYWORDS:
Phosphate solubilizers, Polyphenols, Soil, Foliar area, Biofertilizers, Available phosphorus.

PALABRAS CHAVE:
Solubilizadores de fosfatos, Polifenóis, Solo, Área foliar, Biofertilizadores. fósforo disponível

RESUMO

Na Colômbia a maioria dos solos apresentam deficiência de fósforo, um elemento fundamental para o desenvolvimento das plantas. Para superar esta dificuldade de ordem natural e diminuir a demanda de fósforo do solo, ultimamente são adicionados microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF). Nesta pesquisa foram estudados os microrganismos Kocuria sp., B. subtilis, S. diversispora y P. ochrochloron e o efeito que tem sob a disponibilidade do fósforo, no desenvolvimento de plântulas de café em estufa, com 23 tratamentos e 10 repetições utilizando-se desenho estatístico completamente ao acaso. Os experimentos foram desenvolvidos em soloTypic Melanudand com polpa de café decomposta e microrganismos (1-11 tratamentos), adição de rocha fosfórica (12-22 tratamentos) e Typic Melanudand como testemunha, fertilizado com fosfato diamônico (tratamento 23). Os resultados mostraram que a aplicação de polpa de café decomposta com e sem rocha fosfórica e microrganismos, favoreceu a disponibilidade do fósforo, refletindo-se no crescimento das plântulas de café, na análise química do solo e nas variáveis de resposta do fosforo e na área foliar. Além disso, encontrou-se uma relação inversa entre a concentração de polifenóis e fósforo no solo e na planta.

INTRODUCCIÓN

El café, género Coffea y familia rubiácea, variedad Castillo fue desarrollado en Colombia por el Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ [1] y entregado a agricultores nacionales [2]. El cultivo de esta variedad, requiere suelos de estructura granular, porosos y permeables, ricos en fósforo (P) y materia orgánica [2,3]. En Colombia, los suelos destinados al cultivo del café, en su mayoría de origen volcánico, poseen baja disponibilidad del P, por la acidez, debido a la presencia de aluminosilicatos no cristalinos y elevadas concentraciones de Fe y Al. Estos suelos están ubicados en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda, Antioquia, Valle del Cauca, Tolima y también en el Cauca [4]; en ellos, es común la aplicación de fertilizantes químicos y la adición de materia orgánica para mejorar la disponibilidad de los nutrientes y conseguir el balance alimenticio de la planta. Los MSF se emplean en menor escala; su uso es incipiente y merece más estudio y escalamiento [5,6]. La aplicación de preparados microbianos biofertilizantes en el cultivo de café, representa una opción amigable con el medio ambiente, para evitar el uso continuo de fertilizantes químicos. En la actualidad, en Colombia se sabe poco acerca de los microorganismos que podrían ser asociados al cultivo del café (Coffea arabica) y su acción en el desarrollo de la planta [6,7]. En consideración a mejorar el conocimiento de la biofertilización, se estudió el efecto en plántulas de café (Coffea arábica variedad Castillo), de cuatro microorganismos solubilizadores de fosfato, dos hongos (Sagenomella diversispora, Penicillium ochrochloron) y dos bacterias (Kocuria sp, Bacillus subtilis), utilizando 23 tratamientos, con el fin de evaluar finalmente, el contenido de fósforo en el suelo y en la planta; al igual que, los polifenoles presentes en el tejido vegetal.

MÉTODO

El estudio se realizó en los laboratorios de Química de la Universidad Santiago de Cali del Municipio de Cali (Departamento del Valle del Cauca, Colombia) y en una finca del corregimiento El Palmar, Municipio de Dagua (Departamento del Valle del Cauca, Colombia). Los microorganismos solubilizadores de fosfatos, se aislaron en estudios previos, de la rizósfera de plantas de café, variedad Caturra de cuatro meses de edad, sembradas en un suelo *Typic Melanudand* del Municipio de Cajibio (Departamento del Cauca, Colombia). Posteriormente, se seleccionaron en la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, los microorganismos *Kocuria* sp., *Bacillus subtilis*, *Sagenomella diversispora* y *Penicillium ochrochloron,* todos de reconocida capacidad solubilizadora de fosfatos tricálcicos, de aluminio y de hierro [7,8].

Para llevar a cabo el experimento, CENICAFÉ suministró 1000 semillas, las cuales se sembraron en arena de cuarzo esterilizada, en un germinador de madera y se mantuvieron bajo condiciones ambientales por 80 días, con riego de agua destilada. Posteriormente, el sistema radicular de las plántulas más homogéneas se inoculó con los microorganismos. Aquellas que presentaban un par de hojas cotiledóneas y un par de hojas verdaderas, se sumergieron en suspensión fúngica de $1x10^6$ UFC/mL y solución bacteriana de $1x10^8$ UFC/mL por 30 minutos, a temperatura ambiente, en condiciones asépticas. Se sembraron en bolsas de polietileno negro (17 x 23 cm), con la mezcla de 1,0 kg del suelo de origen de los microorganismos (*Typic Melanudand*) y pulpa descompuesta de café en una proporción 1:1 (t: 2-3 h) [9]. Las bolsas se ubicaron a 4-5 cm de distancia, en invernadero con polisombra (60%). En el Cuadro 1, se muestran los tratamientos empleados.

Las plántulas se regaron 2 o 3 veces por semana, durante seis meses. Después, se midió la variación del pH potenciométrico en agua 1:1 [10], *Materia Orgánica*: método Walkley-Black [10], *Fósforo en suelo*: método Bray II [10], *Fósforo foliar*: espectrofotometría, método azul de molibdeno [10], *Contenido de fenoles*: método de Folin – Ciocalteu [11], Área foliar (AF): analizador LI-3100C Área Meter; se empleó 71 hojas x 20 plantas de *Coffea arabica,* Var. Castillo, con muestreo al azar, de diferente tamaño y edad.

Se hizo regresión lineal con el largo (Lh), ancho máximo (Ah) y el producto de ellos (Lh x Ah). Se escogió el modelo AF = 0,67574 (Lh x Ah), por el mayor coeficiente de determinación, $R^2 = 0,9987$ [12]. El modelo seleccionado se aplicó en el cálculo del área foliar estimada [13]. El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento, tomando la planta como unidad experimental.

Para el estudio estadístico, se hizo análisis de varianza de las variables de respuesta y en la prueba de Tukey se utilizó como criterio, la comparación de promedios, con nivel de significancia del 5% (software SAS versión 9.3, 2010).

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (19-26) Enero _ Junio 2017

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.

Sustrato	Tratamiento	Descripción
Suelo + Pulpa de Café descompuesta	1 a 11	Sin MSF, B1, B2, H1, H2, B1*B2, H1*H2, B1*H1, B1*H2, B2*H1, B2*H2
Suelo + Pulpa de Café descompuesta + RF (40 ppm) [10]	12 a 22	Sin MSF, B1, B2, H1, H2, B1*B2, H1*H2, B1*H1, B1*H2, B2*H1, B2*H2
Suelo + DAP (2 g/ planta)	23	Sin MSF

B1: *Kocuria* sp., B2: *Bacillus subtilis*, H1: *Sagenomella diversispora*, H2: *Penicillium ochrochloron*. RF: Roca fosfórica, DAP: fosfato diamónico

RESULTADOS

El pH y el contenido de materia orgánica (MO), del suelo antes y después de los almácigos, con los diferentes tratamientos, son mostrados en el Cuadro 2. En conformidad con la literatura, el suelo Andisol (*Typic Melanudand*), usado inicialmente, exhibió un pH ácido, altas concentraciones de materia orgánica (MO) y contenido de fósforo, relativamente bajo [14].

Después de los almácigos de café, excepto en los tratamientos con RF: 13 (*Kocuria* sp.), 20 (*Kocuria* sp. + *Penicillium ochrochloron*), 21 (*Bacillus subtilis* + *Sagenomella diversispora*), 22 (*Bacillus subtilis* + *Penicillium ochrochloron*) y el 23 (testigo absoluto), se observó con la adición de la pulpa de café, un incremento en la MO y el pH, consistente con el reporte de Diallo *et al*, 2016 [15]. Cuando se usó DAP, en el testigo absoluto aumentó la acidez, por liberación de iones H^+, en la nitrificación de iones amonio [16].

Fósforo en suelo

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En el Cuadro 3, se muestra que la mayor concentración de P se consiguió en los tratamientos sin RF: 9. (*Kocuria* sp. + *P. ochrochloron*), 10. (*B. subtilis* + *S. diversispora*) y 11. (*B. subtilis* + *P. ochrochloron*).

Cuadro 2. Acidez y MO del suelo-almácigos de café.

Tratamiento	pH	MO (g/kg)
Suelo inicial*	5,08	207,09
1	5,24	248,43
2	5,38	268,69
3	5,40	267,10
4	5,30	248,05
5	5,25	256,79
6	5,27	262,35
7	5,35	242,51
8	5,31	253,62
9	5,57	283,78
10	5,26	252,84
11	5,22	279,23
12	5,36	278,23
13	5,03	239,37
14	5,17	256,03
15	5,18	253,65
16	5,10	242,55
17	5,11	237,00
18	5,22	261,59
19	5,10	275,07
20	4,98	268,73
21	4,99	251,29
22	5,07	262,39
23	4,45	214,84

*Condiciones antes del experimento

Por su parte, el menor contenido de P se dio en suelo con RF, con los tratamientos: 12 (no inoculado), 18 (*S. diversispora* + *P. ochrochloron*), 20 (*Kocuria* sp. + *P. ochrochloron*) y 22 (*B. subtilis* + *P. ochrochloron*).

Los resultados obtenidos, exhibidos en el Cuadro 3, son consistentes con los, reportados por Cisneros, Sánchez de P. y Menjivar [16,17], en la respuesta positiva de los almácigos de café, cuando se adiciona pulpa de café, para suplir las necesidades nutricionales propias del desarrollo y crecimiento de la planta. En la Figura 1, se observa una clara diferencia entre el tratamiento 23 (testigo) y otros, en cuanto al tamaño de la planta, longitud y peso.

Cuadro 3. Variación de propiedades por tratamiento.

Trat.	P, suelo (mg/kg) (P inicial 1,92)		P, tejido vegetal (%)		Polifenoles (g-ácido tánico/ g-muestra)	
1	6,22	defg	0,25	de	7,85	bc
2	5,07	hi	0,24	ef	5,98	bcdef
3	6,10	defg	0,27	ab	6,46	bcdef
4	8,98	b	0,23	fg	4,92	bcdef
5	7,32	d	0,22	gh	3,78	f
6	5,26	ghi	0,28	a	4,31	ef
7	6,68	def	0,26	cd	5,14	bcdef
8	6,62	defg	0,21	hi	4,82	cdef
9	11,57	a	0,26	bc	3,88	f
10	10,84	a	0,27	ab	7,69	bcd
11	10,95	a	0,24	ef	5,43	bcdef
12	3,63	j	0,24	ef	5,26	bcdef
13	5,94	efgh	0,20	i	3,96	f
14	5,72	fgh	0,22	gh	6,77	bcdef
15	5,87	efgh	0,20	i	8,04	b
16	7,08	de	0,21	hi	6,49	bcdef
17	5,72	fgh	0,24	ef	7,43	bcd
18	3,68	j	0,24	ef	4,62	def
19	5,78	efgh	0,24	ef	5,96	bcdef
20	3,91	ij	0,24	ef	4,13	ef
21	8,70	bc	0,23	fg	7,25	bcde
22	4,24	hij	0,22	gh	5,18	bcdef
23	7,38	cd	0,11	j	29,3	a

Nota: promedios con la misma letra no difieren estadísticamente

Figura 1. Efectos en el crecimiento y desarrollo.

El resultado confirma que el uso de microorganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) mejora la disponibilidad de P en el suelo; en conformidad con el reporte de Muleta *et al*., 2013 [5] sobre el efecto positivo de la aplicación de bacterias como biofertilizantes, en el desarrollo de la planta.

Patiño y Sánchez (2014), Sohail *et al.,* (2014), Abbasi *et al*., (2015) [18-20] concluyen que la fertilización con RF es útil en ambientes tropicales, con mejor respuesta en suelos ácidos deficientes en P, especialmente.

Es importante resaltar que los tratamientos sin RF inoculados con los cuatro microorganismos presentaron los valores más altos en pH y contenido de MO, y P, con respecto a los demás tratamientos. Este resultado, posiblemente se deba a un efecto sinérgico entre los microorganismos inoculados y los nativos presentes en la mezcla suelo-pulpa de café, los cuales se encargaron de incrementar la disponibilidad del P procedente de la mineralización de la pulpa de café como MO, solubilidad de fosfatos insolubles, y la desorción del elemento adsorbido en la superficie coloidal. Estos procesos están asociados con la producción de ácidos orgánicos y enzimas fosfatasas por parte de los microorganismos y raíces de las plántulas [18,21].

Fósforo en tejido vegetal

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos. De acuerdo con los resultados obtenidos, el testigo absoluto (tratamiento 23) presentó la menor concentración de P foliar; mientras que, los tratamientos sin RF, 3 (*B. subtilis*), 6 (*Kocuria sp.* + *B. subtilis*), 9 (*Kocuria sp.* +*P. ochrochloron*) y 10 (*B. subtilis* + *S. diversispora*) presentaron mayor cantidad de fósforo foliar.

Similar al contenido de P en el suelo, se encontró una ligera tendencia en el aumento de P en los tratamientos sin roca fosfórica, consecuente con la incidencia que tuvo en los tratamientos en los que se aplicó.

En general, el contenido de P foliar aumentó con el desarrollo de las plántulas de café (Figura 1), lo cual indica que el suelo, habría sido capaz de suministrar a la planta sus requerimientos nutricionales. El contenido de P foliar de 0,20-0,28%, fue similar al reportado por otros investigadores [22,23].

Polifenoles en tejido vegetal

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre los tratamientos. En esta consideración, se incluye

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (19-26) Enero _ Junio 2017

que el testigo absoluto reveló el mayor contenido de polifenoles; mientras que en los tratamientos 5 (sin RF, *P. ochrochloron)*, 9 (sin RF, *Kocuria sp.* + *P. ochrochloron)* y 13 (con RF, *Kocuria sp.*), el contenido de estas sustancias, fue menor. Estos resultados corresponden a una relación inversa entre los contenidos de P (suelo y planta) y la presencia de polifenoles. Posiblemente, se relaciona con el papel de los polifenoles en la planta, especialmente, como protectores contra el estrés ambiental y reguladores de los procesos del suelo, relacionados con la disponibilidad de nutrientes [24]. En investigaciones anteriores [25], se determinó que el aporte de fertilización fosfórica provocó el crecimiento de la planta y la disminución del contenido de fenoles totales en las acidulas juveniles de una especie de pino (*Pina pinaster*).

Área foliar

En esta investigación, también se evaluó, como complemento a los resultados anteriores, el efecto que los microorganismos tuvieron en el crecimiento y desarrollo de la planta, representado en las hojas. El análisis de varianza de los datos del área foliar mostró diferencias significativas entre algunos tratamientos. Los resultados indican que el tratamiento 7 inoculado con la interacción fúngica (sin RF) presentó el valor más alto de área foliar, mientras que el testigo absoluto, fue el menos desarrollado, con valores significativamente menores, apreciados en el Cuadro 4 y en la Figura 1.

Cuadro 4. Valor promedio de área foliar / tratamiento.

Tratamiento	Área foliar (cm²)	
1	54,01	abcd
2	58,15	abcd
3	57,01	abcd
4	58,14	abcd
5	59,37	abcd
6	61,95	abc
7	64,88	a
8	53,96	abcd
9	56,31	abcd
10	60,93	abcd
11	55,43	abcd
12	46,09	cd
13	47,56	bcd
14	56,59	abcd
15	54,54	abcd
16	47,22	bcd
17	63,74	ab
18	55,52	abcd
19	55,62	abcd
20	56,04	abcd
21	49,42	abcd
22	44,6	d
23	11,61	e

La promoción del crecimiento y desarrollo vegetal está relacionada con la capacidad de cada microorganismo, de producir sustancias químicas, tipo fitohormonas, como el ácido indol acético, citocininas, giberelinas y etileno, entre otras [26]. El mayor incremento en el número de hojas de las plantas inoculadas se considera que se debe a un aumento en la capacidad de absorción de los nutrientes a través del sistema radical de la planta, inducido por los microorganismos [27].

Para el caso de testigo se observó que, a pesar de presentar un buen número de hojas por planta, éstas eran demasiado pequeñas en comparación con las de los demás tratamientos, lo cual se ve reflejado en los resultados de área foliar.

CONCLUSIONES

La adición de pulpa de café descompuesta al suelo *Typic Melanudand*, en presencia o ausencia de RF, incrementó la cantidad de materia orgánica y el pH, mejorando la disponibilidad de fósforo.

Los aislamientos microbianos solubilizadores de fosfatos *Kocuria sp.*, *B. subtilis*, *S. diversispora* y *P. ochrochloron*, , se adaptaron a la rizósfera de plántulas de café (*Coffea arábica,* variedad Castillo) e incrementaron la disponibilidad de fósforo en el suelo (*Typic Melanudand*), mezclado con pulpa de café y también, la absorción en tejido vegetal, debido a la posible mineralización de la pulpa en ausencia de roca fosfórica, presentándose diferencias significativas en la respuesta del área foliar como variable de desarrollo, respecto al testigo absoluto.

Se demostró una relación inversa entre el contenido de P en suelo y planta, y la concentración de polifenoles, siendo correlacionada con el desarrollo de las plántulas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Santiago de Cali (Programa de Química) y Universidad Nacional de Colombia (Sede Palmira), por apoyar la fase experimental.

REFERENCIAS

[1] ALVARADO, G. y OCHOA, H. Características fenotípicas de componentes de variedad castillo® en dos ambientes. Cenicafé, 57(2), 2006, p. 100-121.

[2] RAMOS, H.F. El Sistema de producción del cafeto en Colombia. Palmira (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Taller de Publicaciones, 2014, 94 p.

[3] NÚÑEZ, P.A, PIMENTEL, A., ALMONTE, I. *et al*. Soil fertility evaluation of coffee (*Coffea spp*.) production systems and management recommendations for the Barahona Province, Dominican Republic. Journal of soil science and plant nutrition, 11(1), 2011, p. 127-140.

[4] SÁNCHEZ, J.A., y RUBIANO, Y. Procesos específicos de formación en andisoles, alfisoles y ultisoles en Colombia. Revista EIA, 12(2), 2015, p. E85-E97.

[5] MULETA, D., ASSEFA, F., BÖRJESSON, E. *et al.* Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 12, 2013, p.73–84.

[6] ARENAS, M., RESTREPO, S., LOZANO, C.N. y RAMÍREZ, C.A. Efecto de aislados PGPR formadores de endospora sobre café en etapas de germinación y almácigo. Memorias XVII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Popayán (Colombia): Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, 2014, 210 p.

[7] CISNEROS, C., PATIÑO, C. y SÁNCHEZ, M. Solubilización de fosfatos por microorganismos asociados a suelos de tres agroecosistemas cafeteros de la zona andina colombiana. Memorias XVII Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. Popayán (Colombia): Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, 2014, p. 283-287.

[8] CISNEROS, C. y SÁNCHEZ, M. Solubilización de fosfatos por hongos asociados a un Andisol de tres agroecosistemas cafeteros de la región andina colombiana. Ingenium, 9(25), 2015, p. 37-46.

[9] SADEGHIAN, S. Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia: Guía práctica. Chinchiná (Colombia): Boletín Técnico No 32, Gerencia Técnica. Chinchiná (Caldas): Programa de Investigación Científica, Centro Nacional de Investigaciones del Café “Pedro Uribe Mejía” (CENICAFÉ), 2008, 227 p.

[10] COLOMBIA. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). Manual de métodos de análisis del LSA. MANLST01. Métodos de Análisis de Suelos del LSA. Palmira (Colombia): Capítulo 1, En revisión, 2013.

[11] OJEDA, A., FRÍAS, A., GONZÁLEZ, R. *et al*. Contenido de taninos, fósforo fítico y actividad de fitasas en el grano de 12 híbridos de sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L) Moench). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 60(1), 2010, p. 93-98.

[12] DA SILVA, W.Z., BATISTA, S.V., TOMAZ, M.A., *et al*. Métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, 7(13), 2011, p. 746- 759.

[13] CABEZAS, M., PEÑA, F., DUARTE, H.W. *et al*. Un modelo para la estimación del área foliar en tres especies forestales de forma no destructiva. Revista Actualidad & Divulgación Científica, 12(1), 2009, p. 121-130.

[14] BRAVO, I., MONTOYA, J.C. y MENJIVAR, J.C. Retención y disponibilidad de fósforo asociado a la materia orgánica en un *Typic Melanudands* del Departamento del Cauca, Colombia. Acta Agronómica, 62(3), 2013, p. 261-267.

[15] DIALLO, N.H., ASSIGBETSE, K., SALL, S. *et al*. Response of Soil Microbial Properties to Long-Term Application of Organic and Inorganic Amendments in a Tropical Soil (Saria, Burkina Faso). Open Journal of Soil Science, 6, 2016, p. 21-33.

[16] CISNEROS, C.A., SÁNCHEZ, M. y MENJIVAR, J.C. Influencia de microorganismos solubilizadores de fósforo del suelo y el efecto sobre plántulas de café. Bioagro 28(2), 2016, aún en edición.

[17] CISNEROS, C.A., SÁNCHEZ, M. y MENJIVAR, J.C. Efecto de bacterias solubilizadoras de fosfatos sobre el desarrollo de plántulas de café. Agronomía Mesoamericana, 2016, en edición.

[18] PATIÑO, C.O. y SANCLEMENTE, O.E. Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. Entramado, 10(2), 2014, p. 288-297.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (19-26) Enero _ Junio 2017

[19] SOHAIL, A.Q., AMBRIN, R., MEHRUNISA, M. *et al*. Nutrient composition of rock phosphate enriched compost from various organic wastes. Journal of Science Research, 2, 2014, p. 047-051.

[20] ABBASI, M.K., MUSA, N. and MANZOOR, M. Phosphorus release capacity of soluble P fertilizers and insoluble rock phosphate in response to phosphate solubilizing bacteria and poultry manure and their effect on plant growth promotion and P utilization efficiency of chilli (*Capsicum annuum* L.). Biogeosciences Discussion, 12, 2015, p. 1839–1873.

[21] BELTRÁN, M.E. La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. CORPOICA Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 15, 2014, p. 101-113.

[22] SILVA, S. and LIMA, J. Spatial estimation of foliar phosphorus in different species of the genus Coffea based on soil properties. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 38, 2014, p. 1439-1447.

[23] DIAS, K., FURTINI, A.E., GONTIJO, P.T. *et al*. Coffee yield and phosphate nutrition provided to plants by various phosphorus sources and levels. Ciência e Agrotecnologia, 39, 2015, p. 110-120.

[24] EICHENBERG, D. Plant polyphenols in the context of biodiversity-ecosystem functioning [Ph.D. Thesis]. Halle-Wittenberg (Germany): Martin-Luther University, 2014.

[25] LÓPEZ, B. Efecto de la disponibilidad de fósforo y variabilidad genética en las defensas constitutivas e inducidas con metil jasmonato: Concentración foliar de fenoles totales en juveniles de *Pinus pinaster* [Tesis Ingeniería Técnica Forestal]. Santiago de Compostela (España): Universidad Santiago de Compostela, Escuela Politécnica Superior Benigno Ledo, 2008.

[26] ANGULO, V.C., SANFUENTES, E.A., RODRÍGUEZ, E. e SOSSA, K. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. Revista Argentina de Microbiología, 46(4), 2014, p.338-347.

[27] IBARRA, J.C., AGUIRRE, J.F., LEY, A., *et al. Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner inoculado con micorriza y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. Revista Chapingo Serie Horticultura, 20(2), 2014, p. 201-213.

ELABORACIÓN DE QUESITO ANTIOQUEÑO REDUCIDO EN SODIO Y ADICIONADO CON *Bifidobacterium lactis*

MANUFACTURE OF LOW SODIUM QUESITO ANTIOQUEÑO ADDED WITH *Bifidobacterium lactis*

DESENVOLVIMENTO DE QUESITO ANTIOQUEÑO REDUÇÃO DE SÓDIO E ADICIONADO COM *Bifidobacterium lactis*

EDINSON ELIÉCER BEJARANO-TORO[1]; JOSÉ URIEL SEPÚLVEDA-VALENCIA[2];
GUILLERMO CORREA-LONDOÑO[3]

RESUMEN

El Quesito Antioqueño (QA), es un queso fresco, blando, molido y salado en masa, sin adición de bacterias. Este contiene 2,1% de cloruro de sodio (NaCl). Fue adicionado con Bifidobacterium lactis (bb12) y salado con NaCl (Q1) y mezclas de NaCl/KCl (3:1 (Q2) y 1:1 (Q3), p/p), buscando reducir el contenido de sodio y darle características probióticas. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Q1, Q2 y Q3) (P>0,05) en algunas variables composicionales humedad, MG/MS, proteína total, cenizas, acidez), químicas (pH) y físicas (a_w, dureza (N), adhesividad ((Joules) 10^6), elasticidad (mm), cohesividad, gomosidad (N), masticabilidad ((Joules)* 10^6), resiliencia). Se observaron diferencias significativas en la humedad, pH, contenido de proteína y acidez por efecto del tiempo de almacenamiento (P<0,05). Con respecto al contenido de Na y K, hubo diferencias*

Recibido para evaluación: 11 de Abril de 2015. **Aprobado para publicación:** 6 de Enero de 2017.

1 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (GICTA). MSc. Ciencia y Tecnología de Alimentos Medellín, Colombia. eebejara@unal.edu.co.

2 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (GICTA). MSc. Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín, Colombia. jusepul@unal.edu.co.

3 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Ingenieria Agronomica, Medellín, Colombia. gcorrea@unal.edu.co.

Correspondencia: eebejara@unal.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (27-35) Enero _ Junio 2017

significativas entre los tratamientos (P<0,05) pero no así en el contenido de Ca. En Q2 el contenido de Na se redujo en 24,2% y el K aumentó en 143% en promedio; para Q3 el Na se redujo en 48,3% y el K aumentó en 311%. El quesito antioqueño elaborado con una sustitución del 50% del Na por K mantiene las características composicionales y fisicoquímicas del producto tradicional, por lo tanto, según los resultados de esta investigación, se puede realizar esta sustitución y además funciona como una excelente matriz para incluir probióticos en la dieta.

ABSTRACT

The quesito antioqueño (QA), fresh, soft, milled and salty cheese, without added bacteria. This cheese contains 2,1% of sodium chloride. Were supplemented with *Bifidobacterium lactis* (bb12) and It was salty with NaCl (Q1) and some mixtures of NaCl/KCl (3:1 (Q2)) and 1:1 (Q3), w/w), to reduce the sodium content and give probiotic characteristics. There were no significant differences between treatments (Q1, Q2 and Q3) ($P>0,05$) in some compositional (moisture, MG/MS, total protein, ash, acidity), chemical (pH) and physical (hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness, gumminess, chewiness, resilience) characteristics. A significant difference was observed by storage time in moisture, pH, protein content and acidity ($P<0,05$). With respect to Na and K content, there was a significant differences between treatments ($P<0,05$) but was not in the Ca content. In Q2 the Na level was decreased 24,2% and K increased 143% in average; in Q3 the Na level was decreased 48,3% and K increased 311%. The processed QA with 50% of Na substitution maintains the traditional compositional a physicochemical characteristics, therefore, according to this investigation results, can be performed this substitution and it is an excellent matrix to include probiotics in the people diet.

PALABRAS CLAVE:
Sustitución, Cloruro de sodio, Cloruro de potasio, Probióticos, Queso fresco.

KEYWORDS:
Substitution, Sodium chloride, Potassium chloride, Probiotics, Fresh cheese.

PALAVRAS-CHAVE:
Substituição, Cloreto de sódio, Cloreto de potássio, Probióticos, Queijo fresco.

RESUMO

O Quesito Antioqueño (QA) é um queijo fresco, macio, moído e salgado em massa, sem a adição de bactérias. Este contém 2,1 % de cloreto de sódio (NaCl). Foi adicionado Bifidobacterium lactis (bb12) e salgado com NaCl Q1 e misturas de NaCl/KCl (3:1 (Q2) e 1:1 (Q3), p/p), procurando reduzir o teor de sódio e assim dar características probióticas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (Q1, Q2 y Q3) (P>0,05) em algumas variáveis composicionais (umidade, MG/MS, proteína total, cinzas, acidez), químicas (pH) e físicas (a_w, dureza (N), adesividade ((Joules) 10^6), elasticidade (mm), coesividade, gomosidade (N), mastigabilidade ((Joules)* 10^6), resiliência). Foram observadas diferenças significativas na umidade, pH, teor de proteína e acidez por efeito do tempo de armazenamento (P<0,05. Quanto ao teor de Na e K, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos (P<0,05) mas não assim para o teor de Ca. Em Q2 o teor de Na diminuiu 24,2% e K apresentou um aumento médio de 143%; para Q3 o teor de Na diminuiu em 48,3% e K aumentou em 311%. O Quesito Antioqueño elaborado com uma substituição de 50% de Na por K mantém as características composicionais e físico-químicas do produto tradicional, por tanto segundo os resultados da*

presente pesquisa esta substituição pode ser realizada, além disso pode funcionar como uma excelente matriz para incluir probióticos na dieta

INTRODUCCIÓN

El queso es clasificado como el producto blando, semiduro, duro o extraduro, madurado o no, obtenido mediante coagulación de la proteína de la leche, por acción de enzimas coagulantes y la separación parcial del suero desprendido del proceso, resultando en la concentración de la proteína, caseína principalmente [1].

La producción de quesos a nivel mundial se estima en $20x10^6$ ton/año [2]. En general los quesos son versátiles, con presentaciones atractivas para las personas de todas las edades; por esta condición son buenos vehículos para incluir probióticos en la dieta [3].

El quesito antioqueño (QA) es un queso fresco, blando, típico del Departamento de Antioquia, donde representa el 80% de la venta de quesos [4]. Éste contiene 2,1% de cloruro de sodio (NaCl); por lo tanto, cada porción de 30 g aporta 0,63 g de NaCl. El consumo de NaCl recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 5 g por persona/día [5], sin embargo, a nivel mundial, se encuentra entre 5,85 y 11,7 g por persona/día [6]. La ingesta de sodio tiene una dosis respuesta a partir de la cual, se asocia con el aumento de la presión sanguínea en humanos [7, 8].

Para catalogar un alimento como bajo en sodio, el aporte no debe exceder 120 mg en 100 g del producto y para ser reducido debe contener 25% menos, comparado con el producto de referencia [9].

Los probióticos son microorganismos vivos que incluidos en los alimentos, en cantidades adecuadas benefician la salud del consumidor, mejorando el balance microbiano intestinal [10].

Los quesos presentan ventajas frente a otros productos que son vehículos de probióticos, como la leche y el yogurt, al crear una barrera amortiguadora al ambiente ácido del tracto gastrointestinal; además, el alto contenido de grasa ofrece protección adicional a la bacteria [3, 11]. Bergamini *et al.,* [12] afirman que se encontró mayor viabilidad para *Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en una solución de queso, comparado con los encontrados en una solución clorhídrica, cuando se sometieron a pH 3; también, encontraron que en quesos semiduros se han obtenido recuentos mayores de 10^7 unidades formadoras de colonia por gramo de producto (UFC/g) de *L. acidophilus* a los seis meses de maduración; Ricciardi *et al.,* [11] confirmaron la viabilidad de cepas de *Lactobacillus plantarum, L. paracasei* y *L. rhamnosus* presente en quesos de pasta hilada, tras ser sometidos a diferentes concentraciones de bilis porcina; Sepúlveda [13] realizó trabajos sobre la adición de *L. casei* en queso crema; Castaño [14] en queso fresco y Silva *et al.,* [15] probaron la capacidad del queso fresco latinoamericano, para proteger bacterias probióticas al paso por el tracto gastrointestinal, demostrando la excelente aptitud de este tipo de productos, para ser vehículo de probióticos en la dieta.

Por lo anterior, es importante realizar investigaciones que conduzcan al desarrollo de productos reducidos en sodio y con efectos funcionales, que sean de alto impacto para la población, sin afectar sus caraterísticas tradicionales. Este desarrollo implica un conocimiento a fondo de la tecnología de elaboración del producto y la influencia de ésta en la sobrevivencia del probiótico y de éste sobre la calidad global del producto final.

El objetivo de esta investigación fue el desarrollo de QA reducido en sodio y adicionado con *Bifidobacterium lactis* (bb12) como cultivo probiótico*,* con el fin de ayudar a prevenir el consumo excesivo de sodio y, a la vez, ofrecer un producto con características probióticas.

MÉTODO

Elaboración del Quesito Antioqueño

La elaboración se realizó en el Laboratorio de Productos Lácteos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Se empleó leche proveniente de la hacienda Paysandú, propiedad de la misma institución.

La elaboración se realizó con base en lo establecido por ICTA [16] y Sepúlveda[13], con algunas modificaciones. La leche fue termizada a 40°C y homogenizada a 750-800 lb/in^2(psi), se pasteurizó a 63°C con retención de 30 min; luego, se estabilizó a 26°C, se aplicó cloruro de calcio en (0,01%). Se coaguló en 45 min a la misma temperatura. El corte se realizó con liras de 1 cm^3, un ciclo de agitación de 10 min y reposo por 5 min.Se desueró en filtros de algodón, por 10 min, se aplicó 2,1% de sal, sustituyendo parcialmente el cloruro de sodio (NaCl), por cloruro de potasio (KCl). Para determinar el rango en el cual se iba a realizar la sus-

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (27-35) Enero _ Junio 2017

titución se llevó a cabo un ensayo previo en el cual se reemplazó hasta el 100 del NaCl por KCl y se sometió a un análisis sensorial hedónico y como resultado se obtuvo que, a nivel sensorial, el máximo nivel aceptable de sustitución es 50% (relación 1:1). Cuando el queso fue salado con una relación 3:1 (NaCl:KCl) se denominó Q2; cuando esta fue 1:1(NaCl:KCl) Q3 y el control, donde sólo se aplicó NaCl, Q1. El producto se homogenizó manualmente por 3 minutos y, luego, se sometió a un proceso de molienda por fricción, hasta lograr la textura cremosa característica. En este punto se aplicó el cultivo liofilizado comercial probiótico de *Bifidobacterium lactis* (bb12), con la dosificación recomendada por el fabricante y se mezcló, manualmente, por 2 min; finalmente, se moldeó y empacó en presentación de 250 g, y se almacenó a 4°C.

Caracterización del quesito antioqueño

Se realizó el muestreo a los días 1, 12 y 21 de almacenamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado, con materiales grado reactivo. La muestra fue preparada con base en el método AOAC 955.30, [17]; a) El porcentaje de proteína se determinó por el método Kjeldahl [17]; b) las cenizas por incineración a 550$\pm$1°C[17]; c) la grasa por el método volumétrico de Babcock usado por Morales, Rodríguez y Sepúlveda[18] y AOAC 989.04 [17]; d) la humedad por el método del secador con aire forzado a 130$\pm$1°C por 1,25 h [17]; e) la actividad de agua por medio de un higrómetro de punto de rocío a 25°C$\pm$1°C serie 3TE, Decagon Devices INC [19]; f) el pH con un potenciómetro, que es introducido, directamente, en la masa del queso [20]; g) la acidez titulable por titulación con NaOH 0,1N y como indicador fenolftaleína al 2% [17]; h) la determinación de sodio (Na), potasio (K) y calcio (Ca) se realizó por espectrofotometría de absorción atómica [17].

Análisis Perfil de textura (TPA)

Se realizó con un analizador de textura Micro Systems modelo TA-XT2, con el software Texture Expert Exceed, versión 2.64. El QA fue porcionado con una probeta cilíndrica de 2,5 cm de diámetro y 2,3 cm de altura, con una compresión de 70%, se determinó Dureza (N), Adhesividad (Joules)*10^{-6}, Elasticidad (mm), Cohesividad (adimensional), Gomosidad (N), masticabilidad (Joules)*10^{-3} y resiliencia [21].

Viabilidad *Bifidobacterium bifidum*

La viabilidad del *Bifidobacterium lactis* (bb12) de determinó en placa a los 1, 12 y 21 días de la elaboración del queso. Para cada muestreo se tomaron 10 g, en una bolsa y se maceró. Luego, se realizaron diluciones seriadas de 1 parte de la muestra en 9 partes de agua peptonada. Con este procedimiento se obtuvieron diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-9}; de esta última, se tomó 1 mL que fue puesto en caja Petri, y se le agregó medio MRS líquido, se homogenizó y se incubó en anaerobiosis a 37°C, por 5 días. Se usó el indicador de anaerobiosis de Oxoid® BR0055B. Posteriormente, se contaron las colonias obtenidas en cada dilución [14, 22, 23].

Análisis estadístico

Para cada una de las variables respuesta (caracteristicas composicionales, químicas y físicas) se realizó un análisis de varianza, considerando la estructura factorial de los tratamientos (tres niveles de sustitución y tres tiempos), con base en un diseño de bloques completos azar, tomando cada lote de preparación como factor de bloqueo. Para determinar diferencias entre medias se usó el test de Tukey, con alfa= 0,05. Cuando no se encontraron diferencias significativas entre las medías, con el alfa=0,05, se usó una prueba de equivalencia para confirmar que estás eran iguales con un nivel de significancia alfa=0,05. Todos los análisis se realizaron en paquete estadístico SAS®.

RESULTADOS

Caracterización del QA

En el cuadro 1, se muestran los resultados obtenidos en los días 1, 12 y 21 de almacenamiento, de los análisis realizados a los tratamientos Q2, Q3 y el control Q1, todos estos adicionados con *Bifidobacterium lactis* (bb12).

El tiempo de almacenamiento tuvo efecto significativo ($P<0,05$) sobre el contenido de humedad, pH, ácidez, proteína total y contenido de materia grasa en materia seca (MG/MS). La humedad fue superior a la reportada en otros estudios por el ICTA [16] y Sepúlveda [13]. La humedad se redijo durante el almacenamiento debido al desuerado que se presenta por la contracción de la matriz proteica, fenómeno reportado, también, por Sepúlveda [13]. A pesar del efecto deshidratante de la sal en los quesos [3], la sustitución del NaCl por KCl no ejerció un efecto significativo ($P>0,05$) sobre esta característica; por lo tanto, el QA reducido en sodio mantiene las condiciones del productos tradicional, de esta manera lo reportaron Karimi *et al.,* [24], Hystead *et al.*, [25], McMahon *et al.,* [26], Gomes *et al.,* [27] Ayyash y Shah [28] y Ayyash

Cuadro 1. Análisis físico-químicos realizados al QA.

Tiempo (días)	Tratamiento	Humedad (%)	a_w	pH	MG/MS[D] (%)	Acidez (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)
1	Q1*	63,37[a]	0,958[a]	6,35[a]	46,25[a]	0,10[a]	3,56[a]	12,73[a]
	Q2**							
	Q3***							
12	Q1	61,75[b]	0,954[a]	6,19[b]	45,97[a]	0,11[ab]	3,61[b]	13,67[b]
	Q2							
	Q3							
21	Q1	60,01[c]	0,952[a]	5,84[c]	49,49[b]	0,13[b]	3,62[d]	14,61[b]
	Q2							
	Q3							

Medias dentro de las columnas y día de almacenamiento con letra diferente difieren significativamente ($P<0,05$)

* Q1 tratamiento de 100% NaCl y 0% KCl (control) ** Q2 Tratamiento de 75% NaCl y 25% KCl

*** Q3 Tratamiento 50% NaCl y 50% KCl. D Materia grasa en materia seca

et al., [29], en queso feta, cheddar, minas fresh, mozzarella y akawi, respectivamente. Por el contrario, cuando se han realizado reducciones de NaCl, sin sustituirlo con otra sal, se han observado diferencias en el contenido de humedad, como lo reportaron Rulikowska *et al.,* [30] en queso Cheddar; los cuales obtuvieron una humeadad de 42,15% cuando aplicaron 0,5% de NaCl, pero cuando aumentaron a 3,0% de esta misma sal, la humedad se redujo hasta 38,47%. También, Grummer *et al.,* [31] afirmaron que la reducción del NaCl sin el uso de sales sustituyentes resulta en productos de alta humedad, con defectos de textura y sabor, por la actividad enzimática no inhibida por la concentración tradicional de sales. La actividad bacteriana aumenta la concentración de ácido láctico en el queso, aumentando la acidez y reduciendo el pH, como se observa en el Cuadro 1, efectos similares fueron reportados por Sepúlveda [13] y Gomes *et al.,* [27] en quesito antioqueño y queso minas fresh, respectivamente.

La humedad, la actividad de agua (a_w), el pH, MG/MS, la acidez, el contenido de cenizas y de proteína no se alteraron significativamente por la sustitución de NaCl por KCl ($P>0,05$). La a_w observada estuvo dentro del rango normal para quesos frescos, que según Engels *et al.,* [33] varía entre 0,95-0,99. En general, las sales en el alimento no solo reducen el a_w, sino, la transferencia de masas de la célula bacteriana [3]. Pacheco *et al.,* [34] afirmaron que las propiedades funcionales del KCl son similares a las del NaCl dentro de las matrices alimenticias. Sin embargo, cuando el NaCl es reducido sin sustitución, la a_w aumenta como lo reportaron El-Barky *et al.,* [35] en un queso de imitación, donde esta característiva aumentó desde 0,975 en un queso con 1,5% de NaCl a 0,982 en uno con 0% de NaCl. Resultados similares también fueron reportados por Ayyash *et al.,* [36], Gomes *et al.,* [27] y Grummer *et al.,* [31], en queso halloumi, minas fresh y cheddar, respectivamente.

En el Cuadro 2 se relacionan el contenido de sodio (Na) y potasio (K) en el QA, así como la magnitud de la reducción obtenida.

El contenido de Na y K varió de forma significativa por los tratamientos ($P<0,05$). El Na disminuyó hasta en 49,9% en Q3; esta tendencia continuó durante todo el tiempo de almacenamiento. En el tratamiento Q2 la reducción fue del 24,3%, pudiendo así, catalogar el producto como reducido en Na, según la resolución 333 del Ministerio de Protección Social de Colombia [9].

Por otro lado, el K aumentó hasta en Q2 y Q3 en 188 y 388% respectivamente, como se observa en la Cuadro 2. En trabajos realizados por Gomes *et al.,* [27], Rulikowska *et al.,* [30] y McMahon *et al.,* [26], en queso minas fresh y cheddar, se han reportado comportamientos similares a los encontrados en el presente estudio, en cuanto a reducciones significativas de Na y aumento en el contenido de K.

Análisis del TPA (perfil de textura)

En el Cuadro 3 se encuentran los valores obtenidos del QA, en cada tratamiento y tiempo de almacenamiento.

En general, los tratamientos no tuvieron efecto significativo sobre las características de textura del QA,

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (27-35) Enero _ Junio 2017

Cuadro 2. Contenido de Na, K y Ca en el QA en 21 días de almacenamiento y 3 niveles de sustitución de NaCl por KCl.

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento	Na (%)	% reducción	K (%)	% Aumento	Ca (%)
1	Q1	0,780[a]		0,136[a]		0,460[a]
	Q2	0,593[b]	24,4	0,366[b]	169,1	0,513[a]
	Q3	0,413[c]	47,1	0,620[c]	355,9	0,460[a]
12	Q1	0,751[a]		0,215[a]		0,493[b]
	Q2	0,583[b]	22,3	0,343[b]	71,5	0,476[b]
	Q3	0,376[c]	49,9	0,583[c]	191,5	0,473[b]
21	Q1	0,723[a]		0,124[a]		0,523[c]
	Q2	0,536[b]	25,9	0,346[b]	188,3	0,526[c]
	Q3	0,376[c]	48	0,586[c]	388,3	0,533[c]

* Medias dentro de las columnas y día de almacenamiento con letra diferente difieren significativamente ($P<0,05$)

(P>0,05), por lo tanto, se pueden realizar sustituciones hasta de 50% de KCl por NaCl sin notarse cambios con respecto a un producto tradicional.

Sin embargo, Guinee [38], afirma que los quesos sin sal tienden a ser más suaves en la corteza y cremosos, com parados con quesos adicionados con esta. Katsiari *et al.,* [32] encontraron que los quesos salados con mezclas de KCl/NaCl son más suaves que el testigo que sólo incluye NaCl; Ayyash *et al.,* [36] obtuvieron resultados similares y afirman que el KCl puede jugar el mismo rol en el queso Halloumi, que el NaCl, comportamiento similar al encontrado en este trabajo.

La elasticidad y la resiliencia fueron afectadas significativamente, (P<0,05), por el tiempo de almacenamiento, debido a la contracción de la matriz proteica y la pédida de humedad.

Viabilidad del *Bifidobacterium lactis*

Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 4. No existieron diferencias significativas, en el recuento bacteriano (UFC/g) entre los tratamientos ($P>0,05$). En el día 1, la viabilidad para Q1 estuvo en $6,5x10^6$ UFC/g y llegó hasta $5,02x10^9$ UFC/g en el día 22; para Q2 inició en $9,21x10^6$ UFC/g y al día 22 aumentó a $4,34x10^8$ UFC/g y para 3 inició en $1,23x10^7$ UFC/g y al día 22 estuvo en $2,45x10^8$ UFC/g.

La concentración del cultivo, siempre, aumentó hasta llegar, en todos los tratamientos, a concentraciones superiores a 10^8 UFC/g, satisfaciendo lo especificado por Tamime [39] y el Ministerio de Protección Social de Colombia [37], los cuales afirman que para obtener los efectos benéficos en la salud del consumidor, la viabilidad debe mantenerse superior a 10^6 UFC/g. Este

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos* y el tiempo sobre las características evaluadas en el TPA del QA.

Característica	Tratamiento			Tiempo (días)		
	Q1	Q2	Q3	1	12	21
Dureza (N)	6,65[a]	6,55[a]	6,11[a]	6,627[a]	6,367[a]	6,331[a]
Adhesividad (Joules)*10^{-6}	-0,331[a]	-0,369[a]	-0,294[a]	-0,286[a]	-0,279[a]	-0,427[a]
Elasticidad (mm)	1,034[a]	0,942[a]	0,96[a]	1,009[a]	1,038[a]	0,89[b]
Cohesividad	0,7[a]	0,713[a]	0,714[a]	0,702[a]	0,73[a]	0,694[a]
Gomosidad (N)	4,465[a]	4,565[a]	4,195[a]	4,466[a]	4,514[a]	4,245[a]
Masticabilidad (Joules)*10^{-3}	4,888[a]	4,555[a]	4,226[a]	4,765[a]	4,876[a]	4,035[a]
Resiliencia	0,481[a]	0,492[a]	0,47[a]	0,457[a]	0,471[a]	0,514[b]

*** Medias dentro de las columnas y día de almacenamiento con letra diferente difieren significativamente ($P<0,05$)**

Cuadro 4. Recuento de *Bifidobacterium lactis* (bb12) (UFC/g) en QA con inclusión de KCl en los días 1, 12 y 21 de almacenamiento.

Tratamiento	Tiempo (días)	UFC/g
Q1	1	$6{,}53x10^6$
	12	$2{,}5x10^6$
	21	$5{,}02x10^9$
Q2	1	$9{,}21x10^6$
	12	$8{,}31x10^7$
	21	$4{,}34x10^8$
Q3	1	$1{,}23x10^7$
	12	$8{,}56x10^7$
	21	$2{,}45x10^8$

comportamiento del cultivo probiótico en el queso, durante el almacenamiento, también, ha sido reportados por Buriti *et al.,* [40]; Souza y Saad [41] para*L. paracasei* y el *L. acidophilus* entre el día 1 hasta el día 21 en queso Minas Fresh y Karimi *et al.,* [24] con *Lactobacillus casei* en queso feta después de 90 días de maduración; Castaño [14] evaluando un queso fresco bajo en grasa, adicionado con *Bifidobacterium ssp.,* también, reportó incremento de UFC/g entre el día 1 y 12 de almacenamiento; Vinderola *et al.,* [42] obtuvieron recuentos de 10^6 ufc/g, al usar cepas de *Bifidobacterium ssp*., y *L. acidophilus,* evaluados en queso fresco Argentino entre el día 0 y el 60 de almacenamiento en refrigeración; Sepúlveda [13], reportó recuentos de 10^7 UFC/g, en QA y Queso Crema, el cual fue estable durante el tiempo de almacenamiento. El QA es una matriz apta para la inclusión de probióticos en la dieta, en su presentación tradicional o realizando reducciones de NaCl por KCl.

CONCLUSIONES

No se evidenciaron diferencias significativas entre Q3, Q2 y Q1 en las características evaluadas, por lo tanto, se puede elaborar un QA con sustitución del 50% de NaCl por KCl, sin que se encuentren diferencias significativas, en las caracteristicas evaluadas, con respecto a un producto tradicional (100% NaCl). El QA es excelente matriz para incluir probióticos en la dieta de la población, al mantener recuentos bacterianos superiores de 10^8 UFC/g en el producto, con 21 días de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Se agradace a COLCIENCIAS por la financiación de este proyecto por medio del convenio 2012-0837. Al señor Gerardo de Jesús Arbeláez rojas, gerente de la empresa AURALAC y al Laboratorio de Productos Lácteos de la Unviersidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

REFERENCIAS

[1] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Codex Stan 283-1978, Enmienda 2013. Norma general del codex para el queso. Roma (Italia): 2013, 5 p.

[2] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Food Outlook: biannual report on global food markets. Roma (Italia): 2015, p. 54-58

[3] CRUZ, G., FARIA, J., POLLONIO, R., BOLINI, A., CELEGHINI, S., GRANATO, D. and SHAH, P. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. Trends in Food Science & Technology, 22(6), 2011, p. 276-291.

[4] CAJIAO, N. El Espectador. Hay que salir de los cuatro quesitos [online]. 2011. Disponible:www.elespectador.com/unchanton/articulo-317997-hay-que-salir-de-los-cuatro-quesitos. [Citado 22 de abril de 2014].

[5] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Ingesta de sodio en adultos y niños. Ginebra (Suiza): 2013, 170 p.

[6] TAKASE, H., SUGIURA, T., KIMURA, G., OHTE, N. and DOHI, Y. Dietary Sodium Consumption Predicts Future Blood Pressure and Incident Hypertension in the Japanese Normotensive General Population. Journal of the American Heart Association, 4(8), 2016, p. 1-8.

[7] PARK, J. and KWOCK, C.K. Sodium intake and prevalence of hypertension, coronary heart disease, and stroke in Korean adults. Journal of Ethnic Foods, 2(3), 2015, p. 92-96.

[8] PANOUILLÉ, M., SAINT-EVE, A., DE LOUBENS, C., DÉLÉRIS, I. and SOUCHON, I. Understanding of the influence of composition, structure and texture on salty perception in model dairy products. Food hydrocolloids, 25(4), 2011, p. 716-723.

[9] COLOMBIA. MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. Resolución número 333. Bogotá (Colombia): 2011, 29 p.
[10] DWIVEDI, M., KUMAR, P., LADDHA, N.C. and KEMP, E.H. Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity. Autoimmunity Reviews, 15, 2016, p. 379-392.
[11] RICCIARDI, A., GUIDONE, A., IANELLO, R., CIOFFI, S., APONTE, M., PAVLIDIS, D., TSAKALIDOU, E., ZOTTA, T. and PARENTE, E.A. Survey of non-starter lactic acid bacteria in traditional cheeses: Culture dependent identification and survival to simulated gastrointestinal transit. International Dairy Journal, 43, 2015, p. 42-50.
[12] BERGAMINI, C.V., HYNES, E.R., QUIBERONI, A., SUÁREZ, V.B. and ZALAZAR, C.A. Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. Food research international, 38(5), 2012, p. 597-604.
[13] SEPULVEDA, J. Desarrollo de quesos frescos con la adición del cultivo probiótico *Lactobacillus casei* [Tesis de maestría]. La Habana (Cuba): Universidad de la Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos, 2007, 130 p.
[14] CASTAÑO, M. Viabilidad de un cultivo probiótico en un queso fresco bajo en grasa [Tesis de maestría]. Manizales (Colombia): Universidad Nacional De Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, 2000, 70 p.
[15] SILVA, C.C.G., DOMINGOS-LOPES, M.F.P., MAGALAES, V.A.F., FREITAS, D.A.S., COELHO M.C., ROSA, H.J.D. and DAPKEVICIUS, M.L.N.E. Short communication: Latin-style fresh cheese enhances lactic acid bacteria survival but not *Listeria monocytogenes* resistance under in vitro simulated gastrointestinal conditions. Journal Of Dairy Science, 98(7), 2015, p. 4377–4383.
[16] COLOMBIA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (ICTA). Manual de elaboración del quesito antioqueño. 1 ed. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, 1987, 30 p.
[17] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (AOAC). Official methods of analysis of AOAC international.16th ed. AOAC International. Arlington (EEUU): 1997, 1202 p.
[18] MORALES, M.M.M., RODRÍGUEZ, E.R. y SEPÚLVEDA, J.U.S. Evaluación de las propiedades físicas y texturales del buñuelo. Revista Lasallista de Investigación, 9(2), 2012, p. 112-121.
[19] LÓPEZ-TENORIO, J.A., RODRIGUEZ-SANDOVAL, E. y SEPÚLVEDA-VALENCIA, J.U. Evaluación de características físicas y texturales de pandebono. Acta Agronómica, 61(3), 2012, p. 273-281.
[20] SOODAM, K., ONG, L., POWELL, I.B., KENTISH, S.E. and GRAS, S.L. Effect of calcium chloride addition and draining pH on the microstructure and texture of full fat Cheddar cheese during ripening. Food Chemistry, 181, 2015, p. 111-118.
[21] VELASCO, R., ORDOÑEZ J.A., CABEZA, C.A. and CAMBERO, M.I. Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes. LWT - Food Science and Technology, 70, 2016, p. 1-8.
[22] DELGADO, S. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas [Ph.D. Comunicación de tesis]. Oviedo (España): Universidad de Oviedo, 2005, 350 p.
[23] SANZ, Y., PALMA, G., SANCHEZ, E. y MEDIANA, M. Bacterias y productos derivados para fortalecer las defensas y reducir el riesgo de enfermedad. Madrid (España): Oficina de Patentes Españolas, 2331863, 2010.
[24] KARIMI, R., MORTAZAVIAN, A.M., and KARIMI, M. Incorporation of *Lactobacillus casein* Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. Journal of Dairy Science, 95(8), 2012, p. 4209-4222.
[25] HYSTEAD, E., DIEZ-GONZALES, F. and SCHOENFUSS, T.C. The effect of sodium reduction with and without potassium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 96(10), 2013, p. 6172-6185.
[26] MCMAHON, D.J., OBERG, C.J., DRAKE, M.A., FARKYE, N., MOYES, L., ARNOLD, M., GENESAN, B., STEELE, J. and BROADBENT, J.R. Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 97(8), 2014, p. 4780-4798.
[27] GOMES, A.P., CRUZ, A.G., CADENA, R.S., CELEGHINI, R.M.S., FARIA, J.A.F., BOLINI, H., POLLONIO, M. and GRANADO, D. Manufacture of low-sodium minas fresh cheese: effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. Journal Of Dairy Science, 94(6), 2011, p. 2701-2706.
[28] AYYASH, M.M. and SHAH, N.P. The effect of substitution of NaCl with KCl on chemical composition

and functional proprieties of low-moisture Mozzarella cheese. Journal Of Dairy Science, 94(8), 2011, p. 3761-3768.

[29] AYYASH, M.M., SHERKAT, F. and SHAH, N.P. The effect of NaCl substitution with KCl on akawi cheese: Chemical composition, proteolysis, angiotensin-converting enzyme-inhibitory activity, probiotic survival, texture profile, and sensory properties. Journal Of Dairy Science, 95(9), 2012, p. 4747-4759.

[30] RULIKOWSKA, A., KILCAWLEY, K.N., DOOLAN, I.A., ALONSO-GOMEZ, M., NONGONIERMA, A.B., HANNON, J.A. and WILKINSON, M.G. The impact of reduced sodium chloride content on Cheddar cheese quality. International Dairy Journal, 28(2), 2013, p. 45-55.

[31] GRUMMER, J., BOBOWSKI, N., KARALUS, M., VICKERS, Z. and SCHOENFUSS, T. Use of potassium chloride and flavor enhancers in low sodium Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 96(3), 2013, p. 1401-1418.

[32] KATSIARI, M.C., VOUTSINAS, L.P., ALICHANIDIS, E. and ROUSSIS, I.G. Reduction of Sodium Content in Feta Cheese by Partial Substitution of NaCl by KCl. International Journal of Dairy Science, 7(6), 1997, p. 465-472.

[33] ENGELS, W., BURSEG, K. and DUSTERHOFT, E.M. Lowering salt in cheese. Food Science and Technology International, 25(2), 2011, p. 36-40.

[34] PACHECO-PÉREZ, W.A., ARIAS-MUÑOZ, C.E. y RESTREPO-MOLINA, D.A. Efecto de la reducción de cloruro de sodio sobre las caracteristicas de calidad de una salchicha tipo seleccionada. Revista de la Facultad Nacional de Agronomía, 65(2), 2012, p. 6779-6787.

[35] EL-BAKRY, M., BENINATI, F., DUGGAN, D., O'RIORDAN, E.D. and O'SULLIVAN, M. Reducing salt in imitation cheese: Effects on manufacture and functional properties. Food Research International, 44(2), 2011, p. 589-596.

[36] AYYASH, M.M., SHERKAT, F., FRANCIS, P., WILLIAMS, R.P.W. and SHAH, N.P. The effect of sodium chloride substitution with potassium chloride on texture profile and microstructure of Halloumi cheese. Journal of Dairy Science, 94(1), 2011, p. 37-42.

[37] DABOUR, N., KHEADR, E., BENHAMOU, N., FLISS, I. and LAPOINTE, G. Improvement of texture and structure of reduced fat cheddar cheese by exopolysaccharide producing lactococci. Journal of Dairy Science, 89(1), 2006, p. 95–110.

[38] GUINEE, T.P. and FOX, P.F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. Cheese: chemistry, Physics and Microbiology. 3 ed. Londres (Inglaterra): Elservier, vol. 1, 2004, p. 207-259.

[39] TAMIME, A.Y. Processed Cheese and Analogues: An Overview. 1 ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing Ltd., 2011, 340 p.

[40] BUTIRI, F.C., DA ROCHA, J.S., ASSIS, E.G. and SAAD, S.M. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei.* LWT-Food Science and Technology, 38(2), 2015, p. 173-180.

[41] SOUZA, C.H. and SAAD, S.M. Viability of Lactobacillus acidophilus La-5 added solely or in coculture with a yoghurt starter culture and implications on physic-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. Food Science and Technology, 42(2), 2009, p. 633-640.

[42] VINDEROLA, C.G. and REINHEIMER, J.A. Enumeration of Lactobacillus casein in the presence of *L. acidophilus, bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal, 10(4), 2012, p. 271-275.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (36-44) Enero _ Junio 2017

ACTIVIDAD LIPOLÍTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE AGUAS RESIDUALES CONTAMINADAS CON GRASAS

LIPOLYTIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM WASTE WATERS CONTAMINATED WITH FATS

ATIVIDADE LIPOLÍTICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DE ÁGUAS RESIDUAIS CONTAMINADO COM GORDURAS

CARMEN JULIA PEDROZA-PADILLA[1], MAGALLY ROMERO-TABAREZ[2], SERGIO ORDUZ[3]

RESUMEN

Las lipasas son uno de los grupos de enzimas con mayor cantidad de aplicaciones industriales y biotecnológicas, en el procesamiento de alimentos lácteos y aceites, detergentes, cosméticos, cuero, productos farmacéuticos, papel, producción de surfactantes, biodiesel y recientemente como una alternativa promisoria para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con lípidos. En este estudio se aislaron microorganismos a partir de muestras de aguas residuales con grasas a los que se les determinó la producción de lipasa extracelular utilizando p-nitrofenilpalmitato. De 149 aislados realizados, 37 mostraron actividad lipolítica y la cepa CCEI-1, identificada como Serratia marcescens, tuvo la mayor actividad a pH alcalino y a 30°C. el microorganismo degradó los lípidos y produjo pigmentación en medio de cultivo solido a pH 8,0 y 50°C. Los sobrenadantes de los cultivos de S. marcescens empleados para la determinación de la estabilidad térmica a 50ºC, indicaron que la enzima es estable a ésta temperatura y en pH alcalino. La enzima fue purificada parcialmente y sometida a electroforesis

---

Recibido para evaluación: 28 de Abril de 2016. **Aprobado para publicación:** 30 de Julio de 2016.

1 Universidad Popular del Cesar, Microbiología, Grupo GICBIO. M.Sc. en Ciencias-Biotecnología. Valledupar, Colombia.

2 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación Biología Funcional. Ph.D. en Ciencias Básicas Biomédicas. Medellín, Colombia.

3 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias, Grupo SaBio. Ph.D. en Ciencias Naturales. Medellín, Colombia.

Correspondencia: carmenpedroza@unicesar.edu.co

(SDS-PAGE) donde se detectaron bandas entre 40 y 116 kDa. Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que la cepa de S. marcescens CCEI-1 puede ser posible fuente de lipasas termoestables con futuras aplicaciones industriales y biotecnológicas.

ABSTRACT

Lipases are one of the groups of enzymes with the highest number of industrial and biotechnological applications, processing of dairy foods and oils, detergents, cosmetics, leather, pharmaceuticals, paper, production of surfactants, biodiesel and recently as a promising alternative for the treatment of wastewater contaminated with lipids. In this study, microorganisms were isolated from wastewater samples containing fats and extracellular lipase production was determined using p-nitrophenylpalmitate. From the 149 isolates obtained, 37 showed lipolytic activity and strain CCEI-1, identified as Serratia marcescens, had the highest activity at alkaline pH and at 30°C. Also degraded lipids and produced pigmentation on solid medium at pH 8,0 and 50°C. The culture supernatants of S. marcescens used to determine thermal stability at 50°C indicate that the enzyme is stable at this temperature and at alkaline pH. The enzyme was partially purified and electrophoresed (SDS-PAGE) where bands between 40 and 116 kDa were detected. The results obtained in this study indicate that the strain CCEI-1 of S. marcescens can be a possible source of thermostable lipases with industrial and biotechnological applications.

RESUMO

Foram coletadas amostras de aguas residuais com graxas com a finalidade de realizar o isolamento de microrganismos nativos aos quais determinaram-se e quantificaram-se a produção da enzima extracelular lipase, utilizando um micro-método com p-nitrofenilpalmitato (p-NPP). No total, foram obtidos 149 isolamentos dos quais 37 mostraram atividade lipolítica sendo que o isolamento que apresentou a maior atividade foi selecionado para estudos de determinação das condições ótimas de pH e temperatura para a expressão da lipasa. O isolado CCEI-1, identificado como Serratia marcescens, apresentou a maior atividade a pH alcalino e 30°C, adicionalmente degradou lipídeos e teve produção de pigmentação em meio de cultura sólido a pH 8,0 e 50°C. Os supernadantes dos cultivos de S. marcescens empregados para a determinação da estabilidade térmica a 50ºC mostraram resultados que indicam que a enzima é estável nessas condições pH alcalino. A enzima foi purificada parcialmente e sometida a eletroforese em gel SDS-PAGE onde foram detectadas bandas entre 40 y 116 kDa. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a cepa S. marcescens CCEI-1 pode ser uma possível fonte de lipases termoestáveis com aplicações industriais e biotecnológicas.

PALABRAS CLAVE:
Lipasa, *p*-NPP, Aguas residuales, Termoestabilidad, *Serratia marcescens.*

KEYWORDS:
Lipase*, p*-NPP, Waste Waters, Thermostability, *Serratia marcescens*.

PALAVRAS-CHAVE:
Lipase, *p*-NPP*, Aguas residuais, Termoestabilidade, Serratia marcescens.*

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (36-44) Enero _ Junio 2017

INTRODUCCIÓN

Las lipasas (triacilglicerolacil hidrolasas, EC. 3.1.1.3), son enzimas con actividad biológica sobre el enlace éster de las moléculas de triacilglicerol presentes en las grasas o en los aceites. Cuando actúan en medio acuoso pueden producir glicerol, ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos, mientras que en ausencia de agua, la reacción es reversible (esterificación, interesterificación, y transesterificación), generando de ésta manera glicéridos [1,2]. Las reacciones mediadas por estas hidrolasas se dan entre la interface agua y el compuesto lipídico insoluble donde la enzima está disuelta [3,4,5]. Las lipasas son proteínas ubicuas distribuidas ampliamente en la naturaleza, presentes en los animales, en las plantas y en los microorganismos, éstos últimos (bacterias y hongos), generalmente, las secretan al medio extracelular facilitando así, los procesos de extracción y purificación para la industria [3]; además, de ésta ventaja, las enzimas de origen microbiano son preferidas porque actúan en condiciones moderadas, simplicidad en el desarrollo de enzimas recombinantes, mantienen su estabilidad en solventes orgánicos y condiciones extremas de pH y temperatura, tienen alta especificidad y estereoselectividad, no necesitan cofactores, generan baja producción de residuos y altos rendimientos en su recuperación y reutilización, del mismo modo pueden obtenerse en procesos fermentativos cortos por la rápida división celular de los organismos productores y versatilidad del metabolismo microbiano en los medios de cultivo empleados [1,2,3].

La variabilidad, la adaptabilidad y las ventajas en la producción de las lipasas microbianas [1], las ha promovido dentro del grupo de las enzimas más producidas en el mundo con aplicaciones biotecnológicas en el procesamiento de alimentos lácteos y aceites, detergentes, cosméticos, cuero, productos farmacéuticos, papel, producción de surfactantes, biodiesel y recientemente como una alternativa promisoria para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con altos contenidos de lípidos [1,3,5,6]. Las aguas con grasas producidas durante los procesos de transformación o refinación de lácteos y aceites tienen baja biodegradabilidad y afectan el medio ambiente, la fauna y flora cuando son vertidas a cuerpos de aguas y suelos sin ningún tratamiento previo; ante esta problemática y en comparación con los procesos químicos convencionales, la prehidrólisis de grasas o aceites por lipasas de origen microbiano podría aumentar la eficiencia, biodegradabilidad o autodepuración de las aguas, favoreciendo así, la asimilación de la carga orgánica por los consorcios microbianos presentes [7]. Sin embargo, aunque el uso de lipasas microbianas purificadas durante el pretratamiento es importante, su aplicación no es económicamente viable con las enzimas comerciales, por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de preparaciones económicas a base de extractos crudos con alta actividad lipolítica, a partir de residuos agroindustriales [1,8].

En este estudio se reporta el aislamiento de microorganismos lipolíticos a partir de efluentes industriales contaminados con aceites vegetales, la evaluación de su actividad en condiciones variables de pH, temperatura, e identificación de la cepa con mayor actividad enzimática, *Serratia marcescens*.

MÉTODO

Aislamiento de microorganismos

Los microorganismos fueron aislados de muestras de sedimentos de aguas residuales con grasas provenientes de una industria productora de aceites vegetales (Barranquilla, Colombia). Para el aislamiento se utilizó el método de siembra por extensión en superficie. Las cepas seleccionadas fueron purificadas por siembra en medio de cultivo solido GEN (glucosa, extracto de levadura, cloruro de sodio, agar) a 30°C por 24 horas en el caso de las bacterias, y los hongos en en el medio de cultivo sólido PDA (papa dextrosa agar, Merck) a 25-30°C por 72 horas. Posteriormente, cada aislamiento fue conservado por triplicado en microtubos con caldo conteniendo glicerol al 40% y almacenados a -20°C.

Evaluación de la actividad enzimática en los aislamientos

Detección de la actividad lipolítica. Los microorganismos fueron cultivados en 5 mL del medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) modificado, ($NaNO_3$ 10 mM, KH_2PO_4 4 mM, Na_2HPO_4 16 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 0,4mM, $CaCl_2$ 60 μM y $(NH_4)_2SO_4$ 9,8 mM) pH 7,0 [9], previamente emulsificado por ultraagitación durante 15 minutos. Los cultivos se incubaron a 30°C por 48 horas a 250 rpm. Luego se tomaron alícuotas de 1 mL y se pasaron por filtros de 0,22 micras para obtener el sobrenadante libre de células en el que se encontraban las enzimas secretadas. Para la detección hidrolítica de los triacilgliceroles

se emplearon dos estrategias, la primera consistió de cajas de Petri con agar FAM + aceite de oliva (1% v/v) suplementado con Rodamina B al 0,001% [10], a las que se les hicieron pozos de 6 mm de diámetro para adicionarles 80 μL del filtrado libre de células. Los cultivos fueron incubados a 30°C por 24-48 horas. Luego fueron sometidas a luz U.V (350 nm) por 15 minutos para detectar la actividad hidrolasa. La segunda estrategia consistió en utilizar agar Tributirina (peptona de carne 2,5 g/L, Bacto peptona 2,5 g/L, extracto de levadura 3,0 g/L, tributirina 10 mL/L y agar 20 g/L) [7], previamente, cada aislamiento se cultivó en 5 mL de caldo Luria Bertani (30°C, 24 horas, 250 rpm) y 80 μL de este cultivo fueron inoculados en pozos realizados al agar tributirina para observar el halo de hidrólisis en la superficie del medio de cultivo.

Ensayo con lipasa extracelular. La lipasa extracelular de todos los aislamientos fue cuantificada por un método espectrofotométrico, usando p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) (Sigma-Aldrich) como sustrato [11]. En este método se midió la hidrólisis del p-NPP para liberar p-nitrofenol (p-NP). Se disolvieron 30 mg de p-NPP en 10 mL de isopropanol y 90 mL de Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) en su orden. De esta mezcla se tomaron 150 μL y la reacción se inició al agregar 100 μL del filtrado libre de células crecidas en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v). Después de 1 hora de incubación a 37°C, se midió la absorbancia a 405 nm en un Microplate Reader Model 680XR (BIO RAD) contra un control que contenía los mismos componentes excepto el filtrado libre de células. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones del ensayo.

El microorganismo que presentó la mayor actividad lipolítica en la evaluación con el método de *p*-NPP fue seleccionado para la realización de ensayos posteriores que permitieran identificar y caracterizar el microorganismo productor y evaluar parcialmente la lipasa producida por éste.

Efecto del pH en la producción de la enzima. Para la determinación del pH óptimo de crecimiento del microorganismo y para la producción de la enzima, la cepa seleccionada con mayor actividad lipolítica se cultivó en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) a pHs de 6, 7, 8, 9, y 10, para lo que se emplearon las soluciones buffer Tris HCl 100 mM (pH 6,0 –7,0) y Glicina NaOH 50 mM (pH 8,0 - 10). Los cultivos microbianos fueron incubados a 30°C por 48 horas a 250 rpm. Los filtrados libres de células se evaluaron con *p*-NPP, como se describió anteriormente. Cada valor de pH se ensayó por triplicado. Con el control negativo (medio de cultivo sin inóculo) se hizo el mismo procedimiento, así, como también con el control positivo, medio de cultivo con la enzima comercial Lipasa (EC 3.1.13) Tipo VII (*Candida rugosa*), (Sigma Aldrich).

Efecto de la temperatura en la producción de la enzima. Para la determinación de la temperatura óptima en la producción de la lipasa, la cepa seleccionada se cultivó en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) pH 8 y se incubaron a diferentes temperaturas (26, 30, 50, 60, 70 y 80°C) por 48 horas a 250 rpm. Posteriormente, el filtrado libre de células se ensayó con *p*-NPP. Cada ensayo de temperatura se realizó por triplicado. Los controles fueron sometidos a las mismas condiciones.

Evaluación de la estabilidad térmica y efectos del pH en la lipasa.

Para la evaluación de las propiedades de la enzima, la cepa seleccionada se cultivó en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) pH 8.0 a 30°C por 48 horas a 250 rpm, luego de obtener el sobrenadante libre de células, éste sirvió como extracto enzimático, se incubó por una hora a diferentes temperaturas (37, 50 y 60°C) a pH de 8,0 y 9,0 antes de iniciar la reacción enzimática al añadir la solución de *p*-NPP. Cada ensayo se hizo por triplicado con sus respectivos controles.

Caracterización bioquímica y molecular del microorganismo con mayor actividad lipolítica

El microorganismo que mostró la mayor actividad lipolítica fue caracterizado bioquímicamente usando el sistema MicroLog™ Minutes, GN2 Microplate™ BIOLOG y el programa del sistema de identificación microbiana, MicroLog™ y evaluado en diferentes medios de cultivo microbiológicos.

La amplificación de los genes que codifican para el RNA 16S se realizó por PCR a partir del ADN genómico, extraído a partir de cultivos de 16 horas en caldo Luria Bertani (LB), para la PCR se emplearon iniciadores universales para esta región, Eubac 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-GGTTACATTGTTACGACTT -3´); y un segundo juego de primers, 357F (5´ CTCCTACGGGAGGCAG-

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (36-44) Enero _ Junio 2017

CAG-3´) y 1100R (GGGTTGCGCTCGTTG). La mezcla de reacción contenía buffer 2,5 μL, $MgCl_2$ 2,5 μL, 0,5 μLdNTPs, 1,5 μL DNA polimerasa, 16,5 μL de H_2O, 2,5 μL de primers y 1 μL de DNA genómico. Las condiciones de la PCR fueron un ciclo a 95°C por 2:30 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min; 55,8°C por 40 s, 72°C por 1:30 min y un ciclo final a 72°C por 7 min; la reacción se llevó a cabo en un iCyclerThermalcycler, de BIO-RAD.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados. Las secuencias del ADNr 16S obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos de GenBank (Nacional Center for Biotechonology Information).

Purificación parcial de la enzima y electroforesis en gel

El microorganismo seleccionado se cultivó en 250 mL del medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) a 30°C, por 48 horas a pH 8.0 a 250 rpm. Luego se centrifugó a 8500 rpm por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 micras. Las proteínas allí presentes, fueron precipitadas con acetona y etanol [12]. Los precipitados se resuspendieron en 25 µL de Tris HCl 100 mM pH 7,0, para ser separados por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10 y 12% y determinar el peso molecular de las proteínas parcialmente purificadas. Se utilizaron como marcadores una mezcla de estándares de alto peso molecular para electroforesis SDS (Sigma). Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie R-250 y nitrato de plata.

RESULTADOS

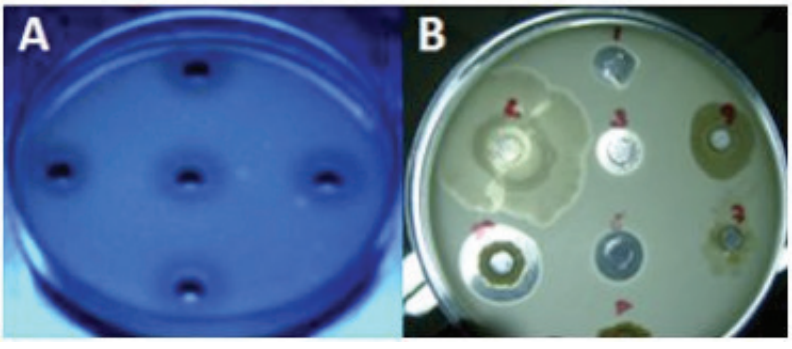
Aislamiento de los microorganismos y la detección de la actividad lipolítica

A partir de las muestras analizadas se obtuvieron 149 aislados microbianos, de éstos 128 correspondían a bacterias y 21 a hongos. La totalidad de los aislados obtenidos fueron cultivados en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) suplementado con Rodamina B al 0,001%, (Figura 1A). De los 149 aislados obtenidos, 37 (cerca del 25%) mostraron actividad lipolítica en medio FAM y halo de lipólisis en agar tributirina (Figura 1B).

El medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) permitió probar la actividad lipolítica sobre el sustrato para las lipasas verdaderas. La fluorescencia alrededor de los pozos positivos evidenció la producción de la lipasa como enzima extracelular, que hidrolizó los enlaces éster carboxil de las moléculas de triacilglicerol aportadas por el aceite, para generar glicerol más ácidos grasos, los cuales se unieron a la Rodamina B y emitieron una señal al excitarse con la luz U.V [3]. La producción de la enzima fue estimulada por la limitación del sustrato (aceite de oliva) como única fuente de carbono [13].

En el agar tributirina se observó el halo de degradación alrededor de los pozos positivos, pero como las lipasas verdaderas catalizan la hidrólisis en las cadenas relativamente largas de acilgliceroles mayores de 10 átomos de carbono y el sustrato aportado por la tributirina consta de menos de 10 átomos de carbono (sustrato para esterasas), no permitió seleccionar

Figura 1. Evaluación en los medios de cultivo. (A) Fluorescencia en pozos positivos de cepas seleccionadas en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) suplementado con Rodamina B al 0,001%. (B) Halo de hidrólisis en agar tributirina.



los aislamientos con lipasas verdaderas, no obstante estas enzimas son capaces de hidrolizar la tributirina [11,14]. Por lo tanto, su halo de hidrólisis se tomó como una referencia para la observación de la fluorescencia en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva suplementado con Rodamina B, que fue el ensayo determinante.

Ensayo con la lipasa extracelular

La totalidad de los sobrenadantes obtenidos de los medios de cultivos inoculados con los 149 aislados, se evaluaron con *p*-NPP, un sustrato de 16 átomos de carbono que permitió medir la actividad de la lipasa extracelular presente en el sobrenadante para liberar *p*-NP, donde el incremento de la coloración amarilla es directamente proporcional a la cantidad de enzima producida por las cepas. De los 149 aislados, 37 mostraron un incremento en la absorbancia a 405 nm. Cinco aislados bacterianos mostraron la mayor absorbancia en las condiciones del ensayo (datos no mostrados), pero de ellos se seleccionó la cepa CCEI-1 para ser identificada y caracterizada por presentar la mayor actividad enzimática. La identificación bioquímica y molecular indicó que se trataba de una cepa de *Serratia marcescens*.

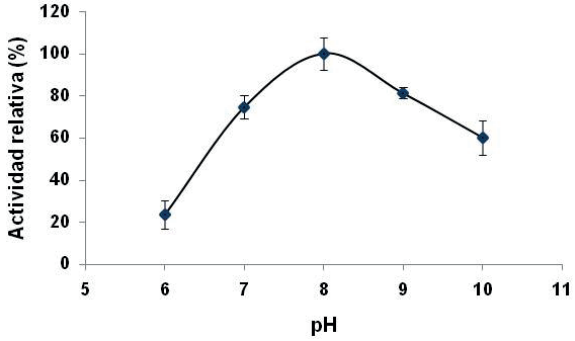
La conformación estructural del *p*-NPP con 16 carbonos ha permitido su uso para identificar lipasas verdaderas [11], considerando que las esterasas prefieren las cadenas acilo cortas en los compuestos ésteres de *p*-NP [15]. La mayor limitación de *p*-NPP es que las reacciones enzimáticas no pueden realizarse a pH ácidos pero, a pH neutros y alcalinos pueden evaluarse acertadamente con este sustrato [16].

Efecto del pH y la temperatura sobre la producción enzimática

Con el *p*-NPP como sustrato, la cepa CCEI-1 mostró la mayor capacidad para sintetizar lipasas a un pH de 8,0, aunque, su actividad lipolítica también fue estable en rangos de pH neutros y alcalinos (7 y 9) evidenciados por la hidrólisis enzimática entre el 74 y 81%, respectivamente (Figura 2). Estos resultados coinciden con el comportamiento de una lipasa recombinante de *Serratia marcescens* expresada en *Escherichia coli* [17] y de *Serratia marcescens* ECU1010 [18].

La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo CCEI-1 para la síntesis de la enzima lipasa y la hidrólisis del aceite de oliva en las condiciones de ensayo fue 30°C. Sin embargo, es importante resaltar que también se dio

Figura 2. Efecto del pH en la producción de la lipasa por *S. marcescens*CCEI-1. Los cultivos fueron incubados a 30ºC, 250 rpm por 48 horas antes de evaluar la actividad lipolítica.

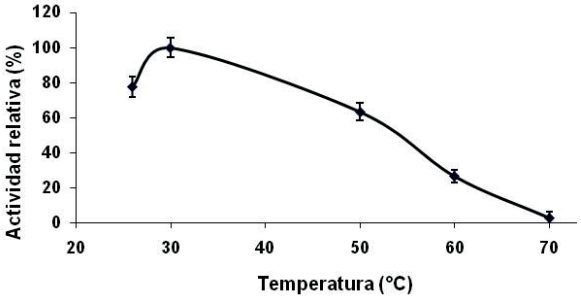


producción enzimática a 50°C, conservando cerca del 63% de su actividad (Figura 3), mientras que a 60°C la hidrólisis disminuye cerca del 70%. Este comportamiento de la lipasa producida por *S. marcescens* CCEI-1, coincide con el lugar en el que fue tomada la muestra, dado que los efluentes salen con temperaturas elevadas, entre 50 y 70ºC por los procesos requeridos durante la refinación del aceite; permitiendo inferir que el microorganismo produce una enzima termoestable y funcional en pH alcalinos, lo cual podría favorecer futuras aplicaciones biotecnológicas en la fabricación de detergentes o en los procesos de biorremediación de aguas residuales con altos contenidos grasos [4].

Evaluación de la estabilidad térmica y efectos del pH en la lipasa

El extracto enzimático que contiene la lipasa producido por la cepa CCEI-1, presentó estabilidad en un rango de pH entre 8 y 9, alcanzando la mayor actividad enzimática a

Figura 3. Efecto de la temperatura en la producción de lipasa por *S. marcescens* CCEI-1. La cepa inoculada en el en medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva (1% v/v) a un pH de 8.0 a 30°C.



Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (36-44) Enero _ Junio 2017

pH 8,0 y a una temperatura de 37°C, también, se detectó una considerable hidrólisis del sustrato a 50°C donde se mantuvo por una hora el 60 % de su actividad relativa (Figura 4). Existen reportes de la estabilidad térmica en la lipasa extracelular de *S. marcescens* a 50°C [19], las lipasas *m*G1 y *s*G1 de *S. marcescens* expresadas en la levadura *Kluyveromyces lactis* mostraron actividades relativas de 60 y 29% respectivamente, *a 45°C* durante 30 minutos [20], mientras que la lipasa CCEI-1L, del presente estudio, tuvo una mayor actividad relativa considerando la temperatura y tiempo de incubación (50°C por 1 hora). La lipasa ECU1010 retuvo el 71% de estabilidad a 50°C durante una hora [18].

En las condiciones de ensayo de esta investigación, no se evaluó la variable temperatura entre 30 y 50°C durante los experimentos con *S. marcescens*, pero la estabilidad que muestra el extracto enzimático a 37 y 50°C permiten inferir que posiblemente su temperatura óptima de producción enzimática sea superior a 30°C.

La mayor estabilidad de la enzima CCEI-1L a pH de 8,0 a 37 y 50°C concuerdan con las evaluaciones del efecto del pH en la producción de la lipasa por la cepa CCEI-1, donde se observó una mayor actividad de la enzima a un pH de 8,0. Las lipasas *m*G1 y *s*G1 alcanzaron su mayor estabilidad en buffers con pH de 7,5 y 7,0 respectivamente, a 25°C durante 10 minutos de incubación [20], mientras que la lipasa CCEI-1L, la obtuvo a 37°C a pH 8,0 durante 1 hora de incubación.

Caracterización bioquímica y molecular del microorganismo con mayor actividad lipolítica

La cepa CCEI-1 mostró ser un bacilo Gram negativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, hemolítica, productora de un pigmento rojo (posible prodigiosina), no precipitó los componentes ni fermentó la lactosa cuando creció en agar MacConkey, se caracterizó bioquímicamente frente a 95 sustratos y fue identificada como *Serratia marcescens* utilizando el sistema de identificación microbiana Biolog (MicroLog™) con un 99% de probabilidad y un índice de similaridad (SIM) de 0,957.

Los análisis comparativos del fragmento secuenciado de 16S rDNA de 600 pb con las secuencias depositadas en la base de datos del GenBank NCBI mostraron homología con *Serratia marcescens* con una similaridad del 99%.

Se realizó una extracción parcial y prueba presuntiva del pigmento producido por *S. marcescens* y resultó positivo para prodigiosina, metabolito secundario de color rojo intenso caracterizado por una estructura común pirrolidipirrolilmetano, producido por varios microorganismos incluyendo especies de los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Aunque, no se ha definido su papel en la fisiología de la bacteria, se ha reportado su actividad antifúngica, bactericida, antitumoral y antiprotozoaria [21,22].

La cepa CCEI-1 de *S. marcescens* presentó un óptimo crecimiento con una pigmentación roja en agar BUG suplementado al 5% v/v con sangre (BIOLOG), agar Tributirina, agar Rhodamina B y agar MacConkey (Figura 5B), mientras que, en agar GEN, a pesar de tener un crecimiento óptimo, la pigmentación disminuyó por la presencia de la glucosa en el medio de cultivo que inhibió la síntesis de la prodigiosina (Figura 5A), posiblemente, debido a una represión catabólica [22,23]. En los medios de cultivo con fuentes de lípidos, *S. marcescens* CCEI-1 presentó un incremento en la pigmentación; por lo tanto, los medios de cultivo con fuentes de grasas podrían ser un sustrato económico para la producción de prodigiosina o de lipasas microbianas para usos biotecnológicos, que podrían reemplazar la glucosa dado que ésta, durante su fermentación dis-

Figura 4. Efecto del pH y la temperatura en la estabilidad de la lipasa producida por *S. marcescens*CCEI-1.

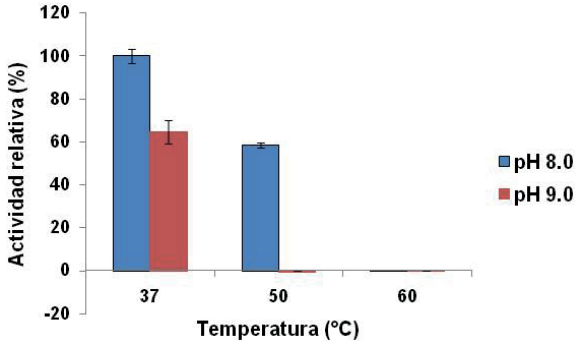
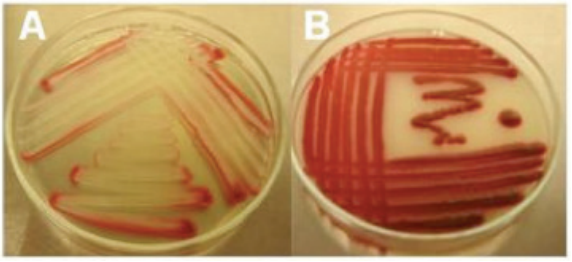


Figura 5. Producción de pigmento por *S. marcescens* CCEI-1 en medios de cultivo. (A) Agar GEN, sin lípidos. (B) Agar tributirina.



minuye el pH inhibiendo así el crecimiento celular y en consecuencia la síntesis de la prodigiosina [22].

S. marcescens es una bacteria mesófila pero hay reportes que indican que a 37°C disminuye su pigmentación [21]. En este estudio *S. Marcescens* CCEI-1a un pH de 8,0 tuvo la capacidad de sintetizar lipasas y el pigmento, (aunque con menor intensidad) a 50°C en el medio de cultivo mínimo FAM + aceite de oliva. La pigmentación de la cepa CCEI-1 fue proporcional al tiempo de incubación, dado que la síntesis del pigmento es altamente variable en especies microbianas y depende de las fuentes de carbono, nitrógeno, temperatura, pH, tiempo de incubación, luz, entre otros [21,23].

Purificación parcial de la enzima y electroforesis en gel

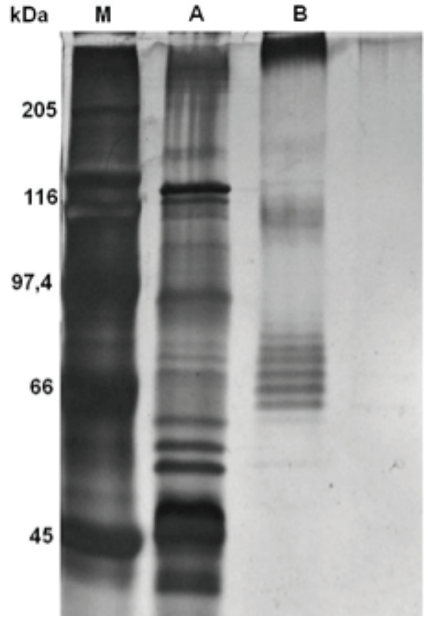
El precipitado de proteínas obtenido por medio de solventes orgánicos, se resuspendió en 25 μL de Tris HCl. Los geles para electroforesis con una concentración de poliacrilamida de12% p/v fueron teñidos con nitrato de plata, el cual mostró la presencia de bandas de diferentes pesos moleculares entre 40 y 116 kDa (Figura 6, línea B). La enzima comercial de *Candida rugosa* (Sigma) fue utilizada como control.

Aunque, no se puede definir cuál banda corresponde a la lipasa de *S. marcescens*, CCEI-1, el empleo de un medio de cultivo con aceite de oliva como única fuente de carbono indica que, una o más bandas pueden corresponder a la enzima de interés. En el precipitado enzimático de *S. marcescens* CCEI-1 se detectaron varias bandas de posibles proteínas alrededor de los 66 kDa, confirmando la presencia de una lipasa microbiana pues existen varios reportes que indican que esta enzima sintetizada por *S. marcescens* tiene pesos moleculares en este rango, 66,2 kDa [18,20], 65k Da [17,19] y 52 kDa [17].

CONCLUSIONES

Las aguas residuales con altos contenidos de grasas y aceites, forman ambientes que estimulan el desarrollo de poblaciones microbianas que usan los lípidos presentes en el medio como fuente de carbono y sustrato para su metabolismo, estas condiciones favorecieron el aislamiento de 37 microorganismos productores de lipasas, entre ellos la cepa CCE-1 identificada como *S. marcescens*, que mostró la mayor actividad enzimática en pH alcalinos y a temperaturas moderadas, la estabilidad de la lipasa bacteriana CCE-1L durante una hora a 50°C, permiten inferir que la enzima y la cepa productora pueden tener posibles aplicaciones biotecnológicas e industriales para usos en biorremediación de aguas contaminadas con grasas o como aditivo para detergentes.

Figura 6.SDS-PAGE (gel al 12%) del extracto de proteínas de la cepa CCEI-1, precipitado y teñido con nitrato de plata. (M) marcador de alto peso molecular. (A) lipasa comercial *Candida rugosa*. (B) precipitado de proteínas de *S. marcescens* CCEI-1.



REFERENCIAS

[1] ANOBOM, C.D., PINHEIRO, A., DE-ANDRADE, R. *et al.* From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. BioMed Research International, 2014, , 2014, p. 1-11.

[2] SHARMA, S. and KANWAR, S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. The Scientific World Journal, 2014, 2014, p. 1-15.

[3] RABBANI, M., BAGHERINEJAD, M., SADEGHI H., *et al*. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 44(4), 2013, p.1113-1119.

[4] CHERIF, S., ALOUI, F., CARRIERRE, F., *et al*. Lipase Pre-Hydrolysis Enhance Anaerobic Biodigestion of Soap Stock from an Oil Refining Industry. Journal of Oleo Science, 63(2), 2014, p. 109-114.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (36-44) Enero _ Junio 2017

[5] BRABCOVÁ, J., DEMIANOVÁ, Z., VONDRÁŠEK, J., *et al.* Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 98, 2013, p. 62-72.

[6] GOPINATH, S., ANBU, P., LAKSHMIPRIYA, T., *et al.* Strategies to Characterize Fungal Lipases for Applications in Medicine and Dairy Industry. BioMed Research International, 2013, 2013, p. 1-10.

[7] SARANYA, P., SUKANYA, H., PRASAD, B., *et al.* Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. Environmental science and pollution research, 21(5), 2014, p. 3907-3919.

[8] FACCHINI, A., VICI, A., PEREIRA, M., *et al.* Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. Journal of Biochemical Technology, 6(3), 2015, p. 996-1002.

[9] PALMEROS, B., GUERECA, L., ALAGÓN, A., *et al*. Biochemical characterization of the lipolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* IGB 83. Process Biochem, 29(3), 1994, p. 207-212.

[10] KOUKER, G. and JAEGER, K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases.Applied and Environmental Microbiology, 53 (1), 1987, p. 211–213.

[11] LI, M., YANG, L., XU, G., *et al*. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. Bioresource Technology, *148*, 2013, p. 114-120.

[12] HASAN, F., SHAH, A. and HAMEED, A. Purification and characterization of a mesophilic lipase from *Bacillus subtilis* FH5 stable at high temperature and pH. Acta Biologica Hungarica, 58(1), 2007, p. 115-132.

[13] CERVANTES, E., SALAZAR, L. y DIAZ, P. Lipasas inducidas por hidrocarburos de petróleo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 29(2), 2013, p. 9-15.

[14] RAO, L., XUE, Y., ZHENG, Y., *et al*. A Novel Alkaliphilic *Bacillus* Esterase Belongs to the 13th Bacterial Lipolytic Enzyme Family. PLoS One, 8(4), 2013, e60645.

[15] JIANG, H., ZHANG, S., GAO, H., *et al*. Characterization of a cold-active esterase from *Serratia* sp. and improvement of thermostability by directed evolution. BMC Biotechnology, 16(1), 2016, p. 1-11.

[16] GUPTA, R., RATHI, P., GUPTA, N., *et al.* Lipase Assays for Conventional and Molecular Screening: An Overview. Biotechnology and Applied Biochemistry, 37, 2003, p. 63-71.

[17] MOHAMMADI, M., SEPEHRIZADEH, Z., EBRAHIM. H., *et al*.Bacterial expression and characterization of an active recombinant lipase A from *Serratia marcescens* with truncated C-terminal region. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 120, 2015, p. 84-92.

[18] ZHAO, L., XU, J., ZHAO, J., *et al*. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent-tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. Process Biochemistry, 43(6), 2008, p. 626-633.

[19] SU, E., XU, J. and YOU, P. Functional expression of *Serratia marcescens* H30 lipase in *Escherichia coli* for efficient kinetic resolution of racemic alcohols in organic solvents. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 106, 2014, p.11-16.

[20] ŠIEKŠTELÉ, R., VETEIKYTĖ, A., TVASKA, B., *et al*. Yeast *Kluyveromyces lactis* as host for expression of the bacterial lipase: cloning and adaptation of the new lipase gene from *Serratia* sp. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 42(10), 2015, p.1309-1317

[21] WANG, S., WANG, C., YEN, Y.,*et al*. Enhanced production of insecticidal prodigiosin from *Serratia marcescens* TKU011 in media containing squid pen. Process Biochemistry, 47(11), 2012, p. 1684-1690.

[22] ZANG, C., YEH, C., CHANG, W., *et al*. Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 45(4), 2014, p. 1133-1139.

[23] DARSHAN, N. and MANONMANI, H. Prodigiosin and its potential applications. Journal of Food Science and Technology, 52(9), 2015, p. 5393-5407

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AUTÓCTONAS AISLADAS DE QUESO DOBLE CREMA Y QUESILLO COLOMBIANO

ANTIMICROBIAL CAPACITY OF NATIVE LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DOUBLE CREAM CHEESE AND COLOMBIAN QUESILLO

CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS NATIVAS ÁCIDO LÁCTICO ISOLADA DE QUEIJO DUPLO CREME E QUESILLO COLOMBIANO

MAYRA-FUENTES FANEGAS[1], ANDRÉS-LONDOÑO ZAPATA[2], MÓNICA-DURANGO ZULETA[3], MARGARITA-GUTIÉRREZ BURITICÁ[4], SUSANA-OCHOA AGUDELO[5], JOSÉ-SEPÚLVEDA VALENCIA[6]

RESUMEN

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) autóctonas han sido reportadas como una alternativa eficiente para la biopreservación natural, la prevención de Enfermedades

---

Recibido para evaluación: 12 de Junio de 2016. **Aprobado para publicación:** 1 de Noviembre de 2016.

1 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo GICTA, Bacterióloga y Laboratorista Clínico. Medellín, Colombia.
2 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo MICROBIOP, Microbiólogo Industrial y Ambiental. Medellín, Colombia.
3 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.
4 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.
5 Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Facultad Ciencias de la Salud, Grupo BIOCIENCIAS, Magíster en Ciencias Biotecnología. Medellín, Colombia.
6 Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Grupo GICTA, Magíster en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Medellín, Colombia.

Correspondencia: mafuentesv@unal.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (45-55) Enero _ Junio 2017

de Transmisión Alimentaria (ETAS) y el mejoramiento de los procesos de producción de alimentos fermentados tradicionales. El objetivo fue evaluar la capacidad antimicrobiana de BAL autóctonas aisladas de Queso Doble Crema y Quesillo frente al crecimiento in vitro de Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 13311 y Listeria monocytogenes ATCC 7644. Se estudiaron 32 aislados, identificados previamente mediante el análisis de secuencias del gen 16S DNAr y caracterizados tecnológicamente. Se comprobó su capacidad antimicrobiana utilizando la técnica de la mancha en agar. Posteriormente, los sobrenadantes libres de células se neutralizaron y filtraron para detectar su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en gel por perforación en placa. Se seleccionaron 8 aislados que mostraron capacidad inhibidora frente a los dos microorganismos patógenos. El aislado identificado como Lactococcus lactis subsp. lactis Q5 presentó una actividad superior, equivalente a 64.000 UA/mL para L. monocytogenes y 4.000 UA/mL para S. typhimurium. Se sugiere que las BAL provenientes de quesos tradicionales colombianos producen sustancias antimicrobianas con potencial bactericida y pueden ser utilizadas en la formulación de un cultivo iniciador con efecto bioprotector.

PALABRAS CLAVE:
Antimicrobianos, *Listeria monocytogenes*, Preservación, *Salmonella typhimurium*, Quesos colombianos.

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) native to have been reported as an efficient alternative for natural biopreservation, prevention of Foodborne Diseases (ETAS) and improvement production processes of traditional fermented foods. The objective was to evaluate the antimicrobial capacity of native BAL isolated from Double Cream Cheese and Quesillo against the in vitro growth of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 13311 and Listeria monocytogenes ATCC 7644. We studied 32 isolates, previously identified by analysis of 16S rDNA gene sequences and characterized technologically. We tested antimicrobial capacity using an agar spot test. Subsequently, cell-free supernatants were neutralized and filtered to detect their antimicrobial activity using the gel diffusion method by drilling plate. We selected 8 isolates showing inhibitory capacity against the two pathogens microorganisms. Isolated identified as Lactococcus lactis subsp. lactis Q5 presented higher activity, equivalent to 64.000 AU/ml for L. monocytogenes and 4.000 AU/ml for S. typhimurium. It is suggested that BAL from traditional cheeses produce antimicrobial substances Colombian bactericidal potential and can be used in formulating a starter culture with bioprotective effect.

KEYWORDS:
Antimicrobials, *Listeria monocytogenes*, Preservation, *Salmonella typhimurium*, Colombian cheese.

RESUMO

Bactérias lácticas (LAB) nativas têm sido relatados como uma alternativa eficiente para biopreservação natural, prevenção de Doenças Transmitidas por Alimentos (ETA) e melhoria dos processos de produção de alimentos fermentados tradicionais. O objetivo foi avaliar a capacidade antimicrobiana de BAL nativa isolado do queijo creme de leite e quesillo contra o crescimento in vitro de Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC 13311y Listeria monocytogenes ATCC 7644. Foram estudados 32 isolados, previamente identificadas por análise de sequências de genes 16S rDNA e caracterizada tecnologicamente. Foi verificada o capacidade

PALAVRAS-CHAVE:
Antimicrobiana, *Listeria monocytogenes*, Preservação, *Salmonella typhimurium*, Queijos colombianos.

antimicrobiana por meio da técnica da mancha em agar. Subsequentemente, os sobrenadantes livres de células foram neutralizadas e filtrou-se para detectar a sua actividade antimicrobiana usando o método de difusão por placa de gel de perfuração. Foram seleccionados isolados 8 que mostram a capacidade inibidora contra os dois agentes patogénicos. Isolado identificado como Lactococcus lactis subsp. lactis Q5 apresentou maior atividade, o equivalente a 64.000 UA/ml para L. monocytogenes e 4.000 AU/ml para S. typhimurium. Sugere-se que a LAB de queijos tradicionais produzem substâncias antimicrobianas colombiano potencial bactericida e pode ser utilizado na formulação de uma cultura de arranque com efeito bioprotector.

INTRODUCCIÓN

Las Bacterias Ácido Lácticas son utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados y sus metabolitos se han empleado como bioconservantes naturales por su capacidad para controlar el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes de los alimentos. Dentro de estos metabolitos se destacan las bacteriocinas, descritos como péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular, estables a bajo pH, sensibles a la acción de las proteasas y termoestables; propiedades que los convierte en los compuestos ideales para sustituir parcialmente el uso agentes químicos en alimentos [1].

De acuerdo a la legislación colombiana, el proceso de elaboración de los quesos artesanales debe involucrar la pasteurización de la materia prima, proceso térmico que afecta la microbiota autóctona presente, principalmente las BAL, las cuales contribuyen a la consolidación del sabor y la textura del producto. Este hecho ha llevado a que los productores empleen ácidos orgánicos como acético, cítrico y láctico y/o cultivos iniciadores comerciales, que pueden llegar a alterar las propiedades organolépticas del queso original.

Diversos estudios plantean la necesidad de evaluar la capacidad tecnológica, probiótica y antimicrobiana de las BAL autóctonas para ser utilizadas en el diseño de cultivos iniciadores específicos, que garanticen la estandarización de los procesos, preservando al mismo tiempo las características que definen su identidad [2,3,4,5]. Entre los productos lácteos elaborados en Colombia donde la microbiota autóctona tiene una influencia significativa, se encuentran el Queso Doble Crema y el Quesillo, definidos como quesos frescos, no madurados, de pasta hilada, color blanco crema, consistencia semiblanda y sabor moderadamente ácido; estos quesos son producidos en los Valles de Ubaté y Valle Alto del Magdalena desde donde se han difundido a otras zonas del país [6, 7]. Su producción artesanal involucra la utilización de leche no pasteurizada, obteniéndose un producto con características organolépticas especiales al paladar de los consumidores.

Los microorganismos patógenos más frecuentemente asociados a la producción de quesos tradicionales son *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* responsables de brotes de ETA asociados con el uso de leche cruda y procesos de producción poco higiénicos [8, 9]. Trabajos anteriores realizados en Colombia han demostrado que el queso campesino, el queso doble crema, la cuajada, el queso costeño y el queso de hoja pueden presentar contaminación con patógenos como *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes;* los cuales llegan a estos alimentos por diferentes factores como la contaminación a partir de las manos del ordeñador, por heces de animales, por contaminación del equipo de ordeño, por aguas contaminadas o por una deficiente cocción en la materia prima [10, 11, 12]. *Listeria monocytogenes*, es un bacilo Gram positivo causante de listeriosis, una grave enfermedad que puede generar desde diarrea hasta meningitis en recién nacidos, es psicrotolerante, soporta pH ácidos y puede llegar a ser halófilo, hecho que dificulta su control en productos lácteos principalmente en quesos frescos [13]. Por su parte, *Salmonella* spp es un bacilo Gram negativo productor de salmonelosis, una de las principales causas de gastroenteritis en humanos y animales. Las infecciones por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis son una causa importante de morbilidad y mortalidad especialmente en niños y personas inmunocomprometidas [14].

El efecto de las BAL autóctonas y sus metabolitos como ácidos orgánicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas frente a microorganismos patógenos, se plantea como una alternativa de conservación, al tiempo que proporciona beneficios a la salud, al prevenir enfermedades gastrointestinales y mejorar la digestión [15]. El presente trabajo busca evaluar la capacidad antimicrobiana de 32 aislados de BAL, seleccionados de acuerdo a su capacidad tecnológica, provenientes Queso Doble Crema y Quesillo frente al crecimiento *in vitro* de *Salmonella typhimurim* y *Listeria monocytogenes*, para su uso potencial en la formulación de cultivos iniciadores autóctonos con efecto bioprotector.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (45-55) Enero _ Junio 2017

MÈTODO

Aislados bacterianos y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizaron 32 aislados de BAL, obtenidos de Queso Doble Crema (QDC) y Quesillo (Q) producidos en los municipios del Valle de Ubaté y Bajo Magdalena para evaluar su capacidad antimicrobiana frente *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Los aislados se obtuvieron en el Laboratorio de Control Calidad (LACMA) de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia y fueron caracterizados molecularmente mediante el análisis de secuencias del gen 16s DNAr en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín en un estudio previo. Así mismo, se les evaluó su capacidad acidificante, proteolítica y lipolítica para valorar su potencial en la formulación de un cultivo iniciador nativo. De las 32 cepas estudiadas, *Lactococcus lactis* (QDC23, QDC18) y *Lactobacillus fermentum* (QDC32) presentaron buena capacidad acidificante y proteolítica. Las cepas de los géneros *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp (*Lactococcus lactis* QDC18, QDC23 QDC30) y *Lactobacillus* sp. (*Lactobacillus fermentum* QDC32) presentaron buena actividad de la enzima B-galactosidasa, propiedad importante en los cultivos iniciadores desarrolladores de sabor en los procesos de maduración.

Las BAL se criopreservaron a -70°C utilizando caldo De Man Rogosa y Sharpe (MRS, Difco Laboratories, Detroit, USA) para bacilos y Caldo M17 (Difco Laboratories, Detroit, USA) para cocos, adicionadas con glicerol como agente crioprotector [16]. Para la realización de los ensayos, los aislados se reactivaron en los medios de cultivo selectivos ya mencionados, a 30°C por 24 horas en condiciones de anaerobiosis [17].

Las cepas de patógenos o microorganismos indicadores utilizadas fueron Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium ATCC® 1331 y Listeria monocytogenes ATCC® 7644, congeladas a -70°C en caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI, Merck, Darmstadt, Alemania) con 30% de glicerol. Salmonella typhimurium fue recuperada en agar Rambach (Merck, Darmstadt, Alemania) y Listeria monocytogenes fue recuperada en agar PALCAM (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom). Después de la incubación a 37°C por 24 horas, ambas cepas fueron subcultivadas en agar tripticasa soya (Merck®) bajo las mismas condiciones [18].

Tamizaje para la detección de la capacidad antimicrobiana

Los 32 aislados de BAL autóctonos fueron evaluados contra las cepas de microorganismos patógenos seleccionados, a partir del método de la mancha en agar descrito por González *et al*. [19]. Para ello, 5 μL del cultivo de cada BAL incubados durante una noche, se sembraron en la superficie de agar MRS o agar M17 (dependiendo del tipo de aislado) y se incubaron a 30°C por 24 horas. Luego del período de incubación, se tomaron 7 mL de agar tripticasa soya semisólido (Merck®, caldo, más 0,7% de agar-agar) previamente inoculados con 100 μL del microorganismo indicador (1,5 x 10^8 UFC/mL) y se adicionaron sobre cada una de las placas de agar. Se incubaron nuevamente a 37°C por 24 horas. Se interpretó como positiva la prueba donde se presentaron zonas de inhibición correspondientes a un halo igual o mayor a 2 mm, con el fin de seleccionar las que mostraran mayor capacidad antimicrobiana simultáneamente para ambos patógenos. Cada procedimiento se realizó por triplicado.

Obtención de extractos libres de células

Los aislados seleccionados se incubaron en 250 mL de caldo MRS o M17, con adición del 10% del inóculo a una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL durante 48 horas a 30°C a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, las células se retiraron por centrifugación a 10.000×g por 20 minutos a 4°C [20]. Cada sobrenadante libre de células se ajustó a un pH de 6,0 con NaOH 1N para inhibir el efecto de ácidos orgánicos y se filtraron a través de membranas de 0,22 μm [21]. Para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se realizaron seis diluciones sucesivas en base 2 (cada dilución fue realizada por triplicado).

Las Unidades de Actividad evaluadas fueron:

$^1/_2 = 2\times10^3$ UA/mL

$^1/_4 = 4\times10^3$ UA/mL

$^1/_8 = 8\times10^3$ UA/mL

$^1/_{16} = 16\times10^3$ UA/mL

$^1/_{32} = 32\times10^3$ UA/mL

$^1/_{64} = 64\times10^3$ UA/mL

Capacidad antimicrobiana de los extractos libres de células

La capacidad antimicrobiana fue confirmada usando el método de difusión en gel por perforación en placa [19, 22]. Se tomaron 15 mL de agar tripticasa soya semisólido fundido a 45°C y se inocularon con 100 μl de cada microorganismo patógeno a una concentración de 1,5 x 10^8 UFC/mL en cajas independientes. Una vez solidificado el agar, se cortaron pozos de 5 mm de diámetro, con el fin de adicionar 50 μL de las diluciones sucesivas preparadas de cada sobrenadante, por triplicado. Las placas se almacenaron de 3-4°C durante 2 horas para permitir la difusión del extracto y se incubaron a 37°C por 24 h. La actividad antimicrobiana se expresó en Unidades de Actividad por mililitro (UA/mL), la cual está definida como el recíproco de la máxima dilución (base 2) a la cual se obtiene un halo de inhibición igual o superior a 2 mm [20]. La nisina, un agente antimicrobiano producido por *Lactococcus lactis*, que actúa frente a bacterias Gram positivas [23] se utilizó como sustancia inhibidora de referencia por ser la única bacteriocina aprobada legalmente por la Administración de Alimentos y Cosméticos y ha sido utilizada en algunos trabajos a una concentración de 1 g/L [24]. Como control negativo se utilizó caldo MRS y M17 ajustados a un pH de 6.

Análisis estadístico

La capacidad antimicrobiana de los 32 aislados autóctonos sobre los dos microorganismos patógenos fue analizada a través de un diseño completamente aleatorio con un solo factor (Capacidad antimicrobiana) y dos variables respuestas (*L. monocytogenes* y *S. typhimurium)*, para hallar las diferencias entre los tratamientos, utilizando un nivel de significancia de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Tamizaje para la detección de la capacidad antimicrobiana

De los 32 aislados de BAL sometidos al método de la mancha en agar se observó que 18 no presentaron capacidad antimicrobiana frente a los dos patógenos evaluados, 14 mostraron actividad frente a *L. monocytogenes* y 8 de ellos frente a *S. typhimurium* (Cuadro 1). Se encontraron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las zonas de inhibición presentadas por las BAL para los dos patógenos evaluados.

La mayor actividad inhibitoria se registró para *L. monocytogenes*, resultados que evidencian una característica relevante descrita para los compuestos antimicrobianos producidos por BAL, quiénes presentan una fácil interacción con los lípidos aniónicos de la membrana de las bacterias Gram positivas, favoreciendo la formación de poros, que afectan el estado energético y en consecuencia producen la muerte celular [1]. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados en otros estudios realizados con BAL aisladas de alimentos fermentados [25, 26].

Los aislados identificados como *L. fermentum* (Q6) (QDC32) y *L. casei* (QDC31), a diferencia de los demás, presentaron mayor efecto inhibitorio frente a *S. typhimurium*. Nuestros resultados son similares a los encontrados por otros autores, quiénes reportan algunas especies de Lactobacilos con capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas [27, 28] por diversos mecanismos que incluyen la competencia por los nutrientes, la exclusión competitiva y la reducción del pH por la producción de metabolitos como ácido acético y láctico, lo cual podría explicar este comportamiento [29].

Investigaciones anteriores indican que dentro de las BAL aisladas de productos lácteos tradicionales que están generalmente asociadas con inhibición de patógenos se encuentran *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* [19,30]. En este estudio en particular los géneros con mayor actividad fueron *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus.*

Capacidad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células

Un paso para la purificación parcial de sustancias antimicrobianas es la obtención de sobrenadantes libres de células con posterior neutralización del pH que facilita la extracción de los metabolitos celulares. En este estudio se seleccionaron los ocho aislados que presentaron capacidad antimicrobiana para ambos patógenos. Se obtuvo el extracto de estos aislamientos, para posterior confirmación de su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en gel por perforación en placa a diferentes concentraciones. Cada uno de los sobrenadantes estudiados mostró

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (45-55) Enero _ Junio 2017

Cuadro 1. Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas utilizando el método de la mancha en agar.

Cepa	Código	Zona de inhibición (mm)*	
		S. typhimurium	*L. monocytogenes*
Lactococcus sp.			
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Q1	–	–
Lactococcus lactis subsp. *lactis* (CV56)	Q2	–	2,4±0,53
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Q5	2,9±0,17	3,5±0,50
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Q8	–	–
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Q10	–	2,0±0,15
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	Q13	–	2,0±0,10
Lactococcus lactis	Q3	–	–
Lactococcus lactis	QDC17	–	–
Lactococcus lactis	QDC18	–	–
Lactococcus lactis	QDC23	–	–
Lactococcus lactis	QDC30	–	–
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	Q15	–	–
Leuconostoc sp.			
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	Q12	2,5±0,32	2,7±0,31
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	QDC22	–	2,7±0,46
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides*	QDC29	–	–
Leuconostoc citreum	QDC20	–	–
Enterococcus sp.			
Enterococcus sp	Q4	–	–
Enterococcus faecium	QDC24	–	–
Enterococcus faecium	QDC25	–	2,0±0,00
Enterococcus faecium	QDC26	–	–
Enterococcus faecium	QDC27	–	–
Enterococcus lactis	Q7	2,5±0,40	2,7±0,57
Pediococcus sp.			
Pediococcus acidilactici	QDC16	–	–
Pediococcus acidilactici	QDC21	–	–
Pediococcus pentosaceus	QDC19	–	–
Streptococcus sp.			
Streptococcus infantarius	Q11	2,7±0,10	2,5±0,50
Streptococcus lutetiensis	Q14	–	2,7±0,57
Lactobacillus sp.			
Lactobacillus fermentum	Q6	10,0±0,06	5,0±0,60
Lactobacillus fermentum	QDC32	12,0±1,00	8,0±2,00
Lactobacillus casei	QDC31	18,0±0,58	9,0±3,05
Weissella sp.			
Weissella viridescens	QDC28	–	–
Bacillus sp.			
Bacillus amyloliquefaciens	Q9	2,0±0,00	3,3±0,58

* Media ± DS de determinaciones por triplicado.

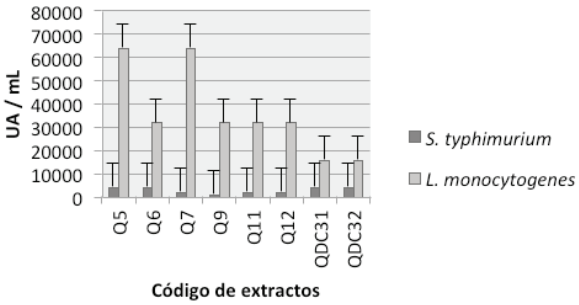
(–) Ausencia de inhibición. Halos <2 mm se consideraron inhibición negativa.

una actividad antimicrobiana variable dependiendo del patógeno, presentando un mejor efecto inhibitorio para *Listeria monocytogenes* que para *Salmonella typhimurium* (Figura 1).

Dentro de los sobrenadantes con mayor capacidad se encuentran *L. lactis* subsp. *lactis* (Q5), el cual presentó una actividad de 64.000 UA/mL para *L. monocytogenes* y de 4.000 UA/mL para *S. typhimurium*, resultados que concuerdan con los reportados por otros autores [31, 32, 33], quiénes observaron que el efecto antimicrobiano de esta BAL está generalmente asociada a bacterias Gram positivas, especialmente frente a *Listeria monocytogenes.* Sin embargo, existen reportes de efecto antimicrobiano de *Lactococcus lactis* contra Gram negativos [34]. El mecanismo de sensibilidad no ha sido bien determinado, aunque se ha descrito que pequeñas lesiones en la membrana celular externa puede facilitar el acceso de la sustancia antimicrobiana a la membrana citoplasmática de las mismas [35]. Entre el grupo de las BAL, *Lactococcus lactis* juega un papel importante en los procesos de fermentación en la industria láctea. Su papel esencial en la acidificación de la leche, contribuye considerablemente a la formación del sabor en los quesos mediante la producción de péptidos y aminoácidos, además impide el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes y proporciona las condiciones óptimas para la maduración, razones por las cuales se utiliza en cultivos iniciadores comerciales para la producción de quesos y leches fermentadas [36].

Por su parte, *Enterococcus lactis* (Q5) presentó una actividad de 64.000 UA/mL para *L. monocytogenes,* resultados acordes con los reportados por Favaro *et al*. [37] y Aran *et al*. [38]. La actividad frente a *S. typhimurium* fue baja (2.000 UA/mL). No se encontraron estudios que

Figura 1. Capacidad antimicrobiana de sobrenadantes de BAL en UA/mL contra *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*



asocien a los enterococos con inhibición de este patógeno Gram Negativo, debido a que estos microorganismos presentan una capa de lipopolisacáridos en su membrana externa que actúa como una barrera de permeabilidad para la célula, inhibiendo la entrada de moléculas hacia la membrana citoplasmática [39].

Así mismo, el extracto de *Lactobacillus fermentum* mostró una actividad de 32.000 UA/mL para *L. monocytogenes* y de 4.000 UA/mL para *S. typhimurium* (Figura 2), resultados similares a los mencionados por otros autores, quiénes han trabajado el efecto de *Lactobacillus fermemtum* en el control de la proliferación de bacterias patógenas tanto Gram negativas como Gram positivas en productos lácteos fermentados naturalmente. Este microorganismo ha sido descrito como productor de diferentes compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, catabolitos de oxígeno, bacteriocinas, péptidos de más bajo peso molecular y otros compuestos como reuterina y reutericiclina [40].

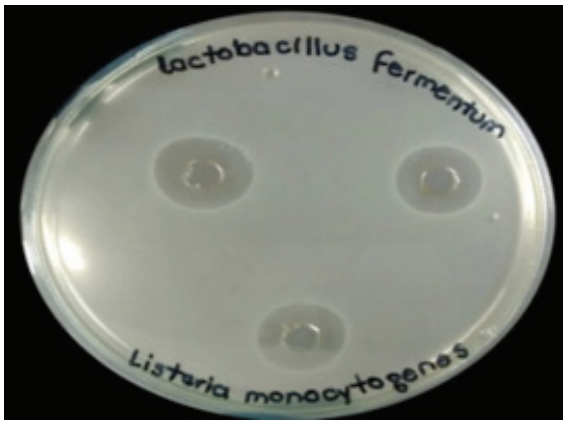
Se han reportado cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de alimentos como leche de cabra, queso y productos fermentados, con capacidad para producir sustancias antimicrobianas con efecto antilisterial [41]. Daba *et al*. [42] aislaron una cepa de *L. mesenteroides* UL5 de queso Cheddar productora de una bacteriocina denominada mesenterocina, cuya actividad del extracto libre de células fue >11,703 UA/mL para *L. monocytogenes*. Otras bacterias Gram negativas como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella choleraesuis*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens*, y *Yersinia enterocolitica* no se vieron afectadas por el sobrenadante. En este estudio el sobrenadante evaluado de *L. mesenteroides* presentó una actividad frente a *L. monocytogenes* de 32.000 UA/mL y una actividad baja para *S. typhimurium* de 2.000 UA/mL.

Aunque se presentó efecto inhibitorio de los aislados para los dos patógenos, principalmente frente a *Listeria monocytogenes*, se hace necesario la evaluación tecnológica de algunas de las características de los extractos, tales como el efecto a tratamiento térmico, la estabilidad a diferentes pH y el comportamiento frente a enzimas proteolíticas que permitan obtener mayor información sobre el tipo de sustancia antimicrobiana presente y definir a través de técnicas moleculares su identidad como compuesto tipo bacteriocina, descartando la actividad antimicrobiana por compuestos como ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno. Además los aislados con actividad antimicrobiana pueden ser utilizados en la formulación

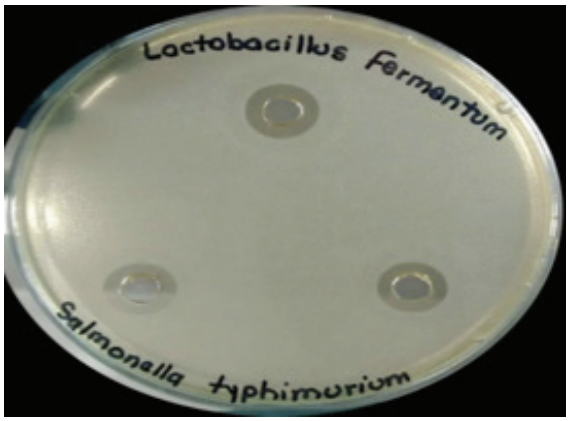
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (45-55) Enero _ Junio 2017

Figura 2. Detección de la capacidad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células por el método de difusión en gel por perforación en placa.

a



b



L. fermentum (QDC31) frente a *L. monocytogenes*; **b.** *L. fermentum* (QDC31) frente *S. typhimurium*.

de un cultivo iniciador autóctono para la elaboración de productos lácteos que contribuya a su inocuidad sin alterar sus características sensoriales propias.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación servirán de apoyo para la aplicación de aislados de BAL autóctonas con capacidad antimicrobiana como bioconservantes naturales en la industria láctea. Sin embargo es relevante la identificación bioquímica y molecular de los metabolitos obtenidos para determinar si se trata o no de compuestos tipo bacteriocinas. La capacidad antimicrobiana exhibida frente a *Listeria monocytogenes*, podría ser una alternativa eficiente para el control de este patógeno, principalmente en quesos frescos y madurados.

Este trabajo abre la puerta a nuevos estudios para la formulación de cultivos iniciadores a partir de BAL autóctonas que puedan ser usadas en la elaboración artesanal de productos lácteos. Sin embargo, antes de cualquier consideración definitiva de estas cepas, deben ser cuidadosamente evaluados para descartar la presencia de todos los factores de virulencia conocidos con el fin de determinar qué riesgos potenciales podrían estar involucrados en su uso.

REFERENCIAS

[1] FAVARO, L., PENNA, A. and TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses–Application in biopreservation?. Trends in Food Science & Technology, 41(1), 2015, p. 37-48.

[2] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 2015, p. 298-306.

[3] LEITE, A., MIGUEL, M., PEIXOTO, R.S., RUAS-MADIEDO, P., PASCHOALIN, V., MAYO, B. and DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 98(6), 2015, p. 3622-3632.

[4] ZANIRATI, D.F., ABATEMARCO, M., DE CICCO-SANDES, S.H., NICOLI, J.R., NUNES, Á.C and NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe, 32, 2015, p. 70-76.

[5] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 2015, p. 298-306.

[6] DURANGO, M., SEPÚLVEDA, U., GUTIÉRREZ, M. y LONDOÑO, A. Caracterización de ácidos grasos, diacetilo y acetoina en Quesillo colombiano. Vitae, 19(1), 2012, p. 376-378.

[7] NOVOA, C.F. y LÓPEZ, N.C. Evaluación de la vida útil sensorial del Queso Doble Crema con dos niveles de grasa. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 55(2), 2008, p. 91-99.

[8] CARRASCOSA, C., MILLÁN, R., SAAVEDRA, P., JABER, J.R., RAPOSO, A. and SANJUÁN, E. Identification of the risk factors associated with cheese production to implement the hazard analysis and critical control points (HACCP) system on cheese farms. Journal of Dairy Science, 99(4), 2016, p. 2606-2616.

[9] MONTEL, M.C., BUCHIN, S., MALLET, A., DELBES-PAUS, C., VUITTON, D.A., DESMASURES, N. and BERTHIER, F. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. International Journal of Food Microbiology, 177, 2014, p. 136-154.

[10] COLOMBIA. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD Y MINISTERIO DE PROTECCIÓN SOCIAL. Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Bogotá (Colombia): Imprenta Nacional de Colombia, 2011, 22 p.

[11] GALLEGOS, J.G., ARRIETA, G., MÁTTAR, S., POUTOU, R., TRESPALACIOS, A. and CARRASCAL, A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. Revista MVZ Córdoba,12(2), 2007, p. 996-1012.

[12] ALBARRACIN, F.Y., SARMIENTO, P., CARRASCAL, A.K. y MERCADO, M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. Bistua, 4(2), 2007, p.30-41.

[13] COELHO, M.C., SILVA, C.C.G., RIBEIRO, S.C., DAPKEVICIUS, M. and ROSA, H. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 191, 2014, p. 53-59.

[14] MILLER, S., AMADI, V., STONE, D., JOHNSON, R., HARIHARAN, H. and ZIEGER, U. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. in small Indian mongooses (*Herpestes auropunctatus*) in Grenada, West Indies. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 37(4), 2014, p. 205-210.

[15] MENDEZ-ROJAS, M.I Identificación bioquímica y evaluación de la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias ácido lácticas aisladas de quesillos artesanales [Tesis Ingeniero de alimentos]. Cuenca (Ecuador): Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología, Escuela de Ingeniería de Alimentos, 2016, p. 5.

[16] LIU, H., ZHANG, L., YI, H., HAN, X. and CHI, C. Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. LWT-Food Science and Technology, 71, 2016, p. 386-390.

[17] OUALI, F.A., AL KASSAA, I., CUDENNEC, B., ABDALLAH, M., BENDALI, F., SADOUN, D. and DRIDER, D. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. International Journal of Food Microbiology, 191, 2014, p. 116-124.

[18] RIPAMONTI, B., AGAZZI, A., BERSANI, C., DE DEA, P., PECORINI, C., PIRANI, S. and TIRLONI, E. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. Anaerobe, 17(3), 2011, p. 97-105.

[19] GONZÁLEZ, L., SANDOVAL, H., SACRISTÁN, N, CASTRO, J.M., FRESNO, J.M. and TORNADIJO, M.E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. Food Control, 18(6), 2007, p. 716-722.

[20] SANKAR, N.R., PRIYANKA, V.D., REDDY, P.S., RAJANIKANTH, P., KUMAR, V.K. and INDIRA, M. Purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from cow milk. International Journal of Microbiological Research, 3(2), 2012, p. 133-137.

[21] IRANMANESH, M., EZZATPANAH, H. and MOJGANI, N. Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. LWT-Food Science and Technology, 58(2), 2014, p. 355-359.

[22] HERREROS, M.A., SANDOVAL, H., GONZÁLEZ, L., CASTRO, J.M., FRESNO, J.M. and TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiology, 22(5), 2005, p. 455-459.

[23] SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI, D.I., VANNINI, L., SALVETTI, E., TORRIANI, S. and LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. Food Microbiology, 54, 2016, p. 11-19.

[24] AMADO, I.R., FUCIÑOS, C., FAJARDO, P., GUERRA, N.P. and PASTRANA, L. Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling *Listeria monocytogenes* in grass and maize silages. Animal Feed Science and Technology, 175(3), 2012, p. 137-149.

[25] DE ALMEIDA-JÚNIOR, W., DA SILVA-FERRARI, Í., DE SOUZA, J.V., DA SILVA, C., DA COSTA, M.M. and DIAS, F.S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. Food Control, 53, 2016, p. 96-103.

[26] TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A., TONKOVIĆ, K., PAVUNC, A.L., BEGANOVIĆ, J., STRAHINIĆ, I., KOJIĆ, M. and GREGUREK, L. Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. LWT-Food Science and Technology, 63(1), 2015, p. 298-306.

[27] ABBAS, MM. and MAHASNEH, AM. Isolation of Lactobacillus strains with probiotic potential from camel's milk. African Journal of Microbiology Research, 8(15), 2014, p. 1645-1655.

[28] MAHMOUDI, I., BEN MOUSA, O., KHALDI, T., KEBOUCHI, M., SOLIGOT, C., LE ROUX, Y. and HASSOUNA, M. Functional in vitro screening of *Lactobacillus* strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. Small Ruminant Research, 137, 2016, p. 91-98.

[29] KUMAR, A. and KUMAR, D. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. Anaerobe, 33, 2015, p. 117-123.

[30] LEITE, A., MIGUEL, M., PEIXOTO, R.S., RUAS-MADIEDO, P., PASCHOALIN, V., MAYO, B. and DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 98(6), 2015, p. 3622-3632.

[31] KRUGER, M.F., DE SOUZA-BARBOSA, M., MIRANDA, A., LANDGRAF, M., DESTRO, M.T., TODOROV, S.D. and DE MELO-FRANCO, B. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. Food control, 33(2), 2013, p. 467-476.

[32] SIROLI, L., PATRIGNANI, F., SERRAZANETTI, D.I., VANNINI, L., SALVETTI, E., TORRIANI, S. and LANCIOTTI, R. Use of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples. Food Microbiology, 54, 2016, p. 11-19.

[33] LEE, N.K., HAN, K.J., SON, S.H., EOM, S.J., LEE, S.K. and PAIK, H.D. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. LWT-Food Science and Technology, 64(2), 2015, p. 1036-1041.

[34] PERIN, L.M. and NERO, L.A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. BMC Microbiology, 14(1), 2014, p. 36.

[35] RODRIGUEZ, E., CALZADA, J., ARQUÉS, J.L., RODRIGUEZ, J.M., NUNEZ, M. and MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. International Dairy Journal, 15(1), 2005, p. 51-57.

[36] PISANO, M.B., FADDA, M.E., MELIS, R., CIUSA, M.L., VIALE, S., DEPLANO, M. and COSENTINO, S. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. Food Control, 51, 2015, p. 1-8.

[37] FAVARO, L., BASAGLIA, M., CASELLA, S., HUE, I., DOUSSET, X., DE MELO-FRANCO, B. and TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. Food Microbiology, 38, 2014, p. 228-239.

[38] ARAN, H., BISCOLA, V., EL-GHAISH, S., JAFFRÈS, E., DOUSSET, X., PILLOT, G. and HWANHLEM, N. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. Food Control, 54, 2015, p. 126-134.

[39] SCHELEGUEDA, L.I., VALLEJO, M., GLIEMMO, M.F., MARGUET, E.R. and CAMPOS, C.A. Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from Odontesthes platensis. LWT-Food Science and Technology, 64(2), 2015, p. 794-801.

[40] TULUMOĞLU, Ş., KAYA, H.I. and ŞIMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. Anaerobe, 30, 2014, p. 120-125.

[41] XIRAPHI, N., GEORGALAKI, M., RANTSIOU, K., COCOLIN, L., TSAKALIDOU, E. and DROSINOS, E.H. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. Meat Science, 80(2), 2008, p. 194-203.
[42] DABA, H., PANDIAN, S., GOSSELIN, J.F., SIMARD, R.E., HUANG, J. and LACROIX, C. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology, 57(12), 1991, p. 3450-3455.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)56-65
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (56-65) Enero _ Junio 2017

EFECTO ANTIMICROBIANO DEL CLAVO Y LA CANELA SOBRE PATÓGENOS

ANTIMICROBIAL EFFECT OF CLOVES AND CINNAMON ON PATHOGENS

EFEITO ANTIMICROBIANO DE CRAVO E CANELA EM ORGANISMOS PATOGÉNICOS

YENIS IBETH PASTRANA-PUCHE[1], ALBA MANUELA DURANGO-VILLADIEGO[2], DIOFANOR ACEVEDO-CORREA[3].

RESUMEN

El uso de especias con características antimicrobianas ha tenido gran relevancia en la industria alimenticia. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos Salmonella spp., Escherichia coli y Staphylococcus aureus utilizando el método de difusión en agar, y diluciones dobles en caldo. Los extractos de canela y clavo estudiados bajo la metodología de difusión en agar, no provocaron ningún efecto antimicrobiano sobre Salmonella spp, mientras que, en sus concentraciones más elevadas (100 y 150 mg/mL), si mostraron un efecto antimicrobiano sobre E. coli y S. aureus, clasificándose como sensibles. En la metodología de diluciones dobles en caldo, se determinó que para el S. aureus ATCC® 29213™ la CMI y la CMB fueron 512 µg/mL y 4096 µg/mL respectivamente y para Escherichia coli O157:H7 la CMI y la CMB fueron 2048 µg/mL y 4096 µg/mL.

Recibido para evaluación: 10 de Septiembre de 2015. **Aprobado para publicación:** 28 de Marzo de 2016.

1 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Alimentos, Sede de Berástegui. M.S.c en Ciencias Agroalimentarias. Córdoba, Colombia.

2 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigacion en Procesos Agroindustriales, Departamento de Ingeniería de Alimentos. PhD en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba, Colombia.

3 Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Grupo de Investigación en Nutrición, Salud y Calidad Alimentaria (NUSCA), Programa de Ingeniería de Alimentos.PhD en Ingeniería de alimentos. Cartagena, Colombia.

Correspondencia: Diofanor3000@gmail.com

ABSTRACT

The use of spices with antimicrobial properties has been very important in the food industry. The aim of this work was to study the antimicrobial effect of clove and cinnamon on the pathogens Salmonella spp., Escherichia coli and Staphylococcus aureus using the agar diffusion method, and double dilutions in broth. The extracts of cinnamon and clove studied under the agar diffusion method, caused no antimicrobial effect on Salmonella spp, while in its highest concentrations (100 y 150 mg/mL) if they showed an antimicrobial effect on E. coli and S. aureus, classified as sensitive. In the methodology of double dilutions in broth, it was determined that for S. aureus ATCC ® 29213™ the CMI and CMB were 512 µg/mL and 4096 µg/mL respectively and E. coli O157:H7 the CMI and CMB were 2048 µg/mL and 4096 µg/mL.

RESUMO

O uso de especiarias com propriedades antimicrobianas tem tido grande importância na indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito antimicrobiano de cravo e canela em patogênico Salmonella spp., Escherichia coli e Staphylococcus aureus, utilizando o método de difusão em ágar, e diluições duplas em caldo. Os extratos de canela e cravo estudadas pelo método de difusão em ágar, não causou nenhum efeito antimicrobiano em Salmonella spp, enquanto em suas concentrações mais elevadas (100 y 150 mg/mL) se mostrou um efeito antimicrobiano em E. coli e S. aureus, classificadas como sensíveis. Na metodologia de diluições duplas em caldo, determinou-se que o S. aureus ATCC para o 29213TM CMI e CMB foram 512 µg/ml e 4096 µg/mL, respectivamente, e Escherichia coli O157: H7, o MIC e CMB foram 2048 µg/ml e 4096 µg/mL.

PALABRAS CLAVE:
Especias, Difusión en agar, *Salmonella spp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus.*

KEYWORDS:
Spices, Agar diffusion, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus.*

PALAVRAS-CHAVE:
Especiarias, ágar, *Salmonella spp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus.*

INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos son compuestos químicos presentes o añadidos en los alimentos, que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto, detienen el deterioro de la calidad y brindan seguridad al alimento [1]. La acción de los antimicrobianos sobre las células de los microorganismos en la conservación de alimentos está basada en una gran variedad de efectos individuales, dentro de los que se incluyen mecanismos físicos, fisicoquímicos y reacciones bioquímicas de la célula afectada. Algunas veces diversos factores individuales pueden producir un efecto tanto acumulativo como de bloqueo [2]. Ellos actúan sobre los microorganismos inhibiendo la síntesis de la pared, de la membrana celular, de los ácidos nucleídos y la de las proteínas.

Los solutos hidrofílicos de menor tamaño son capaces de pasar la membrana externa a través de los poros proporcionando a las proteínas transmembranales canales hidrófilos, mientras que la membrana externa sirve como barrera de penetración hacia macromoléculas y compuestos hidrófobos, y es por esta razón que las bacterias Gram-negativas son relativamente resistentes

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (56-65) Enero _ Junio 2017

a los antibióticos y a las drogas tóxicas hidrófobas [3, 4, 5]. De igual forma, el uso de antimicrobianos como conservantes también, ha sido de gran importancia, al permitir alargar la vida de los productos de anaquel, evitando la colonización por microorganismos alterantes. Un amplio rango de sistemas antimicrobianos naturales ha sido desarrollado a partir de microorganismos, plantas y animales, muchos de ellos ya se han empleado para la conservación de alimentos y otros están siendo investigados para ser usados en estos [6].

El uso de diversos ingredientes con características antimicrobianas como la sal, el azúcar, el vinagre y las especias han tenido gran relevancia en la industria alimenticia [7]. Unas de estas sustancias con esas características son los aceites esenciales (AE) y sus componentes cuyas propiedades antibacterianas están evidentemente relacionadas con su carácter lipofílico, lo que lleva a la acumulación en las membranas y posteriormente, a eventos asociados, como el agotamiento de la energía. Presentan un efecto antibacteriano contra las bacterias Gram-negativas, dado que ellas poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que le proporciona una superficie hidrofílica [8, 9, 10, 11]. Las especias como la canela y el clavo han sido utilizadas en los alimentos no solo por su sabor, sino también, como medicamentos y conservantes [1]. Las especias también estimulan el apetito mediante el aumento de la salivación, y preservan los alimentos por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En el mundo, diferentes países, utilizan más o menos 400 especias, principalmente, para mejorar el sabor y la palatabilidad de los alimentos, esto se demostró en un estudio de Billing y Sherman [12] los cuales evaluaron el uso de 43 especias en 4.578 recetas a base de carne procedentes de 36 países y el por qué las personas las utilizan y llegaron a la conclusión de que en los países de clima caliente, la proporción de recetas con especias, el número de estas utilizadas en cada receta, el número total de ellas, y el uso de la mayoría fueron superiores que en los países de clima frio. En donde, en países con clima caliente, se utilizaron más el ajo, la cebolla, la pimienta, la canela, el comino que en los de clima frio. Por otra parte, las comidas con sabores picantes y con fuerte adición de especias tienen mayor poder antimicrobiano sobre los microorganismos patógenos. Estos mismos autores compararon las propiedades antimicrobianas, de 30 especias y resumieron el espectro antibacteriano de cada especia y observaron que el 80% de ellas inhibieron el crecimiento de más del 50% de las bacterias del estudio, de hecho los clavos y la canela, inhibieron entre el 75 y el 100% de las cepas bacterianas utilizadas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos *Salmonella* spp. *E. coli y Staphylococcus aureus* utilizando el método de difusión en agar, y diluciones dobles en caldo.

MÉTODO

Materia primas

Las astillas de canela y paquetes de clavo, se compraron en Mercado Central de Cereté, Córdoba. Se mezclaron seis gramos de cada especia en un frasco tapa rosca y se les adicionó 200 mL de etanol al 70% v/v [13]. Se forró el recipiente con papel aluminio para evitar la degradación de los posibles compuestos fotosensibles presentes en la matriz alimentaria. Se dejó actuar el solvente a 45ºC por dos días, luego se filtró la solución para la separación de las fases, la líquida fue rotaevaporada a una temperatura que no sobrepasó a la de ebullición del disolvente. El extracto obtenido fue transferido a viales forrados con papel aluminio y almacenados a 4ºC hasta llevar a cabo los análisis de actividad antimicrobiana.

Actividad antimicrobiana

Para la determinación del efecto antimicrobiano se utilizaron dos metodologías, la propuesta por [14, 15] de difusión en agar y la propuesta por CLSI (antes NCCLS) en la que se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y la curva de letalidad.

Difusión en Agar. De los cultivo de las cepas de estudio: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp, con un tiempo de incubación de 18 a 24, se hizo el inoculo con una concentración de 0,5 patrón de McFarland suspendidas en solución salina del medio de cultivo. Previamente, se tomaron discos estériles sumergidos en 20 μL del extracto de clavo y canela diluido en 25% v/v de dimetilsulfoxido (DMSO) en concentraciones de 150, 100, 50 y 25 μg/mL, los cuales se dejaron secar por 12 horas. Los discos impregnados se colocaron en la superficie del medio y el compuesto se dejó difundir, se incubó a 37°C durante 24 horas. Se utilizó ampicilina 10 μg/mL como control positivo y nega-

tivo la oxacillin 5 μg/mL. Se ejecutaron los ensayos en dos fechas con tres repeticiones cada uno. En esta fase se aplicó un análisis descriptivo obteniéndose la media y la desviación estándar. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo el diámetro de la zona de inhibición formado alrededor de los discos.

CMI, CMB y Curva de letalidad. Se determinó la CMI, CMB y la curva de letalidad frente a los microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™ y *Escherichia coli* O157:H7. Para la CMI se partió de una solución madre y stock de 8.500 μg/mL **(**originada del extracto puro rotoevaporado) y 5.120 μg/mL respectivamente, y a partir de ellas se hicieron diluciones dobles en Caldo Muller Hinton (CMH) con diferentes concentraciones del extracto de clavo y canela cuadro 1. En el tubo 1 se tiene un volumen final de 250 μL y se adicionaron 2,5 μL del microrganismo respectivo a cada tubo. Las cepas fueron suspendidas en CMH a partir de un cultivo de 18-24 horas, a una concentración de 0,5 de patrón McFarland. Finalmente, los cultivos se incubaron a 37°C por 24 horas en una incubadora con shaker a 250 rpm. A partir del resultado de la CMI, se realizó la CMB repitiendo el procedimiento de CMI sin proceder a la incubación, e inoculando cada uno de los cultivos, en cajas con agar nutritivo por estrías 5 μL, se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

La CMB se definió como la concentración más baja del extracto que no permitió el crecimiento bacteriano en el agar nutritivo. Con respecto a la curva de letalidad se prepararon soluciones del extracto con la concentración que arrojó la CMI, la mitad y cuatro veces esta., cuadro 2. Se inoculó en cajas con agar nutritivo por estrías 10 μL a partir de los cultivos bacterianos a las 0, 2, 4, 8, y 24 horas, incubándose a 37**°C** durante 24 horas.

RESULTADOS

En la actualidad, se conoce sólo de manera parcial, la composición química de las sustancias antimicrobianas de las especias; sin embargo, los componentes más comunes son los taninos, aldehídos y ácidos orgánicos, presentes también, en el clavo y la canela. Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales (AE), mezclas de diferentes productos volátiles, entre los que se incluyen alcoholes, cetonas-éteres fenólicos, fenoles, ácidos y sus esteres [16].

Para la obtención del extracto, se utilizó tanto, etanol al 70 % v/v y no etanol puro, con base en estudios, que han observado que los extractos obtenidos con etanol/agua presentan mayor eficiencia de extracción que los correspondientes al agua o al etanol independientemente; debido a que el etanol y el agua tienen diferente polaridad y al mezclarse, se incrementa la capacidad de extracción, ya que se extraen los compuestos fenólicos afines al agua y los compuestos fenólicos afines al etanol [13]. Este efecto también fue observado por Hauser *et al.,* [17] que realizaron extracciones de las hojas y del fruto de la murta, encontrando que una mezcla de 50 %v/v etanol/agua resultó más eficiente en la extracción de

Cuadro 1. Concentraciones del extracto de Clavo y Canela para hallar CMI

Tubos	1*	2	3	4	5	6	Control	
[μg/mL]	4096	2048	1024	512	256	128	+	-
							bacteria	Caldo

Cuadro 2. Concentraciones de los extractos de Clavo y Canela para curva de letalidad

Concentración Mínima Inhibitoria	Microorganismo					
	S. aureus			E. coli		
	Concentración	Volumen		Concentración	Volumen	
		Stock	MH		Stock	MH
CMI	512	50 μL	450 μL	2048	50 μL	450 μL
½ CMI	256	25 μL	475 μL	1024	25 μL	475 μL
4 CMI	2048	200 μL	300 μL	8192	200 μL	300 μL

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (56-65) Enero _ Junio 2017

Cuadro 3. Zona de inhibición (mm) del extracto de clavo y canela sobre *Salmonella* spp., *E. coli* y *S. aureus*

Nomenclatura	Día 1			Día 2		
	***Salmonella* spp.**	**E. coli**	**S. aureus**	***Salmonella* spp.**	***E.* coli**	**S. aureus**
	Zona de inhibición (mm)**					
Concentración 150 mg/mL	-	15	15	-	10	15
Concentración 100 mg/mL	-	10	13	-	10	14
Concentración 50 mg/mL	-	9	-	-	9	-
Concentración 25 mg/mL	-	9	-	-	9	-
Control oxacillin (5 Mg)	-	-	-	-	-	-
Control ampicilina (10 Mg)	20	18	17	15	14	18
Control etanol 70 %	-	-	-	-	-	-
Control DMSO al 25 %	-	-	-	-	-	-

polifenoles que con los solventes puros (agua y etanol). También Agafonova *et al.* [18], investigaron con hojas de *Limoniastrum monopetalum* y observaron que se incrementaba el poder de extracción de los compuestos fenólicos, cuando se adicionaba un 20% v/v de agua a otros solventes como el metanol, acetona o etanol.

Difusión en agar. En el cuadro 3 se puede observar los resultados en mm producidos por las zonas de inhibición para cada microorganismo frente a los extractos. Esta medición relaciona la sensibilidad del microorganismo al extracto, según el diámetro del halo, así; los microorganismos se clasifican en: no sensibles (d< 8 mm), sensibles (9 mm<d<14 mm), muy sensibles (14 mm<d<19 mm) y extremadamente sensibles (d>20 mm) [19, 20]. Se puede observar que *E. coli* en el día 1 y *S. aureus* en el día 1 y 2, presentaron una sensibilidad de 9 mm (restando 6 mm del disco) clasificándose como sensibles. Esta medición relaciona la sensibilidad del microorganismo al extracto, según el diámetro del halo, así; los microorganismos se clasifican en: no sensibles (d< 8 mm), sensibles (9 mm < d < 14 mm), muy sensibles (14 mm < d< 19 mm) y extremadamente sensibles (d > 20 mm) [21]

En el caso, de la *Salmonella* spp se observa que para ninguna de las concentraciones estudiadas se obtuvo un efecto antimicrobiano, resultados similares obtuvieron [22, 23] quienes trabajaron con extractos acuosos de clavo y canela sin obtener ningún grado de inhibición considerable. Estos últimos encontraron que los componentes activos de los extractos de clavo y canela son similares entre sí, haciendo suponer que su acción antibacteriana también lo es.

Sin embargo, frente a *E. coli y S. aureus*, se observa el efecto antimicrobiano con la mayor concentración de 150 mg/mL, esto es posible por la presencia de alcaloides, oxhidrilos fenólicos, y el eugenol presente en el clavo, datos reportados por Khan *et al.,* [24], en cambio, en la canela el efecto antimicrobiano lo proporciona el aldehído cinámico [25].

En cuanto a *S. aureus* los resultados de este estudio concuerdan, con lo reportado por Garcia-Caramillo *et al.,* [23] quienes demostraron que el extracto de clavo y canela, presenta un efecto antibacteriano principalmente contra *S. aureus*. Lo anterior, se debe a que el aceite esencial de la canela contiene una alta concentración de trans-cinamaldehído, que es el componente en mayor proporción, también presenta linalol, eugenol y otros compuestos fenólicos. Otros estudios, han identificado al trans-cinamaldehído como el mayor componente antibacterial del aceite esencial de esta especia. El cinamaldehído actúa inhibiendo las amilasas y proteasas provocando el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular [26].

En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles, así, como de las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular, alterando su estructura y haciéndolas más permeables. Como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular [26].

Goñi *et al.,* citado por [27] estudiaron la actividad antimicrobiana por contacto directo y en la fase de

vapor del clavo y la canela , observaron halos de inhibición de 18 y 20 mm por contacto directo para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente, en nuestro caso, los resultados dieron por debajo de las citadas. Estudios hechos por Smith-Palmer *et al.,* [28] con los aceites esenciales de 21 plantas entre las que figuran el clavo y la canela de forma independiente, mostraron halos de inhibición de 14 mm para *E. coli* y *S. aureus*, siendo estos resultados más cercanos a los arrojados en este experimento.

Hernández *et al.,* [29] afirman que en los diversos resultados obtenidos en los estudios que aplican el método de difusión en agar se tienen que tener en cuenta factores tales como; diámetro del disco, cantidad del aceite esencial adicionado, cantidad específica de microrganismos y la fase de crecimiento en que este se encuentre; pues cualquier cambio o descuido en estos factores originará variabilidad en los resultados y diferencias significativas con lo reportado en la literatura.

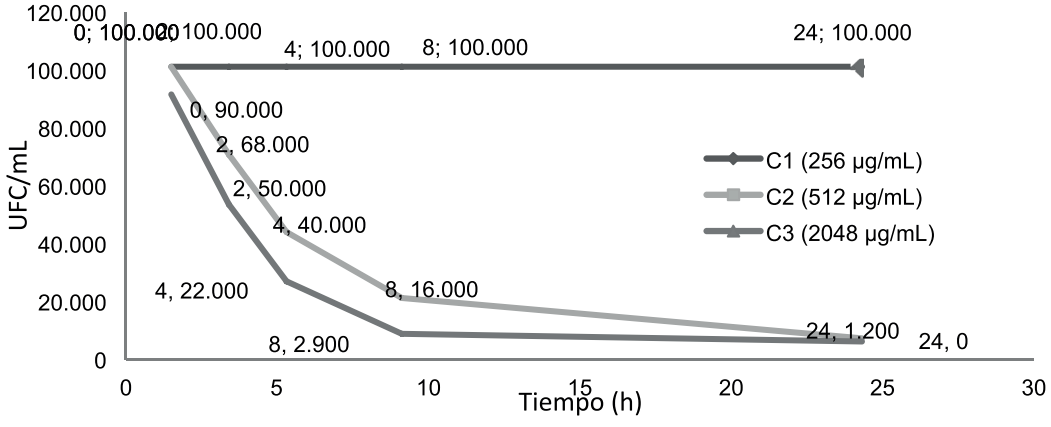
CMI, CMB y Curva de Letalidad de los microrganismos frente al extracto de Clavo y Canela. Esta metodología fue dirigida inicialmente a la determinación de la actividad de los antibióticos pero ha sido modificado para determinar la actividad de los AE; adaptándose para determinar la actividad antimicrobiana de los AE y los extractos de plantas [30, 31]. La CMI se define como la menor concentración del extracto que produce el 90% de reducción en el crecimiento de las colonias. La CMB se define como la mínima concentración del extracto que produce al menos un 99,9% de reducción en el crecimiento de las colonias [20].

La evaluación de la técnica de microdilución en tubo arrojó una CMI de 512 μg/mL para el *Staphyloccoccus aureus* ATCC® 29213™ en la concentración de 512 μg/mL. Moleyar y Narasimhm Citado por Seow *et al.,* [32] estudiaron el efecto inhibitorio de la mezcla del cinamaldehido y el eugenol, componentes fenólicos principales del clavo y la canela, observaron inhibición del *S. aureus* entre 250 y 500 μg/mL, y cuando se evaluaron individualmente, en esas mismas concentraciones no observaron la misma inhibición del crecimiento. Lu *et al.,* [33], confirmaron que el aceite de canela es un agente antibacteriano fuerte. Por otro lado [27] mostraron valores de CMI en fase de vapor de la mezcla de clavo y canela de 54 μg/mL, valor mucho más bajo que el reportado por este estudio.

El mecanismo de acción de los AE contra bacterias Gram positivas, se basa en que los componentes del aceite destruyen la pared celular y la membrana citoplasmática, lo que resulta en el derrame del citoplasma y su coagulación, además, de inhibir la síntesis de ADN, ARN y proteínas [33].

Los resultados de la curva de letalidad se observan en la figura 1; en 256 μg/mL no se da ninguna inhibición, lo que si se da en 512 μg/mL y la eliminación del crecimiento se observa en 2048 μg/mL a las 24 horas. Estos resultados contrastan con las pruebas hechas para CMB del S. aureus que mostro el punto de corte en 4096 μg/mL; explicándose quizás por una serie de factores que influyen en la estimación de la actividad antimicrobiana de los AE, entre los que se encuentran la temperatura, el pH, el potencial óxido-

Figura 1. Curva de Letalidad del *Staphylococcus aureus* frente al extracto de clavo y canela.



Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (56-65) Enero _ Junio 2017

reducción y la actividad de agua, según Hernández *et al.,* [31]; el método utilizado, tipo y volumen del medio, concentración y edad del inoculo, el tipo de cepa del microorganismo en estudio, la temperatura, el tiempo, la atmósfera de incubación y el solvente o agente dispersante.

Para la *Escherichia coli* O157:H7, la CMI arrojo un resultado de 2048 μg/mL, siendo la menor concentración del extracto que produjo el 90% de reducción en el crecimiento. Goñi et al., [29] reportaron valores de CMI para esta bacteria de 90 μg/mL en la mezcla en fase de vapor; y para los extractos independientes de clavo y canela de 27 y 18 μg/mL respectivamente, mostrando un resultado sinérgico, o sea, la actividad conjunta es mayor que las suma de las actividades de los dos antimicrobianos por separado. Esta afirmación es opuesta a la de Lu *et al.,* [33], quienes reportan resultados antagónicos; es decir, en el caso, de *E. Coli,* la actividad conjunta de los extractos es menor que las suma de la actividad de los dos antimicrobianos por separado e indiferentes. Estos resultados tan diversos están explicados, además, de los factores comentados por [29], por las diferencias en la estructura de la canela o el clavo utilizado; pues según Delgado [34], la época y el lugar de recolección, la parte de la planta utilizada y la etapa en la que se encuentre la planta, determinaran la concentración de los componentes mayoritarios en la especia; generalmente los aceites esenciales de plantas que fueron cosechadas durante o inmediatamente después de la floración poseen mayor actividad antimicrobiana. Otro factor importante es el sitio de producción de los compuestos, en algunos casos pueden sintetizarse en toda la planta; en otras especies puede haber producción selectiva de metabolitos en cada órgano de la planta, como ocurre con la canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), que en la corteza del tallo produce altas concentraciones de aldehído cinámico, en las hojas predomina el eugenol y en la corteza de la raíz el camfor.

Algunas investigaciones de actividad antimicrobiana de aceites AE de clavo y canela combinados [20, 27, 35], se realizaron para evaluar el crecimiento de bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella choleraesuis* y cuatro bacterias Gram positivas

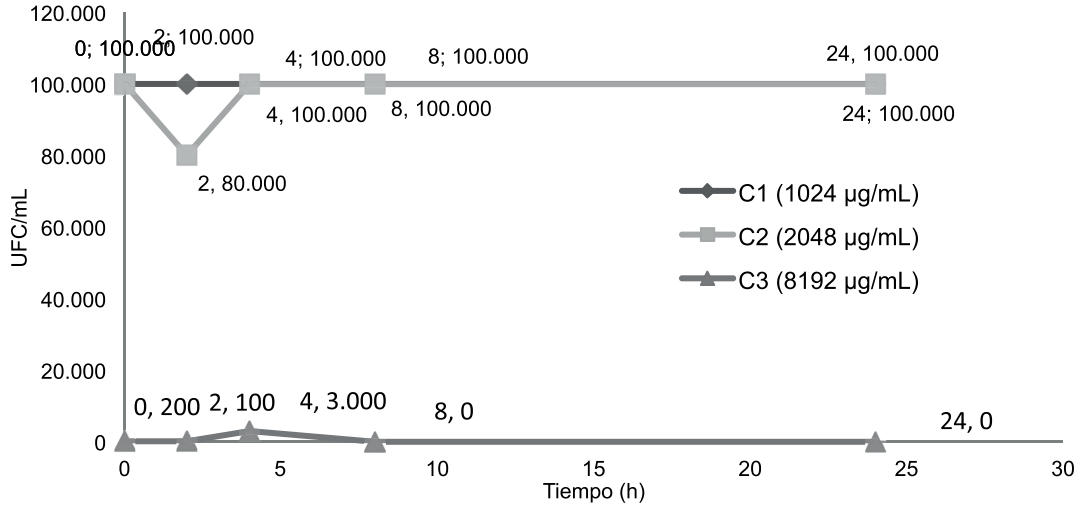
Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus y *Enterococcus faecalis*. Se determinó que ejercen efecto antagónico sobre el crecimiento de *E. coli* y sinérgico en la inhibicion de *L. monocytogenes, B. cereus* y *Y. enterocolitica*.

El eugenol, componente mayoritario del aceite de clavo de olor, y el cinamaldehido, componente de la canela, actúan inhibiendo la producción de enzimas extracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. La adición de los AE presenta una buena respuesta a la inhibición al crecimiento de *E. coli*, es así como, los derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol provenientes del clavo de olor y el tomillo, causan la desintegración de la membrana en la *E. coli* y *S. typhimurium* [33].

Con respecto a la curva de letalidad de la Escherichia coli O157:H7 que se observa en la figura 2; se evidencia que en la concentración 1024 y 2048 μg/mL, no hubo inhibición del crecimiento, mientras que en la concentración 8194 μg/mL se dio una constante inhibición desde el tiempo 0 hasta la finalización del experimento a las 24 horas. La CMB del microrganismo se dio en la concentración de 4096 μg/mL, es decir, a esta es la más baja concentración del extracto de clavo y canela necesario para eliminar el 99% del inóculo inicial después de la incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas. Esto puede explicarse por la alta concentración de la misma y por la elevada viscosidad pues como se observa en la Cuadro 6, esta solución se preparó a partir del extracto madre, con un muy bajo porcentaje del diluyente CMH, por lo que es una suspensión altamente lipídica, que impide el normal desarrollo del microrganismo.

En los alimentos se ha demostrado que se necesitan más cantidades de AE que la que se ha necesitado en experimentos previos in vitro, lo cual se explica por factores intrínsecos del propio alimento (grasa, proteína, agua, antioxidantes, conservantes, pH, sal y otros aditivos) y por factores extrínsecos, como la temperatura, pH, tipo de envasado y características del microorganismo. La matriz física de los alimentos también puede limitar la actividad antibacteriana de los AE. La extrapolación de los resultados de las pruebas *in vitro* a los alimentos es por lo tanto, difícil y siempre es más alto en los alimentos [36].

Figura 2. Curva de Letalidad del *Escherichia coli* frente al extracto de clavo y canela.



CONCLUSIONES

Los extractos de canela y clavo estudiados bajo la metodología de difusión en agar, no provocaron ningún efecto antimicrobiano sobre *Salmonella* spp, mientras que, en sus concentraciones más elevadas (100 y 150 mg/mL), si mostraron un efecto antimicrobiano sobre *E. coli* y *S. aureus*, clasificándose como sensibles. En la metodología de diluciones dobles en caldo, se determinó que para el *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213™ la CMI y la CMB fueron 512 μg/mL y 4096 μg/mL respectivamente y para *Escherichia coli* O157:H7 la CMI y la CMB fueron 2048 μg/mL y 4096 μg/mL.

REFERENCIAS

[1] MOMPIÉ, A., PASCUAL, Y.M., , CUNHA, L., DE LA PAZ-LORENTE, C. y AGUILAR, F. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19(4), 2015, p. 1-8.

[2] CERÓN-CARRILLO, T., MUNGUÍA-PÉREZ, R., GARCÍA, S. y SANTIESTEBAN-LÓPEZ, N.A. Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*capsicum*). Revista Iberoamericana de Ciencias, 1(1), 2014, p. 213-221.

[3] HERAS, I., ALVIS, A. y ARRAZOLA, G. Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). Información Tecnológica, 24 (5), 2013, p.93-102.

[4] ROSÁRIO-MARTINS, M., ARANTES, S., CANDEIAS, F., TINOCO, M.T. and CRUZ-MORAIS, J. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. Journal of ethnopharmacology, 151(1), 2014, p. 485-492.

[5] FADLI, M., CHEVALIER, J., HASSANI, L. and MEZRIOUI, N. Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. Letters in applied microbiology, 58(5), 2014, p. 472-477.

[6] AKTHAR, M., DEGAGA, B. and AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research, *2*(1), 2014, p. 1-7.

[7] ADEYINKA, A. and RICHARD, F. Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. International Journal of Biotechnology and Food Science, 3(3), 2015, p. 31-35.

[8] GRANADOS, C., YANEZ, X. y ACEVEDO, D. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia). Información Tecnológica, 25(3), 2014, p. 11-16.

[9] ZAPATA, K., CORTES, F.B. y ROJANO, B.A. Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidiumaraca*). Información Tecnológica, 24(5), 2013, p.103-112.

[10] ACEVEDO, D., NAVARRO, M. y MONROY, L. Composición química del aceite esencial de ho-

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (56-65) Enero _ Junio 2017

jas de Orégano (*Origanum vulgare*). Información Tecnológica, 24(4), 2013a, p. 43-48.

[11] ACEVEDO, D., NAVARRO, M. y MONRROY, L. Composición química del aceite esencial de las hojas de toronjil (*Melissa officinalis L.*). Información Tecnológica, 24(4), 2013b, p. 49-54.

[12] PINKAS, J.M. and KELLER, S. Spices In The Microbiological Safety of Low Water Activity Foods and Spices. New York (USA): Springer, 2014, p. 99-114.

[13] ARAUJO, P. Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos [Tesis de Maestría en Gestión y Seguridad Alimentaria]. Valencia (España): Universidad Politécnica de Valencia, 2011, 20 p.

[14] MATOS-CHAMORRO, R., QUISPE-CONDORI, S., QUITO-VIDAL, M.R., and BELTRAN-CÁRDENAS, S.K. Evaluación de la Capacidad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Orégano (*Origanum vulgare*) Microencapsuladas en β-ciclodextrina Aplicados en Cultivos Microbianos. Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1(1), 2015, p. 18-24.

[15] GUTIERREZ-LARRAINZAR, M., RUA, J., CARO, I., DE CASTRO, C., DE ARRIAGA, D., GARCÍA-ARMESTO, M. and DEL VALLE, P. Evaluation of antimicrobial activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogene and spoilage bacteria. Food Control, 26(2), 2012, p. 555-563.

[16] ORTEGA-RAMIREZ, L.A., RODRIGUEZ-GARCIA, I., LEYVA, J.M., CRUZ-VALENZUELA, M.R., SILVA-ESPINOZA, B., GONZALEZ-AGUILAR, G.A., SIDDIQUI, M. and AYALA-ZAVALA, J. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. Journal of food science, 79(2), 2014, p. R129-R137.

[17] HAUSER, C., PEÑALOZA, A., RODRÍGUEZ, F., GUARDA, A. and GALOTTO, M. Promising antimicrobial and antioxidant extracts of Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz): Shelf-life extension and food safety. Food Packaging and Shelf Life, 1(1), 2014, p. 77-85.

[18] AGAFONOVA, A., ALEKSANDROV, A., ALTINOK, O., AMBROSIO, M., ANOKHINA, A., AOKI, S., ARIGA, A., ARIGA, T., AUTIERO, D., BADERTSCHER A., BAGULYA, A., BENDHABI, A., BERTOLIN, A., BESNIER, M., BICK, D., BOYARKIN, V., BOZZA, C., BRUGIÈRE, T., BRUGNERA, R., BRUNET, F., BRUNETTI, G., BUONTEMPO, S., CAZES, A., CHAUSSARD, L., CHERNYAVSKY, M., CHIARELLA, V., CHON-SEN, N., CHUKANOV, A., CIESIELSKI, R., DAL CORSO, F., D'AMBROSIO, N., DECLAIS, Y., DEL AMO, P., DE LELLIS, G., DE SERIO, M., DI CAPUA, DI CRESCENZO, A. and DI FERDINANDO, A. Observation of a first candidate event in the OPERA experiment in the CNGS beam. Physics Letters B, 691(3), 2010, p.138-145.

[19] GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L., PULIDO, R.P. and BURGOS, M. Natural Antimicrobials for Food Biopreservation. In: Food Biopreservation. New York (USA): Springer, 2014, p. 3-14.

[20] BURT, R., VOLTARELLI, J., COURI, C., STRACIERI, A., OLIVEIRA, M., MORAES, D. y PIERONI, F. Autólogo no mieloablativo de células madre hematopoyéticas en el diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 1. Jama, 297(14), 2007, p. 1568-1576.

[21] PASTRANA, Y.I. Evaluación de sustancias antimicrobianas naturales en la conservación de bebidas autóctonas del Departamento de Córdoba [Tesis maestría Ciencias Agroalimentarias]. Montería (Córdoba): Facultad de Ingeniería, 87 p.

[22] HERNÁNDEZ-OCHOA, L., AGUIRRE-PRIETO, Y.B., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V., GUTIERREZ-MENDEZ, N. and SALAS-MUÑOZ, E. Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. Journal of food science and technology, 51(5), 2014, p. 957-963.

[23] GARCÍA-CARAMILLO, E., QUEZADA, J., MORENO, G., SÁNCHEZ, G., MORENO-MARTÍNEZ, E. y PÉREZ, M. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. Revista Mexicana de fitopatología, 24(1), 2006, p. 8-12.

[24] BOULAABA, M., SNOUSSI, M., SAADA, M., MKADMINI, K., SMAOUI, A., ABDELLY, C. and KSOURI, R. Antimicrobial activities and phytochemical analysis of Tamarix gallica extracts. Industrial Crops and Products, 76(1), 2015, p. 1114-1122.

[25] FERRIÑO, E., PEDROZA, G., SANDOVAL, N., MARTÍNEZ, E., MENDOZA, L. y BALDERAS, I. Ensayo Químico Dirigido y Estudio del Efecto Antimicrobiano in vitro de Algunos Condimentos Empleados en la Cocina Mexicana. Revista Salud Pública y Nutrición, 10, 2010, p. 23-25.

[26] ROMERO, J.A., SOGBE, E. y DÍAZ, C. Estudio serológico e histopatológico de la infección por Toxoplasma gondii en Cerdos del estado Aragua-Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, 48(2), 2011, p.85-95.

[27] SADO-KAMDEM, S., BELLETTI, N., TCHOUMBOUGNANG, F., ESSIA-NGANG, J.J., MONTANARI, C., TABANELLI, G., LANCIOTTI, R. and GARDINI, F. Effect of mild heat treatments on the antimicrobial activity of essential oils of Curcuma longa, *Xylopia aethiopica, Zanthoxylum xanthoxyloides and Zanthoxylum leprieurii* against *Salmonella enteritidis*. Journal of Essential Oil Research, 27(1), 2015, p. 52-60.

[28] SMITH-PALMER, A., STEWART, J. and FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in applied microbiology, 26(2), 1998, p. 118-122.

[29] HERNÁNDEZ, J., CUBILLOS-HINOJOSA, J. y MILIAN, P.E. Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología tropical, 2(2), 2012, p. 51-62.

[30] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23rd informational supplement (M100-S23). Wayne (USA): 2013.

[31] JASPERS, S., AERTS, M., VERBEKE, G. and BELOEIL, P.A. A new semi-parametric mixture model for interval censored data, with applications in the field of antimicrobial resistance. Computational Statistics & Data Analysis, 71(1), 2014, p. 30-42.

[32] SEOW, Y.X., YEO, C.R., CHUNG, H. L. and YUK, H. Plant essential oils as active antimicrobial agents. Critical reviews in food science and nutrition, 54(5), 2014, p. 625-644.

[33] LU, L.C., CHEN, Y.W. and CHOU, C.C. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis, 11(4), 2003, p. 277-282.

[33] RINCÓN-MEJÍA, C., CASTAÑO-OSORIO, J. y RÍOS-VÁZQUEZ, E. Actividad biológica de los aceites esenciales de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 17(2), 2012, p. 160-171.

[34] DELGADO, R. Empleo de la melaza de caña de azúcar como aditivo de galletas dulces. Ciencia y Tecnología de Alimentos, 20(2), 2010, p. 1-7.

[35] BINDUHEVA, U. and NEGI, P. Efficacy of cinnamon oil to prolong the shelf-life of pasteurised, acidified, and ambient stored papaya pulp. Acta Alimentaria, 43(3), 2014, p. 378-386.

[36] BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. International Journal of Food Microbiology, 94(3), 2004, p. 223–253.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)66-75
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (66-75) Enero _ Junio 2017

PROPIEDADES FÍSICO-MECÁNICAS DE LA MADERA DE URACO *(Ocotea brevipetiolata* van der Werff*)*, MUNICIPIO DE SIBUNDOY, PUTUMAYO

PHYSICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF WOOD URACO (*Ocotea brevipetiolata* van der Werff), MUNICIPALITY OF SIBUNDOY, PUTUMAYO

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE MADEIRA URACO (*Ocotea brevipetiolata* van der Werff), NO MUNICÍPIO DE SIBUNDOY, PUTUMAYO

JOSÉ FRANCO ALVIS-GORDO[1], LAURA DANIELA CABAS-GIRALDO[2], DIANA PAOLA VALENCIA-RAMOS[3]

RESUMEN

Se realizó la investigación de las propiedades físico-mecánicas de la madera de la especie Uraco (Ocotea brevipetiolata) en el municipio de Sibundoy, Putumayo, cuyo objetivo fue determinar su importancia a partir de su calidad y utilidad en la elaboración de diferentes productos. Se realizaron ensayos de propiedades físicas como densidad y contracción y de propiedades mecánicas como flexión, cizallamiento, compresión paralela y perpendicular a la fibra, considerando lo establecido por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas, los protocolos se ajustaron según las condiciones del estudio y los procedimientos incluyeron trabajos de campo, ensayos en laboratorio y procesamiento de la información. Los resultados obtenidos muestran que la especie Ocotea brevipetiolata presenta una densidad básica (0,54 g/cm³), considerada como una madera mediana a medianamente

Recibido para evaluación: 4 de Agosto de 2015. **Aprobado para publicación:** 25 de Enero de 2017.

1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación TULL. M.Sc. Profesor titular. Popayán, Colombia.
2 Decorplantas forestal. Ingeniera forestal. Popayán, Colombia.
3 Corpoamazonia. Ingeniera forestal. Mocoa, Colombia.

Correspondencia: falvis@unicauca.edu.co.

pesada clasificada dentro del grupo estructural "C" de acuerdo con la clasificación de la Junta del acuerdo de Cartagena; así mismo, se clasifica con estabilidad dimensional muy alta. Las propiedades mecánicas según la clasificación de las normas americanas ASTM, muestran que la madera presenta una resistencia media a la flexión, cizallamiento y a la resistencia a compresión paralela y perpendicular a las fibras; indicando que esta madera puede llegar a soportar cargas moderadas.

ABSTRACT

A research on the physical – mechanical wood properties of the Uraco species (Ocotea brevipetiolata) was carried out in the Sibundoy municipality, Putumayo department, whose objective was to determine its importance from its quality and usefulness in the production of different products. Trials on physical properties such as density and shrinking, and mechanical properties such as flexion, shearing, parallel and perpendicular to the fiber compression were performed, taking into account the standards established by Instituto Colombiano de Normas Técnicas; protocols were adjusted according to the trial conditions and methodology included field works, lab assays and information processing. The obtained results show that Ocotea brevipetiolata has a basic density of 0,538 g/cm³, which can be considered as a median to slightly heavy wood, ranking it into the structural group 'C', according to the Junta del Acuerdo de Cartagena; classification; likewise, it is ranked with a very high dimensional stability. According to the American Standards ASTM, mechanical properties show that this wood has medium strength for flexion, shearing and parallel and perpendicular to the fiber compression, indicating that this wood can withstand moderate loads.

PALABRAS CLAVE:
Densidad, Contracción, Resistencia, Esfuerzo.

KEYWORDS:
Density, Contraction, Resistance, Effort.

PALAVRAS-CHAVE:
Densidade, Contração, Resistência, Esforço.

RESUMO

Realizou-se a investigação das propriedades físicas e mecânicas da madeira das espécies Uraco (Ocotea brevipetiolata) no município de Sibundoy, Putumayo, cujo objetivo era determinar sua importância desde a sua qualidade e utilidade na elaboração de produtos diferentes. Foram feitos vários ensaios em relação à densidade física e propriedades de encolhimento e propriedades mecânicas, tais como flexão, cisalhamento, paralelo de compressão e perpendicular à fibra, enquanto ao estabelecido pelo Instituto Colombiano de Normas Técnicas; os protocolos foram ajustados de acordo com as condições do estudo e os procedimentos incluíram trabalhos de campo, testes em laboratório e processamento de informações. Os resultados mostram que a espécie Ocotea brevipetiolata apresenta uma densidade básica (0,538 g/cm³), considerada como um meio e madeira levemente pesada, classificadas dentro do grupo estrutural "C", em conformidade com a classificação do Comitê do acordo de Cartagena; Da mesma forma, é classificada com muito alta estabilidade dimensional. As propriedades mecânicas, de acordo com a classificação das normas ASTM americanas, mostram que a madeira apresenta uma resistência média de flexão, cisalhamento e a resistência à compressão paralela e perpendicular às fibras; indicando que esta madeira pode suportar cargas moderadas.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (66-75) Enero _ Junio 2017

INTRODUCCIÓN

Colombia posee grandes áreas con bosques naturales, en los cuales se encuentran valiosas especies vegetales. Dentro de estas áreas boscosas, las más aprovechadas son aquellas de mayor valor comercial, sin embargo, existen grupos taxonómicos con un gran número de especies no menos importantes, tal es el caso de la especie *Ocotea brevipetiolata* van der Werff, comúnmente llamado Uraco por los habitantes del municipio de Sibundoy en el departamento del Putumayo, lugar en donde se desarrolló el presente estudio.

Ocotea brevipetiolata es una especie a la que se le conoce muy poco los aspectos fisiológicos, taxonómicos, fenológicos y especialmente sus propiedades físicas y/o mecánicas. El conocimiento de los bosques de Uraco a nivel nacional es muy escaso, su uso se limita a la elaboración de muebles y estructuras de construcción, por lo que la determinación de las propiedades físicas y mecánicas, permitió contar con información adecuada y cuantificable sobre especie. El presente estudio permitió conocer la calidad de la madera de esta especie, con el fin de determinar la mejor utilización en la elaboración de diferentes productos, lo que podrá llevar a un desarrollo en su industrialización y a un aumento en su valor agregado.

Este estudio es un documento técnico y científico que muestra los resultados del estudio de las propiedades físico-mecánicas de la especie *Ocotea brevipetiolata*, en la región andino-amazónica del municipio de Sibundoy Putumayo. Las pruebas físicas realizadas fueron: densidades, contracciones (radial, tangencial, longitudinal y volumétrica) en los estados: verde, seca al aire y seca al horno (anhidra) y densidad básica (DB), la cual se define como el cociente entre la masa en estado anhidro (madera seca al horno) y el volumen de la madera en estado verde (vv). Las pruebas mecánicas realizadas fueron: flexión estática, compresión paralela, compresión perpendicular y cizallamiento; teniendo como referencia la norma NSR-10 de 2010 [1].

El objetivo del estudio fue conocer algunas de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de la especie Uraco (*Ocotea brevipetiolata*), en los bosques naturales localizados en el municipio de Sibundoy, Putumayo. Los resultados obtenidos permitirán determinar algunos de los posibles usos de la especie estudiada, representando para los usuarios del bosque natural, un mayor conocimiento de la especie para su utilización racional.

MÉTODO

Descripción general de la especie

Ocotea brevipetiolata es una especie forestal de alturas que superan los 28 metros, y diámetro normal mayor a 25 centímetros, presenta un fuste cilíndrico liso, con una copa extensa bastante ramificada, la corteza externa lisa sin presencia de exudado, sus hojas son alternas a opuestas o aparentemente verticiladas, simples, enteras, a menudo coriáceas, el haz verde brillante y el envés glauco. Presenta una madera medianamente pesada, la albura es de color amarillo claro, el duramen es de color café generalmente, aunque en algunas ocasiones no se torne muy distinguible [2].

Recolección de las muestras botánicas para estudio

Se seleccionaron 3 árboles de la especie objeto estudio, los cuales fueron seleccionados con DAP entre 77 y 80 cm y entre 15 y 16 m de altura.

La determinación botánica de las plantas se realizó por medio del estudio de los órganos reproductores. Para esta identificación, la muestra botánica de un individuo arbóreo debe constar de hojas, flores y frutos, si estos elementos se encuentran en el momento de colectar la muestra; si no se presentan los tres órganos en la muestra, se debe colectar muestras que tengan hojas y flores u hojas y frutos [3].

La recolección de las muestras se realizó siguiendo la metodología propuesta por Gutiérrez (1974) [4]. Dichas muestras colectadas carecían de flores y contaban con pocos frutos en el momento de la colecta. Con el fin de lograr su correcta identificación, las muestras fueron preparadas y secadas, utilizando planchas artesanales elaboradas con madera y papel periódico, útiles para este propósito por su facilidad de construcción y fácil manejo dentro y fuera del bosque. La especie se encuentra registrada en algunos de los herbarios más prestigiosos del mundo.

Una vez apeados los árboles se realizó el dimensionamiento de los mismos marcando los puntos cardinales en la sección transversal del fuste del árbol, con el fin de conocer la orientación de extracción del bloque. Se obtuvieron un total de 25 bloques De cada troza se obtuvo de 3 a 5 bloques, con dimensiones de 14 cm de espesor, 14 cm de ancho, y 2,8 m de longitud en promedio. El material obtenido fue transportado hasta

las instalaciones del aserradero ubicado en el Municipio de Sibundoy (Putumayo), donde se prepararon y procesaron las probetas.

Preparación del material a ensayar

La preparación del material a ensayar (probetas), se realizó con la colaboración de la empresa Maderas García S.A, localizada en el casco urbano del municipio de Sibundoy, en la cual se realizaron las actividades que se describen a continuación y que permitieron obtener y acondicionar de manera adecuada los listones para las diferentes pruebas realizadas.

Elaboración de listones. Se realizó un corte transversal en un extremo de cada tablón para observar los anillos de crecimiento y así, tener un referente para que los planos tangencial y radial de la madera quedaran bien orientados en los listones después del dimensionamiento en una sierra sinfín.

Acondicionamiento de los listones. Los listones fueron secados al aire bajo cobertizo en un lugar aireado, para evitar la incidencia directa del sol, para lo cual se empleó el sistema de apilado en caballete, por un tiempo de 30 días.

Dimensionamiento de probetas

Se dimensionaron 6 probetas para cada ensayo de todo el fuste del árbol, a partir de la selección de 6 listones en las mejores condiciones (libre de grietas, buena condición de sanidad) seleccionándose 25 probetas para cada ensayo físico y mecánico.

Elaboración de probetas. Las probetas se elaboraron de acuerdo a las dimensiones propuestas en la Norma Técnica Colombiana (NTC 301 y NTC 3377) y las normas DIN (Deustcher Industrie Normen), para cada tipo de ensayo físico y mecánico de la madera. Las probetas se elaboraron a partir del duramen de cada listón, libre de defectos, con una orientación de las fibras paralela al eje longitudinal y sus anillos de crecimiento orientados paralelamente a una de las caras de las probetas, de acuerdo a los requisitos establecidos.

Determinación de las propiedades físicas.

Densidad. La densidad indica la cantidad de sustancia celular presente en una unidad de volumen de madera. Es por esto que especies con madera densa tienen resistencias altas y maderas livianas resisten menos que las anteriores [5]. A cada probeta se le midió su longitud, sus dimensiones, el volumen y luego fueron pesadas en la balanza de precisión, con estos valores se determinó primero la densidad seca al aire, seguidamente las probetas fueron introducidas en agua por un tiempo de 4 días para obtener la condición verde; transcurrido este tiempo, se determinó volumen y peso nuevamente para calcular la densidad verde; obtenida la condición verde se colocaron las probetas en el horno a una temperatura de 102 $\pm$ 3ºC hasta lograr un peso constante, posteriormente se midieron el volumen y el peso y se obtuvo la densidad seca al horno. Para esta propiedad se tuvo en cuenta lo establecido en la norma NTC 290, Tecnología de la madera.

Contracción de la madera. La contracción es la disminución del volumen de la madera ocasionada por la remoción de la humedad por debajo del PSF [6]. Para el presente estudio se determinaron las contracciones: radial, tangencial, longitudinal y volumétrica, de condición verde a condición seca al aire (normal), de condición seca al aire a condición anhidra (parcial) y de condición verde a condición anhidra (total), siguiendo los protocolos de la NTC 701.

Determinación de las propiedades mecánicas

Flexión estática. Los esfuerzos en flexión se producen en cuerpos de gran longitud respecto a las dimensiones de su sección transversal, cuando estos son sometidos a la acción de cargas transversales o normales de su eje longitudinal, de tal manera que tiendan a producir una arqueadura del elemento. Un caso típico es el de la viga [7]. A cada probeta se le midió sus dimensiones y peso; luego se realizó el ensayo conforme al método establecido en la NTC 663. Con los datos obtenidos en este ensayo se calculó: Esfuerzo de las fibras al límite proporcional, Módulo de ruptura y Módulo de elasticidad, utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3.

$$E.F.L.P. = \frac{3\ x\ Pp\ x\ L}{2\ \mathrm{x}\ a\ x\ h2} \qquad \text{(Ec.1)}$$

$$M.R. = \frac{3\ x\ PM\ x\ L}{2\ \mathrm{x}\ a\ x\ h2} \qquad \text{(Ec.2)}$$

$$M.E. = \frac{Pp\ x\ L3}{4\ x\ d\ x\ a\ x\ h3} \qquad \text{(Ec.3)}$$

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (66-75) Enero _ Junio 2017

Donde:

E.F.L.P. = Esfuerzo de las fibras la limite proporcional (kg/cm^2).

M.R. = Módulo de ruptura

M.E. = Módulo de elasticidad

Pp = Carga la límite proporcional (Kg)

L = Distancia entre soportes (Cm)

h = Espesor de la probeta (Cm)

PM = Carga máxima

a = Ancho de la probeta (Cm)

d = Deformación al límite proporcional (Cm)

Resistencia a la compresión. Se distinguen dos tipos de fuerzas de compresión según el sentido de aplicación de la fuerza; compresión paralela y compresión perpendicular a la fibra [8].

Compresión paralela a las fibras. A cada probeta se le midieron sus dimensiones y peso; luego se procedió a la realización del ensayo en la maquina universal conforme a la NTC 784 [9]. Con los datos obtenidos en este ensayo se calculó el esfuerzo de las fibras al límite proporcional, el Módulo de elasticidad y la Máxima resistencia a la compresión, utilizando las ecuaciones 4, 5 y 6.

$$E.F.L.P. = \frac{Pp}{\mathrm{A}} \quad \text{(Ec.4)}$$

$$Max.R. = \frac{Pm}{\mathrm{A}} \quad \text{(Ec.5)}$$

$$M.E. = \frac{Pp\ x\ L}{A\ x\ d} \quad \text{(Ec.6)}$$

Donde

Max.R = Máxima resistencia a la compresión (kg/cm2).

Pm = Carga máxima (Kg)

A = Área sección trasversal de la probeta antes del ensayo (Cm^2).

d = Deflexión al límite proporcional

Compresión perpendicular a las fibras. A cada probeta se le midieron sus dimensiones y peso; luego se procedió a la realización del ensayo en la maquina universal conforme a la NTC 785. Con los datos obtenidos se calculó el esfuerzo al límite proporcional a las fibras, a través de la ecuación 7.

$$E.F.L.P. = \frac{Pp}{\mathrm{A}} \quad \text{(Ec.7)}$$

Resistencia al cizallamiento. El esfuerzo de cizallamiento es una medida de la capacidad de la madera para resistir fuerzas que tienden a producir deslizamientos de un plano interno de la madera sobre su plano adyacente. Los esfuerzos de cizallamiento tienen lugar, en mayor o menor grado, en casi todos los usos de la madera, y se clasifican de acuerdo a la dirección en que la fuerza actúa respecto a los planos estructurales de la madera [10].

Corte paralelo al grano (Cizallamiento). Las probetas fueron medidas y pesadas, posteriormente el ensayo se realizó conforme a lo establecido en el reglamento colombiano de construcción sismoresistente NSR-10 y utilizando el método sugerido por la norma NTC 775, utilizando la ecuación 4.

$$FR = 0{,}58 - 0{,}58\ Db \quad \text{(Ec.8)}$$

Donde:

FR = Factor de resistencia.

Db = Densidad básica.

Cm^2.

Se ensayaron 3 probetas en el plano de falla tangencial y 3 en el plano falla radial de todo el fuste del árbol.

Esfuerzos básicos y de trabajo

Esfuerzo básico. Se conoce como esfuerzo básico la capacidad de la madera ideal, libre de defectos, de soportar elásticamente una carga en forma segura y

permanente, bajo condiciones normales de uso. Este esfuerzo se obtiene dividiendo el valor mínimo probable por un factor que normaliza la duración de la carga a 10 años e incluye un factor de seguridad.

Esfuerzos de trabajo. El esfuerzo de trabajo es la capacidad de elementos estructurales de madera de soporta cargas en forma elástica y permanente bajo condiciones normales de uso. El esfuerzo de trabajo se obtiene a partir del esfuerzo básico, aplicando un factor de resistencia para considerar al efecto de los defectos permitidos en una calidad de madera dada. Con los datos obtenidos de cada uno de los ensayos realizados se procedió a determinar el esfuerzo básico. Para la obtención de las fatigas básicas existen diferentes métodos según las normas de cada país. Para este ensayo se tomó como referencia la norma ASTM D245-74 y el método propuesto por Centeno [11].

Método según la norma ASTM D245-74. Este método determinó los esfuerzos y fatigas básicas de cada propiedad resistente, tomando como probabilidad razonable la de obtener 5 veces en 100 un valor menor al valor de resistencia mínimo obtenido y aplicando a este valor mínimo un factor que varía entre 1,5 y 5 según sea la propiedad [12].

Método propuesto por CENTENO**.** El esfuerzo básico se obtuvo dividiendo el valor mínimo probable por un factor que normaliza la duración de la carga a 10 años e incluye un factor de seguridad. Para cada propiedad Centeno establece los factores que se describen en el cuadro 1.

Para determinar los esfuerzos de trabajo se tomó como referencia los factores de resistencia propuestos por Centeno, y por la Junta del Acuerdo de Cartagena.

Esfuerzos de trabajo aplicando el factor de resistencia propuesto por Centeno. Los resultados experimentales obtenidos por Centeno, indican que para madera estructural el factor de resistencia está dado por los siguientes factores:

Cuadro 1. Factores de seguridad para esfuerzos básicos por el método de Centeno.

Propiedad	Factor de seguridad
Flexión	Valor mín. módulo ruptura = 2,1
Compresión paralela	Valor mín. resistencia máx. = 2,1
Compresión perpendicular	Valor mín. limite proporcional = 1,5
Cizallamiento	Valor mín resistencia máx. = 3,5

FR= factor de resistencia

Db= densidad básica

Esfuerzos de trabajo aplicando el factor de resistencia propuesto por la JUNAC (2000) el cual establece que los esfuerzos de trabajo o esfuerzos admisibles, se obtienen modificando las tensiones básicas mediante la siguiente fórmula:

$$F = \frac{FC}{FS\ x\ F.D.C}\ x\ TB \qquad \text{(Ec.9)}$$

Donde:

F= Esfuerzo admisible *FC*

$F.C$= Factor de reducción por tamaño

$F.S$= Factor de servicio de seguridad

$F.D.C$= Factor de duración de carga

TB= Tensión básica.

Cuadro 2. Factores de reducción según propiedad.

Propiedad	Factores
Flexión	Factor de reducción por tamaño F.C = 0,80 Factor de seguridad F.S = 2,00; Factor de duración de carga F.D.C = 1,15
Compresión paralela	Factor de seguridad F.S = 1,60 Factor de duración de carga F.D.C = 1,25
Compresión perpendicular	Factor de seguridad F.S = 1,60
Cizallamiento	Factor de seguridad F.S = 4,00

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (66-75) Enero _ Junio 2017

RESULTADOS

Propiedades físicas

Densidad. De acuerdo con los resultados obtenidos, la madera de la especie *O. brevipetiolata* presenta una densidad básica de 0,54 g/cm^3, de acuerdo con lo establecido en el reglamento colombiano de construcción sismoresistente – NSR-10. La densidad verde es 0,73 g/cm^3; presenta también una densidad seca al aire de 0,68 g/cm^3; según la norma ASTM es clasificada como mediana y una densidad anhidra de 0,59 g/cm^3; lo que indica que la madera es medianamente pesada según las normas DIN.

Los resultados obtenidos muestran que la madera de *Ocotea brevipetiolata* presenta densidad entre 0,40 g/cm^3 y 0,72 g/cm^3. Estos resultados, sumados a posteriores estudios sobre durabilidad de la madera, podrían indicar su posible utilización en climas tropicales, siendo necesario que se puedan adelantar dichos estudios de durabilidad natural de la madera de esta especie. La madera de *Ocotea* brevipetiolata pertenece a las denominadas de utilidad general, pues pueden ser usadas como madera de carpintería, mueblería, decorativas y otros. En el cuadro 3 se presenta los resultados obtenidos de las propiedades físicas de la madera.

Cuadro 3. Propiedades físicas de la madera de Uraco

Ensayo	Valores		
Densidad (g/cm^3)			
Verde	0,730		
Seca al aire	0,684		
Anhidra	0,588		
Básica	0,538		
Contracción	Normal verde a seca al aire (%)	Normal verde a seca al aire (%)	Normal verde a seca al aire (%)
Longitudinal	0,23	0,22	0,31
Radial	2,84	3,43	6,19
Tangencial	3,33	3,40	6,62
Volumétrica	6,32	6,85	13,17
Relación T/R	1,31	1,03	1,07

Contracción. Las contracciones longitudinales normal, parcial y total promedio fueron: 0,23%, 0,22 y 0,31 respectivamente. Las contracciones radiales normal, parcial y total promedio fueron: 2,84%, 3,43 y 6,19 respectivamente y las contracciones tangenciales normal, parcial y total promedio fueron: 3,33%, 3,40 y 6,62 respectivamente. Al comparar las contracciones con la especie *Ocotea costulata* Mez de acuerdo con los estudios realizados por Aróstegui y Sato en el año 2013, los resultados son un poco superiores con 3,8% en el plano radial normal y 7,0 en el plano tangencial. En el radial total y en el plano tangencial normal son similares

Contracción volumétrica. Los valores obtenidos para la contracción volumétrica parcial son de 6,8% y total de 13,17%; según las normas DIN se clasifican como moderada. De acuerdo a la norma ASTM la contracción total se clasifica como mediana. Teniendo en cuenta esta última norma, la contracción volumétrica total es menor, comparada con otras especies de la misma familia.

Estabilidad dimensional. Las relaciones contracción tangencial y radial muestran resultados menores a 1,5, indicando según la norma DIN que la madera es muy estable. Por otro lado al compararla con resultados obtenidos para estudios de otras especies de la misma familia, se observa un mejor comportamiento de la especie en estudio, dando como resultado una mejor estabilidad dimensional para *Ocotea brevipetiolata*.

Propiedades mecánicas

En el Cuadro 4, se presenta la clasificación de las propiedades mecánicas de la especie *Ocotea brevipetiolata* según la norma ASTM y DIN, considerando el valor promedio general de la especie para cada ensayo, ajustados a un contenido de humedad del 12%.

En general las propiedades mecánicas de la especie *Ocotea brevipetiolata* permiten un comportamiento aceptable, presentando una resistencia mediana a las cargas mecánicas como lo son: flexión estática, compresión tanto paralela como perpendicular y cizallamiento, sobresaliendo entre estas el módulo de elasticidad en la flexión estática. Es importante resaltar que esta madera puede ser usada en estructuras que no requieran soportar grandes cargas o grandes esfuerzos, además en marcos de puertas, ventanas, forros para cielo rasos, paredes; molduras, barandas de escaleras, pisos entre otros.

Cuadro 4. Propiedades mecánicas de la especie

Ensayo	Yi	Clasificación	
		ASTM	DIN
Flexión estática (kg/cm²)			
Esfuerzo de las fibras al límite proporcional (E.F.L.P	626	Mediano	
Módulo de ruptura (M.R)	990	Mediano	Bajo
(Módulo de elasticidad M.E)	164539	Alto	
Compresión paralela (kg/cm²)			
Esfuerzo de las fibras al límite proporcional (E.F.L.P)	325	Mediano	
Módulo de ruptura (M.R)	574	Mediano	Mediano
(Módulo de elasticidad M.E)	250432		
Compresión perpendicular (kg/cm²)			
Esfuerzo de las fibras al límite proporcional (E.F.L.P	81	Mediano	Mediano
Cizallamiento (kg/cm²)			
Esfuerzo de las fibras al límite proporcional (E.F.L.P	90	Mediano	Mediano

Usos. Los resultados obtenidos muestran que la madera *Ocotea brevipetiolata* posee gran belleza natural. Así mismo, los usos posibles de la madera es en la construcción de viviendas, muebles (línea del hogar), ebanistería, obras de tallar, machihembrado, puertas, ventanas, marcos, molduras, estantes, instrumentos musicales, forros para cielo rasos y paredes, molduras de barandas y pasamanos, tapamarcos, cabos para herramienta, zócalos y contrazócalos entre otros.

Esfuerzos básicos y de trabajo

De acuerdo con los resultados del análisis de los esfuerzos básicos y de trabajo da como resultado que la madera de la especie *Ocotea brevipetiolata* presenta un buen comportamiento para el uso en vigas, viguetas, cerchas. Sin embargo, no es recomendable la utilización de dicha madera para columnas.

Resultados del esfuerzo básico de acuerdo a la norma ASTM D245-74, al método propuesto por Centeno y los resultados del esfuerzo de trabajo haciendo referencia a los factores de resistencia propuestas por centeno y por la Junta del Acuerdo de Cartagena (JUNAC), cada uno de estos métodos determinados para las 4 propiedades estudiadas [10]. Los resultados del esfuerzo básico y de trabajo se presentan en el cuadro 5.

Los valores de las propiedades físicas y mecánicas a los diferentes esfuerzos han sido interpretados de acuerdo a las especificaciones establecidas por Junta del Acuerdo de Cartagena JUNAC, las Normas ASTM y DIN respectivamente.

De acuerdo con los resultados de las propiedades físicas, la madera de *Ocotea brevipetiolata* posee una densidad básica media, clasificada por la JUNAC como madera medianamente pesada, poco durable y utilizada para uso generales. Resultados similares en cuanto a la densidad básica y contracción se obtuvieron en estudios realizados por Aróstegui y Sato en el año 2013 para la especie Ocotea costulata Menz, perteneciente a la misma familia LAURACEAE.

En cuanto a las propiedades mecánicas de la especie *O. brevipetiolata*, los resultados de los ensayos o pruebas de flexión estática, compresión paralela, compresión perpendicular y cizallamiento, se clasifican de mediano a bajo de acuerdo a las normas ASTM y DIN.

Cuadro 5. Esfuerzo básico y de trabajo.

Propiedad	Esfuerzo básico		Esfuerzo de trabajo	
	ASTM	Centeno	JUNAC	
			Esfue	Grp
Flexión	144	258	196	A
Compresión paralela	201	177	117	B
Compresión perpendicul	52	42	32	B
Cizallamiento	10	11	14	A

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (66-75) Enero _ Junio 2017

Los resultados de las propiedades mecánicas obtenidos deberán ser complementados con la información del estudio de las propiedades físicas, comportamiento al secado, a la trabajabilidad, a la preservación y durabilidades naturales y utilizadas, para determinar la aptitud de uso de la madera.

La realización de gran número de ensayos permite determinar con exactitud las propiedades de la madera y, al mismo tiempo, conocer el comportamiento de la variabilidad. Desde un punto de vista tecnológico esto permite conocer mejor las propiedades de la madera y diseñar procesos productivos para obtener productos de calidad homogénea.

CONCLUSIONES

Según su densidad, la madera de *Ocotea brevipetiolata,* es clasificada como mediana a medianamente pesada y su utilidad general puede ser como madera de carpintería, mueblería, elementos decorativos entre otros.

Los resultados de las contracciones muestran que la madera presenta una estabilidad dimensional alta, característica indispensable para la fabricación de mueblería fina, correspondiendo a una madera de gran calidad.

La propiedades mecánicas pertenecientes a la especie *O. brevipetiolata* corresponde a una madera con resistencia media a la flexión, cizallamiento y a la resistencia a compresión paralela y perpendicular; indicando que esta madera puede llegar a soportar cargas moderadas.

Según la densidad básica la madera es considerada por la JUNAC en el grupo estructural “C”; según los esfuerzos admisibles a la flexión y cizallamiento pertenecen al grupo estructural “A” y según la compresión paralela y perpendicular se ubica en el grupo “B”; lo que indica que la resistencia a la flexión y cizallamiento es mejor que la resistencia a la compresión, por lo anterior se podría inferir que la madera presenta un usos potencial para vigas y no para columnas.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se realizó con el apoyo de la Alcaldía municipal de Sibundoy, Departamento del Putumayo y la valiosa colaboración del laboratorio de materiales de la Facultad de Ingeniería Civil de la Universidad del Cauca.

REFERENCIAS

[1] COLOMBIA. MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. Asociación colombiana de Ingeniería Sísmica. Reglamento colombiano de construcción sismo resistente NSR-10. Título G – Estructuras de madera y estructuras de Guadua. Bogotá (Colombia): 2010, 158 p.

[2] REYES, E., MOLINA, M., VALERO, S., MOLINA, Y. y BETANCOURT, J. Propiedades físicas de la madera de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, resinado y no resinado de las plantaciones de Uverito (Monagas, Venezuela). Revista Forestal Venezolana, 56(1), 2012, p 21-28.

[3] AMBROZ, D. Guía de identificación de plantas nativas. Illinois (USA): Departamento de Recursos Naturales, Programa de Gestión Costera, Roots Neighborhood Habitat, 2014, 37 p.

[4] GUTIERREZ, G. Manual práctico de botánica taxonómica. Medellin (Colombia): Universidad Nacional Sede Medellín, Facultad de Ciencias Biológicas Agrícolas 1974.

[5] HENRY, C.P., GARCÍA, M., BERRIOS M. y SOLANO, A. Estudio de las propiedades físicas y mecánicas de la madera de la especie *Khaya nyasica* stapf en tres edades de plantación. Revista Forestal Baracoa, 31(2), 2012, p. 83-89.

[6] MINISTERIO DE AGRICULTURA DE PERÚ. Estudio de las propiedades mecánicas de diez especies maderables potenciales de bosques secundarios y primarios residuales. Lima (Perú): Dirección General de Bosques y Fauna Silvestre – Organización Internacional de Maderas Tropicales (OIMT), 2013, 51 p.

[7] BARRETO J. Estudio de propiedades físico mecánicas (corte y flexión) de la especie de madera tropical Teca (*Tectona grandis*) en el sistema de laminado pegado estructural [Tesis de Maestría en construcción]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Artes, 2013, 194 p.

[8] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS (ICONTEC). NTC Maderas. Determinación de la resistencia a la compresión axial o paralela al grano, resistencia a la compresión perpendicular al grano y resistencia al cizallamiento paralelo al grano. Bogotá (Colombia): 1974, 5 p.

[9] ARDILA, C. Determinación de los valores de esfuerzos admisibles del bambú *Guadua angustifolia* Kunth del departamento de Tolima [Tesis de Maestría en construcción]. Bogotá (Colombia):

Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Artes, 2013, 106 p.
[10] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS (ICONTEC): NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 290. Maderas. Determinación del peso específico aparente. Bogotá (Colombia): 1974.
[11] LONDOÑO, A. Introducción a la ingeniería de la madera. Ibagué (Colombia): Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Forestal, 2002.
[12] COLOMBIA. JUNTA DEL ACUERDO DE CARTAGENA. Las propiedades mecánicas según la clasificación de las normas de la Sociedad Americana para Ensayos de Materiales (ASTM). Lima (Perú): 2000, 591 p.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)76-84
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (76-84) Enero _ Junio 2017

ANALYTICAL APPROACH OF THE VOLATILE FRACTION OF *Solanum quitoense* BY HS-SPME/GC-MS

APROXIMACIÓN ANALÍTICA DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE *Solanum quitoense* POR HS-SPME/GC-MS

ABORDAGEM ANALÍTICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *Solanum quitoense* PELA HS-SPME/GC-MS

EDUARDO CORPAS-IGUARÁN[1*], GONZALO TABORDA-OCAMPO[2], OMAR TAPASCO-ALZATE[3]

ABSTRACT

The species of lulo fruit (Solanum quitoense), predominant in Colombia, is a promising fruit for both national and international market due to its flavor and nutritional characteristics, which generated the interest to know the volatile composition of its pulp. After adjusting, the chromatographic conditions necessary to analyze volatile fraction of this fruit, the effect of the temperature and time of adsorption was measured through the headspace - solid phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS), on the area of volatile compounds of S. quitoense, by applying the experimental design of a factor. The descriptive analysis suggested that the adsorption at 60°C and 30 minutes promoted optimal recovery of volatiles as well as internal standard (1-Octanol, with recovery of 99,66% at 60ºC), while the non-parametric test Kruskal-Wallis showed statistical differences in the effect of time (P= 0,018), but not of the temperature adsorption (P= 0,058) upon the volatiles compounds area. A predominance of esters (48,98%), aldehydes (18,37%), and alcohols (14,29%) was observed and

Recibido para evaluación: 28 de Marzo de 2016. **Aprobado para publicación:** 10 de Enero de 2017.

1 Universidad Católica de Manizales, Instituto Investigación en Microbiología y Biotecnología Industrial IMBA, Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico para el Sector Agroindustrial y Agroalimentario INDETSA. Ph.D en Ciencias Agrarias. Manizales, Colombia.

2 Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines GICTA. Ph.D. en Ciencias Químicas. Manizales, Colombia.

3 Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Grupo de investigación en Estadística y Matemáticas. Mgr. en Enseñanza de la Matemática línea de Estadística. Manizales, Colombia.

Correspondencia: ecorpas@ucm.edu.co; eduardocorpas@hotmail.com

also were found compounds of greatest area such as 3-hexen-1-ol acetate, acetic acid methyl ester, and acetic acid hexyl ester. These metabolites determine the characteristic aroma from lulo pulp and influence the consumer preference.

RESUMEN

La especie de lulo (Solanum quitoense), predominante en Colombia, es una fruta promisoria para el mercado nacional e internacional debido a su aroma y características nutricionales, lo cual generó el interés por conocer la composición volátil de su pulpa. Después de ajustar las condiciones cromatográficas necesarias para analizar los compuestos volátiles de esta fruta, se midió el efecto de la temperatura y tiempo de adsorción a través de la microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME), sobre el área de los volátiles, aplicando un diseño experimental de un factor. El análisis descriptivo sugirió que la adsorción a 60°C y 30 minutos promovía una recuperación óptima de volátiles así como del estándar interno (1-Octanol, con recuperación del 99,66%), mientras la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró diferencias estadísticas en el efecto del tiempo (P= 0,018), pero no de la temperatura de adsorción (P= 0,058), sobre el área de los compuestos volátiles. Además, se observó un predominio de ésteres (48,98%), aldehídos (18,37%) y alcoholes (14,29%) y se encontraron compuestos con áreas superiores como acetato de 3-hexen-1-ol, acetato de metilo y acetato de hexilo. Estos metabolitos determinan el aroma característico del lulo e influencian la predilección por el consumidor.

RESUMO

A espécie de lulo (Solanum quitoense), predominante em Colômbia, é uma fruta pertinente para o mercado nacional e internacional devido ao seu aroma e nutricionais características, o que gerou o interesse em conhecer a composição volátil da sua polpa. Depois de ajustar as condições cromatográficas necessárias para analisar os voláteis desta fruta, o efeito da temperatura e do tempo de adsorção foi medido pela microextração em fase sólida, por espaço de cabeça (HS-SPME), na área voláteis, aplicando um desenho de um fator. A análise descritiva sugere que a adsorção para 60°C e 30 minutos promoveu uma ótima recuperação de voláteis assim como do padrão interno (1-Octanol, com recuperação de 99,66%), enquanto que o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis mostrou diferenças estatísticas no efeito do tempo (P= 0,018), mas não da temperatura de adsorção (P= 0,058), sobre a área dos voláteis. Além disso, observou-se uma predominância de ésteres (48,98%), aldeídos (18,37%) e álcoois (14,29%) e foram encontrados compostos com áreas superiores como acetato de 3-hexen-1-ol, acetato de metilo e acetato de hexilo. Estes metabolitos determinam o aroma característico do lulo e influenciam a preferência pelo consumidor.

KEYWORDS:
Chemical analysis, Chromatographic conditions, Lulo, Volatile organic compounds, Solid phase microextraction.

PALABRAS CLAVE:
Análisis químico, Compuestos orgánicos volátiles, Condiciones cromatográficas, Lulo, Microextracción en fase sólida.

PALAVRAS-CHAVE:
Análise Química, Compostos Orgânicos Voláteis, Condições cromatográficas, Lulo, Microextração em fase sólida.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (76-84) Enero _ Junio 2017

INTRODUCTION

During its maturation, fruits undergo biochemical, physiological and structural alterations, which include the production of volatile compounds [1], which are responsible of its aroma [2,3], and consequently on its quality and the preference by consumers [4,5,6]. Among the species of lulo, *S. quitoense* Lam., native from South America [7], is the species cultivated and consumed in Colombia due to its pleasant aroma and nutritional characteristics [8,9,10], conditions that have aroused the interest in taking advantage of its productive potential in industrial processing [11,12]. For the analysis of volatile compounds in fruit pulp by solid phase microextraction (SPME) different conditions of time and temperature absorption have been used. In fruits where have been used temperatures of 25°C or lower, such as Mobola plum (*Parinari curatellifolia*) [13] and monkey orange (*Strychnos cocculoides*) [14], times were predominantly greater than 30 minutes; whereas in fruits like pear (*Pyrus ussuriensis*) [15], the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) [16], melon (*Cucumis melo* L.) [17], avocado (*Persea americana* Mill., cv. Hass) [18], among others, where the temperatures used were equal to or higher than 40°C, times were predominantly equal or lower than 30 minutes.

In order to obtain higher performance in the extraction of SPME fiber, in some studies it was considered to optimize the time and the adsorption temperature. A referent for the purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), yellow passion fruit (*P. edulis Sims* f. *flavicarpa*) and banana passion fruit (*P. mollissima*), in which a temperature of 50°C was used, with adsorption time of 10, 20, 40 and 60 minutes, obtained optimum extraction time of 40 minutes [19], whereas in common tomato (*Lycopersicon esculentum* var. commune) an extraction of 60 minutes at room temperature was chosen for its optimal efficiency. Similarly, in citrus juice extraction optimal conditions were obtained, corresponding to 60°C for 40 minutes [20].

Because the SPME is supported in the distribution equilibrium of the analytes between the food matrix and the fiber coating [21], and since it the equilibrium conditions are different in each compound, the total recovery of the concentrations of the metabolites in the sample becomes impossible, nevertheless, optimizing the extraction allows an appropriate efficiency to obtain a compounds profile that reflects the volatile composition of its matrix, including the analytes present in limited quantities (minoitary compounds). This study aimed at the implementation of the HS-SPME coupled to analysis by Gas Chromatography / Mass Spectrometry for identification and quantification of the volatile compounds in fresh pulp of *S. quitoense*.

METHOD

Place of the study

Samples were selected from the farm "Villa Malicia", located at 1 km from Manizales. The analysis of the samples was carried out in the laboratory of chromatography of the University of Caldas in Manizales (Colombia).

Chemicals and distilled water

The distilled water was prepared using a purification system Direct-Q_3 model ZRQS0P030 of Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (99%) was supplied from Carlo Erba Reagents (Barcelone, Spain). The internal standard 1-octanol was obtained from Sigma-Aldrich® (Saint Louis, USA). SPME holder used for manual sampling as well as the fibres employed for adsorption of volatile metabolites from pulp of *S. quitoense* were purchased in Supelco TM® (Bellenfonte, PA, USA).

Experimental

Initially, assays were done to adjust the optimum conditions of analysis by GC/MS, like: temperature ramp, injection mode, split radius to be used (considering that the sample contained majority and minority compounds), voltage of the detector and others. For each variable, temperature and adsorption time, the experimental design of a factor was applied, taking as the response variable the total area of volatiles. Were evaluated in duplicate the temperatures of 20, 40, and 60°C and the times 5, 15, and 30 minutes in both, the split injection mode 50 and 200, considering that some of the majority compounds saturated the detector of the mass spectrometer, which made it impossible to determine its area in split 50. The analysis of data took into account the behavior of the total area of the volatiles, chemical classes, internal standard, and compounds of greater area.

Lulo fruit characteristics

The selected samples were in the in stage five of ripening, diameter of 5 ± 1 cm, degrees Brix of 10,3 ± 1, and absence of spoilage due to the microorganisms or insects. In order to keep the integrity of samples, plastic separators placed between lulo fruits were used. The fruits were stored at room temperature and the analyzes were performed in the following 24 hours.

Conditions of sample preparation and volatiles extraction

10 g of the pulp of *S. quitoense* and 1 g of sodium chloride were weighed in an extraction vial. 5 μL of a solution of 1-Octanol with concentration of 0,0018 mol/L were added to the extraction vial. The container was sealed and placed in water bath with exposition of the SPME fiber in the headspace of the sample, under temperature and the time allotted for every test. The fiber was withdrawn and let to desorb during 1 minute at 230°C in the injection port of the GC/MS equipment, time after which this was retired. For extracting, a fiber Supelco TM® of 75 μm Carboxen (CAR)/Polydimethylsiloxane (PDMS) was used. The fiber employed was previously conditioned by its subjection to 235°C over 60 minutes to activate the functional groups present in the stationary phase.

Analysis and quantification conditions

The chromatographic analysis of the volatile compounds from the pulp of *S. quitoense* was carried out with a gas chromatograph Shimadzu GCMS/QP 2010 Plus, provided with a mass spectrometry detector (MSD) and it was used a column Shimadzu® SHRVGC (30 m x 0,25 mm ID x 1,4 μm DF). with temperature range of 40-240/260 °C under the following conditions:

Chromatographic conditions.

Injection temperature 30°C; Flow control mode linear velocity (36 cm s^{-1}); Pressure of 55,2 kPa; Split injection mode (50 and 200); Column flow of 0,98 min^{-1}; Purge flow of 3 min^{-1}; equilibration time of 1 minute; Full timeout of 3,1 minutes. The temperature ramp was as follows: 50 °C during 1 min, increase at a rate of 2,5 min to reach 150ºC with sustained of 7 min, increase at a rate of 15 min up to 220 ºC with sustained of 3 min and and increase at a rate of 15 min to achieve 230 ºC maintained in this for 2 min.

Spectrometric conditions.

Temperature of the ion source of 235°C; Interface temperature of 240°C; Solvent cutting time of 3 minutes; threshold of 1000 pA; Mass ratio initial and final of 33 – 350 (m/z).

Identification of the volatile compounds.

It was conducted from the comparison of mass spectra of the sample with the NIST® library, with a concordance at or above the 93%.

Data Analysis

For data analysis, the SPSS® software version 22 was used. The coefficients of variation in all groups were lower than 12%.

RESULTS

Compounds of *S. quitoense* obtained by HS-SPME to different times and adsorption temperatures

The extraction process in the different times and adsorption temperatures used favored a recovery of 48 different volatile compounds (Table 1), with a predominance mainly of esters, represented by 24 compounds (48,98%), followed by 9 aldehydes (18,37%) and 7 alcoholic compounds (14,29%).

Effect of temperature and the adsorption time on the total area of volatile compounds

An increase in total volatile area according as the temperature was increased (Figure 1, left) can be observed in split 50, whereas in split 200 was a greater recovery denoted at 40°C (Figure 1, right). In both cases, the adsorption process was lower at 20°C, temperature nearby to environment of Manizales, where the studies were carried out, due to the increased temperature rose the concentration of analytes in the headspace, also favoring, a greater recovery of compounds with lower vapor pressure [21].

Some studies show that the use of temperatures of 40 or 60°C is suitable for the recovery of volatile compounds in fruits such as pear (*P. ussuriensis*) [15], the strawberry tree (*A. unedo* L.) [16], melon (*C. melo* L.) [17], and avocado (*P. americana* Mill., cv. Hass) [18].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (76-84) Enero _ Junio 2017

Table 1. Volatile compounds obtained by HS-SPME coupled to GC/MS in the pulp of *S. quitoense* at different times and adsorption temperatures.

Compound Name	Chemical classes	Mean retention time (min)
Acetic acid methyl ester	Esters	3,790
Ethyl acetate	Esters	5,684
Methyl propionate	Esters	6,021
Unidentified 1	Halides	6,187
Methylethyl ester acetic acid	Esters	7,107
2-Methyl propanoic acid	Acids	7,807
1-Penten-3-ol	Alcohols	8,569
Propanoic acid ethyl ester	Esters	8,932
3-Pentanol	Alcohols	9,128
n-Propyl acetate	Esters	9,277
Butanoic acid methyl ester	Esters	9,464
Toluene	Hydrocarbons	10,632
2-Butenoic acid methyl ester	Esters	12,079
Acetic acid butyl ester	Esters	12,254
Butanoic acid ethyl ester	Esters	13,266
2-Pentenal (E)	Aldehydes	13,355
Hexanal	Aldehydes	14,530
2-Methyl-3-octanone	Ketones	15,465
o-Xylene	Hydrocarbons	16,156
2-Butenoic acid ethyl ester	Esters	16,456
3-Hexen-1-ol (E)	Alcohols	18,064
3-Hexen-1-ol (Z)	Alcohols	18,099
2-Hexenal (Z)	Aldehydes	18,391
1-Hexanol	Alcohols	18,637
2-Hexenal (E)	Aldehydes	19,254
2-Penten-1-ol acetate (Z)	Esters	20,025
Acetic acid pentyl ester	Esters	20,208
Hexanoic acid methyl ester	Esters	20,573
3-Methyl-3-buten-1-ol acetate	Esters	20,739
2,4-Hexadienal (E,E)	Aldehydes	23,595
3-Hexen-1-ol acetate	Esters	25,995
Acetic acid hexyl ester	Esters	26,348
3-Cyclohexen-1-ol acetate	Esters	27,890
3.7- dimethyl-1,6-Octadien-3-ol	Alcohols	31,912
2-Octenal (E)	Aldehydes	32,062
Acetophenone	Ketones	32,802
Nonanal	Aldehydes	33,034
2,3-Butanedioldiacetate	Esters	33,216
Butanoic acid 4-hexen-1-yl ester	Esters	36,212
Unidentified 2	Esters	36,494
Octanoic acid ethyl ester	Esters	36,706
5-ethyldihydro-2(3H)-furanone	Ketones	36,912
Acetic acid, phenylmethyl ester	Esters	37,053
Unidentified 3	Esters	37,265

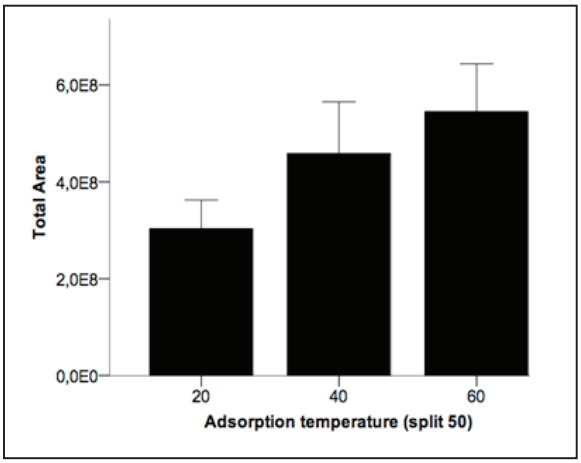
Compound Name	Chemical classes	Mean retention time (min)
2-Pentene	Hydrocarbons	37,589
3-Cyclohexene-1-methanol	Alcohols	37,881
Unidentified 4	Aldehydes	38,879
1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde	Aldehydes	40,780
The relative standard deviation (RSD) was less than 12% in the groups corresponding to the compounds obtained.		

When establishing statistical differences between the areas by Kruskal-Wallis test (the nonparametric test was chosen because of the violation the assumption of homogeneity of variance by the data), differences were not found in the effect of adsorption temperature over the area of volatile compounds obtained (P= 0,058). In contrast, differences in the effect of adsorption time over the area of volatile compounds were found (P= 0,018).

Effect of temperature and adsorption time on the areas of chemical classes.

Concerning the effect of temperature, in 50 split was noted that except for the alcohols, which showed an upper area at higher adsorption temperature, a trend of increase or decrease of the area in the chemical classes is not perceived as the temperature was raised, because temperature causes an individual effect on each compound, related to its molecular weight, polarity, vapor pressure and boiling point [19], which in turn can affect the general behavior of the areas in each chemical class. This way, while compounds 2-Hexenal and 3-Pentanol increased as the temperature was raised, others such as methyl propionate and toluene had greater area in the test at 40°C. Similar behavior was appreciated in 200 split, where also was presented an increase in the area of alcohols as the temperature was raised. As to the adsorption time, in split 50 a growing trend was presented in the area of the chemical classes when this increased, which was appreciable mainly to the total area of esters, alcohols, hydrocarbons and aldehydes. These same groups of compounds also appeared increasingly when increased the adsorption time in split 200.

Figure 1. Total area of the volatile compounds of *S. quitoense* in split 50 (left) and 200 (right) using different adsorption times.



Behavior of the compounds with greatest relative abundance in the volatile fraction of *S. quitoense* at different adsorption temperatures.

Among the compounds with greatest area in the volatile profiling of *S. quitoense*, four of them correspond to esters (3-hexen-1-ol acetate, acetic acid methyl ester, acetic acid hexyl ester and ethyl acetate). In general, as the temperature was raised these five volatile compounds represented a lower percentage of area regarding the total area of volatile of the fruit, since at 20°C accounted for 85,5% of the total volatile fraction and at 60°C corresponded to 62,4% of the respective average profile; This behavior is related to low polarity compounds which required an increase of their kinetic energy through thermal supply to move from the gas phase and be adsorbed and analyzed. When analyzing the areas of these compounds individually, a trend of growing or decline with increasing of temperature is not clearly appreciated, except for acetic acid methyl ester where it was appreciated a decrease of the compound area with increasing temperature. As was indicated previously, temperature causes an individual effect on each of these compounds, related to its polarity and boiling point, and therefore some compounds like 3-hexen-1-ol acetate shown a greater area when the adsorption was developed at 40°C.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (76-84) Enero _ Junio 2017

Behavior of the compounds with highest relative abundance in the volatile fraction of *S. quitoense* at different adsorption times

Just like was presented with the effect of temperature, a decrease in the percentage of area obtained for these five compounds in relation to the time of adsorption was denoted, so that in an adsorption of five minutes these compounds represented 85,2%, whilst at desorption of 30 minute, corresponded to a percentage of 76,5% of the total of compounds identified. This indicates that volatile compounds found in lower concentrations in the food matrix require greater time to be adsorbed so that they can represent a greater percentage with respect to the total area. Furthermore, when areas of these five compounds were analyzed individually, it was appreciated that except for acetic acid methyl ester, the other four compounds had a higher average area from the maximum adsorption time used (30 minutes). Figure 2 shows the chromatographic separation of volatile compounds from lulo pulp.

Effect of temperature and adsorption time on the recovery of the internal standard

Figure 3 shows the effect of temperature and adsorption time on the adsorption of the 1-Octanol used as internal standard, which had a recovery of 99,66% at 60ºC for 30 min. This compound was recovered to a greater extent as the temperature was increased, with a superior level using 60°C, whereas at 20 °C, recovery levels were significantly limited (Figure 3, left). Similarly, it was appreciated that the recovery of 1-Octanol was greater as it was increased exposure time of the fiber towards the pulp of *S. quitoense*, therefore the time required for a suitable adsorption of standard was 30 minutes (Figure 3, right). There is precedent for the use of 1-Octanol as the internal standard, carried out in dry milled leaves of rosemary, at 60°C for 30 minutes, in which the recovery of this standard was 15% [19].

The volatile composition of the lulo pulp has a relationship with the sensory quality of this fruit, but also with the preference by the consumer, therefore it is important to know which compounds exist in the profile of this fruit. Moreover, processing companies of lulo pulp require to collect this fruit with specific characteristics in terms of the aroma compounds, since this influences the quality of the processed product.

Figure 2. Chromatographic separation of the volatile compounds from lulo pulp using HS-SPME/GC-MS.

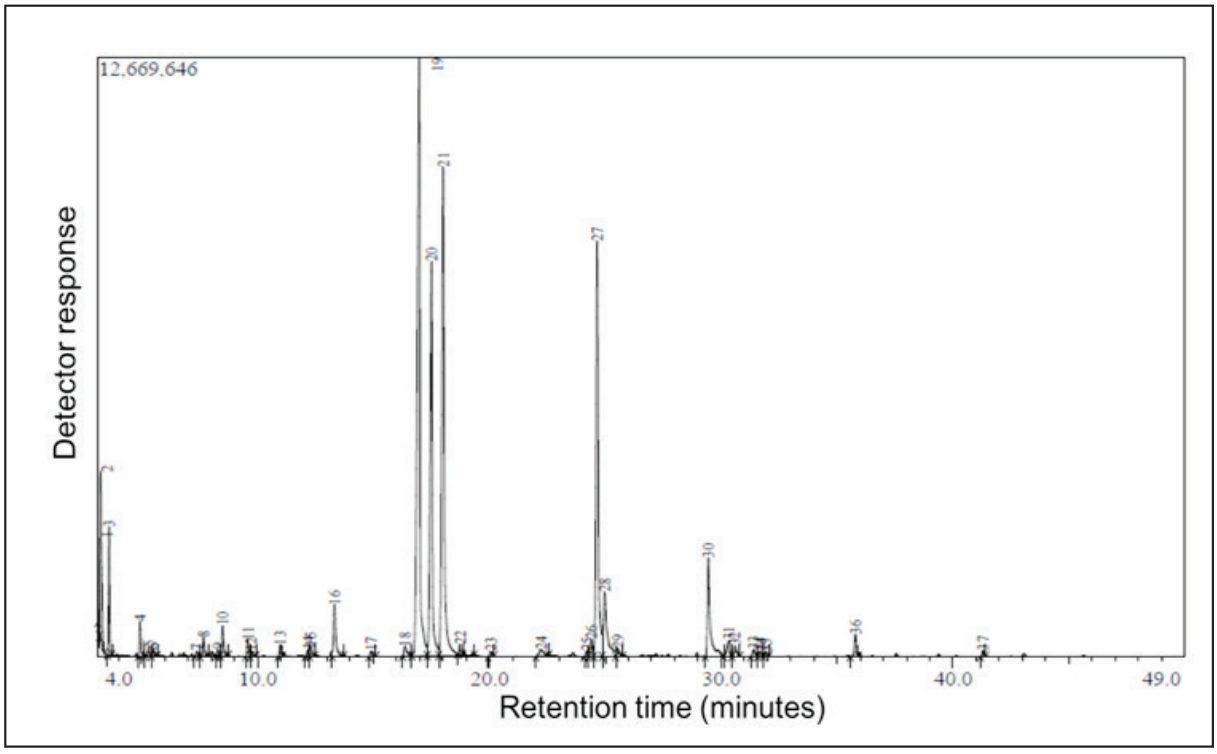
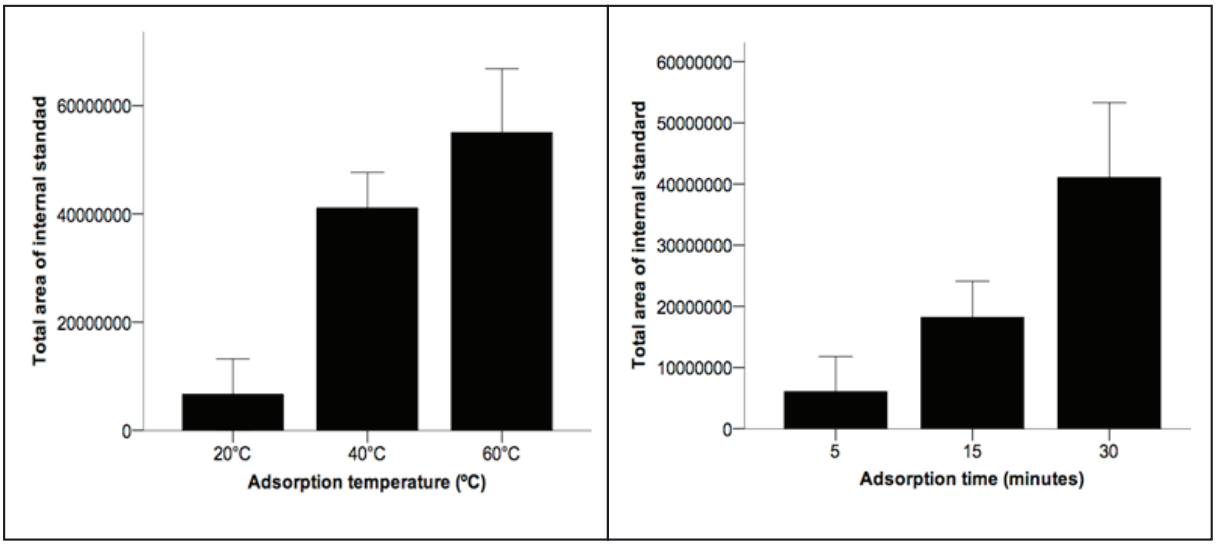


Figure 3. Effect of temperature (left) and adsorption time (right) on the area of the internal standard.



Regarding the technological advances that represents the methodology employed, HS-SPME has been used for extraction of volatile compounds in different fruit pulps [15,16,17,18, 22], in which, as well as in the current study, could be obtained volatiles with low molecular weight and high volatility. These features of the volatile profiles are relevant to the sensorial characterization, since some volatiles metabolites had high impact on sensory perception and allow to characterize the aroma of a particular fruit. These conditions result in the relevance of maintaining the quality of the volatile profile from fruit pulps in industries such as food and fragrances.

CONCLUSIONS

After establishing the analytical conditions by CG/MS adequate to the study of the volatile fraction of *S. quitoense*, trends of descriptive analysis suggested that HS-SPME extraction process using a temperature of 60°C and time of 30 minutes promoted a proper recovery of volatile compound, although only statistical differences were evident in the effect of adsorption time over volatile compounds area. Given that the greater recovery of the internal standard was obtained at 60 °C, and its area is used for determining the concentration of the volatile compounds in the sample, is considered that this temperature is suitable between the evaluated ones, for the quantification of the volatile compounds of *S. quitoense*. Through the test, a predominance of esters was appreciated, followed by aldehydes and alcohols, and the compounds of greater area were 3-hexen-1-ol acetate, acetic acid methyl ester, acetic acid hexyl ester, and ethyl acetate. HS-SPME is an alternative extraction method for obtaining the volatile compounds from lulo pulp without using solvents and avoiding the forming artifacts. Moreover, he nature of the extraction method used promoted the obtaining of a profile of volatile compounds, according to the analytical requirements of the food, flavors, and fragrances industries.

Finally, it is recommended the use of wider ranges of temperature and time as used in this study, as well as exploring diverse internal standards, to compare recovery rates obtained with 1-octanol.

ACKNOWLEDGEMENTS

The Ph.D. in Agrarian Sciences, Eduardo Corpas Iguarán, thanks to the Colciencias, for their financial contribution to the study process.

REFERENCES

[1] EL-SHARKAWY, I. *et al*. Stimulated auxin levels enhance plum fruit ripening, but limit shelf-life characteristics. Postharvest Biology and Technology, 112(1), 2016, p. 215-223.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (76-84) Enero _ Junio 2017

[2] DU, X. and ROUSEFF, R. Aroma Active Volatiles in Four Southern Highbush Blueberry Cultivars Determined by Gas Chromatography–Olfactometry (GC-O) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(20), 2014, p. 4537–4543.

[3] CONDE-MARTÍNEZ, N., SINUCO, D. and OSORIO, C. Chemical studies on curuba (*Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey) fruit flavour. Food chemistry, 357(1), 2014, p. 356-363.

[4] GARCIA, C. et al. Changes in the bound aroma profiles of 'Hayward' and 'Hort16A' kiwifruit (*Actinidia* spp.) during ripening and GC-olfactometry analysis. Food Chemistry, 137(1–4), 2013, p. 45-54.

[5] DU, X., SONG, M., BALDWIN, E. and ROUSEFF, R. Identification of sulphur volatiles and GC-olfactometry aroma profiling in two fresh tomato cultivars. Food Chemistry, 171(1), 2015, p. 306–314.

[6] BUTTARA, M., INTATAPICHET, K. and CADWALLADER, K. Characterization of potent odorants in Thai chempedak fruit (*Artocarpus integer Merr*.), an exotic fruit of Southeast Asia. Food Research International, 66(1), 2014, p. 388–395.

[7] FORERO, D., ORREGO, C., GRANT, D. and OSORIO, C. Chemical and sensory comparison of fresh and dried lulo (*Solanum quitoense* Lam.) fruit aroma. Food Chemistry, 169(1), 2015, p. 85–91.

[8] CORPAS, E., TABORDA, G., ORTÍZ A. y TAPASCO, A. Compuestos volátiles de la fracción volátil en pulpa de lulo (*S. quitoense* L.) bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Vitae, 23(1), 2016, p. 831-836.

[9] MESSINGER, J. and LAUERER, M. *Solanum quitoense*, a new greenhouse crop for Central Europe: Flowering and fruiting respond to photoperiod. Scientia horticulturae, 183(1), 2015, p. 23-30.

[10] FLÓREZ-VELASCO, N., BALAGUERA-LÓPEZ, H. and RESTREPO-DÍAZ, H. Effects of foliar urea application on lulo (*Solanum quitoense* cv. *septentrionale*) plants grown under different waterlogging and nitrogen conditions. Scientia horticulturae, 186(1), 2015, p. 154–162.

[11] IGUAL, M., RAMIRES, S., MOSQUERA, L. and MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. Optimization of spray drying conditions for lulo (*Solanum quitoense* L.) pulp. Powder Technology, 256(1), 2014, p. 233-238.

[12] NGO, M. *et al*. Assessing crossmodal correspondences in exotic fruit juices: The case of shape and sound symbolism. Food Quality and Preference, 28(1), 2013, p. 361–369.

[13] SHOKO, T., SAKA, J. and APOSTOLIDES, Z. Headspace volatiles of the edible fruit pulp of *Parinari curatellifolia* growing in Malawi using solid phase microextraction. South African Journal of Botany, 90(1), 2014, p. 128–130.

[14] SHOKO, T., APOSTOLIDES, Z., MONJEREZI, M. and SAKA, J. Volatile constituents of fruit pulp of *Strychnos cocculoides* (Baker) growing in Malawi using solid phase microextraction. South African journal of botany, 84(1), 2013, p. 11-12.

[15] QIN, G. *et al*. Evaluation of the volatile profile of 33 *Pyrus ussuriensis* cultivars by HS-SPME with GC–MS. Food chemistry, 134(4), 2012, p. 2367-2382.

[16] OLIVEIRA, I. *et al*. Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage. Food chemistry, 128(3), 2011, p. 667-673.

[17] CONDURSO, C. *et al*. Effects of different rootstocks on aroma volatile compounds and carotenoid content of melon fruits. Scientia horticulturae, 148(1), 2012, p. 9-16.

[18] OBENLAND, D., COLLIN, S., SIEVERT, J., NEGM, F. *et al*. Influence of maturity and ripening on aroma volatiles and flavor in 'Hass' avocado. Postharvest biology and technology, 71(1), 2012, p. 41-50.

[19] PONTES, M., MARQUES, J. and CÂMARA, J. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometric methodology for the establishment of the volatile composition of *Passiflora* fruit species. Microchemical Journal, 93(1), 2009, p. 1-11.

[20] NARDINI, G. *et al*. Determination of volatile profile of citrus fruit by HS-SPME/GC-MS with oxidized NiTi fibers using two temperatures in the same extraction procedure. Microchemical journal, 109(1), 2013, p. 128-133.

[21] IBÁÑEZ, E. *et al*. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. Food chemistry, 63(2), 1998, p. 281-286.

[22] SPADAFORA, N. *et al*. Detection of *Listeria monocytogenes* in cut melon fruit using analysis of volatile organic compounds. Food Microbiology, 54(1), 2016, p. 52-59.

DIVERSIDAD GENÉTICA EN PATRONES DE CÍTRICOS MEDIANTE MICROSATÉLITES AMPLIFICADOS AL AZAR (RAMs)

GENETIC DIVERSITY ON CITRUS ROOTSTOCKS WITH RANDOM AMPLIFIED MICROSATELLITES (RAMs)

DEVERSIDADE GENETICA DE PADROES DE CITROS USANDO MICROSSATELITES AMPLIFICADOS AO ACASO (RAMs)

JEISSON STEEVENS GALLEGO-COLONIA[1], AYDA LILIA ENRÍQUEZ-VALENCIA[1], ÁLVARO CAICEDO-ARANA[2], ANDRÉS MAURICIO POSSO-TERRANOVA[3], JAIME EDUARDO MUÑOZ-FLOREZ[4.]

RESUMEN

Los patrones de cítricos son esenciales en la citricultura debido a que afectan más de veinte características agronómicas de las copas y frutos. La caracterización y documentación de las introducciones de un banco de germoplasma permiten evitar duplicados e identificar introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales. Se evaluó la diversidad genética de 39 introducciones del banco de germoplasma de Cítricos de CORPOICA Centro de Investigación Palmira. Se utilizaron seis cebadores RAMs los cuales generaron 134 loci polimórficos que se usaron para estimar los parámetros de diversidad genética. La He y porcentaje de loci polimórficos para la colección fue de 0,38 y 92,54%, respectivamente. El análisis de similitud permite apreciar que los materiales se encuentran dispersos en el dendrograma, sin embargo a un nivel de similitud de 0,63 se agrupan las introducciones

Recibido para evaluación: 17 de Julio de 2015. **Aprobado para publicación:** 25 de Julio de 2016.

1 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ingeniera Agrónoma. Palmira, Colombia.
2 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). Ingeniero Agrónomo. Palmira, Colombia.
3 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.d. en Biólogia. Palmira, Colombia.
4 Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ph.d. Ciencias Agrarias. Palmira, Colombia

Correspondencia: alenriquez.v@hotmail.com.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (85-94) Enero _ Junio 2017

del género Poncirus y sus híbridos. La especie Clausena lansium fue la más distante del resto de las especies y se diferenció a un nivel de similitud de 0,54. Los resultados indican alta diversidad genética en el banco de germoplasma de patrones de cítricos, que puede ser utilizada en futuros trabajos de investigación.

RESUMO

Os porta-enxertos de cítricos são essenciais na cultura de citros porque afetam mais de vinte características agronômicas das cultivares-copa e dos frutos. A caracterização e documentação das introduções de um banco de germoplasma impedem duplicações e permitem identificar acessões promissoras para processos de seleção, melhoramento genético ou processos agroindustriais. Foi avaliada a diversidade genética de 39 acessões do banco de germoplasma de Citrus da Corporación Colombiana de Pesquisa Agropecuária (CORPOICA), centro de pesquisa Palmira. Foram usados seis primers RAMs, os quais geraram 134 loci polimórficos que foram utilizados para estimar os parâmetros de diversidade genética. A heterogeneidade esperada e a percentagem de loci polimórficos para a coleção foi de 0,38 e 92,54%, respectivamente. A análise de similaridade permitiu apreciar que os materiais estão dispersos no dendrograma, no entanto, num nível de similaridade de 0,63 estão agrupadas as acessões do gênero Poncirus e seus híbridos. A espécie Clausena Lansium foi o mais distante das outras espécies no dendrograma e diferiu num nível de similaridade de 0,54. Os resultados mostram alta diversidade genética no banco de germoplasma de padrões de citros de CORPOICA C.I. Palmira, que pode ser utilizada em futuros trabalhos de pesquisa.

PALABRAS CLAVE:
Citrus, Biodiversidad, Caracterización, Germoplasma, Molecular.

PALAVRAS-CHAVE:
Bancos, Biodiversidade, Caracterização, Germoplasma, Molecular.

KEYWORDS:
Banks, Biodiversity, Characterization, Germplasm, Molecular.

ABSTRACT

Citrus rootstocks are essential in the citrus industry because they affect more than twenty agronomic characteristics of the citrus and fruits. Characterization and documentation of germplasm bank introductions allow to avoid duplicates and to identify promising accessions for selection processes, breeding or agro-industrial processes. It was evaluated the genetic diversity of 39 accessions from the citrus rootstocks germplasm bank of the Colombian Corporation for Agricultural Research (Corpoica-Palmira). Six RAMs primers were used which generated 134 polymorphic loci that were used to estimate genetic diversity parameters. Expected heterogeneity and polymorphic loci percentage for the collection was 0,38 and 92,54%, respectively. Similarity analysis allow to appreciate that the materials are dispersed in the dendrogram, however a similarity level of 0,63 grouped the accessions of the genus Poncirus and their hybrids. The species Clausena lansium was the most distant from other species in the dendrogram and differed at a similarity level of 0,54. The results indicate a high genetic diversity in the citrus rootstocks germplasm bank of Corpoica that can be used in future research programs.

INTRODUCCIÓN

Los cítricos cultivados actualmente se caracterizan por estar formados por la unión de dos individuos por medio del injerto. El patrón constituye el sistema radical y una parte del tronco, sobre el cual se injerta la yema, vareta o púa que forma la copa o parte aérea la cual produce los frutos de interés comercial. El empleo del patrón no sólo ha logrado mejorar los rendimientos y la calidad de los frutos, sino que también ha permitido la siembra en sitios con características adversas para el normal desarrollo de la planta [1]. Los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae, formada por siete subfamilias, una de ellas es Aurantioideae, la cual tiene dos tribus, Clauseneae y Citreae. Clauseneae consiste de tres subtribus, entre ellas Clauseninae donde se destaca el género Clausena [2]. Las especies del genero *Poncirus* hibridan libremente con las especies de cítricos generando grupos de híbridos, que son citranges (*Poncirus trifoliata x Citrus sinensis*), citrandarinas (*Poncirus trifoliata x Citrus reticulata*), citremones (*Poncirus trifoliata x Citrus limonia*) y citrumelos (*Poncirus trifoliata x Citrus paradisi)*, que también reconoce a los tangores como el cruce interespecífico entre mandarina (*Citrus reticulata*) y naranja (*Citrus sinensis*) [3].

En los bancos de germoplasma vegetal, la caracterización y documentación de las introducciones permiten evitar duplicados e identificar introducciones promisorias para procesos de selección, mejoramiento genético o procesos agroindustriales [3]. En el banco de germoplasma de cítricos de CORPOICA C.I. (Palmira), se encuentran 40 introducciones de patrones de *Citrus* y géneros relacionados, establecidos en materas tipo bonsái, muchos de origen desconocido, razón por la cual es necesario hacer estudios moleculares que evalúen la diversidad genética de este banco de germoplasma.

El uso de marcadores moleculares ha sido un instrumento valioso y preciso para la evaluación de la diversidad genética en cítricos y géneros relacionados, incluyendo marcadores isoenzimaticos [4], SRAP [5], RAPD [6], AFLP [7], En Colombia, se evaluó la diversidad genética del banco de germoplasma de cítricos en naranjas *Citrus sinensis* [8, 9], sin embargo en la colección de patrones de cítricos aún es desconocido. Hasta la fecha los reportes acerca de la medición de la diversidad genética de cítricos y géneros relacionados usados como patrones son escasos.

Los marcadores moleculares RAMs son útiles para medir la diversidad genética en plantas y animales, diferencia entre familias, entre especies y al interior de la especie [10]. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel y organización de la diversidad genética de patrones de cítricos del banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA C.I. Palmira, usando marcadores moleculares RAMs.

MÉTODO

Material vegetal

Se colectó hojas jóvenes de 39 accesiones de patrones de cítricos procedentes del banco de germoplasma de CORPOICA C.I. Palmira (cuadro 1), localizada en Palmira, Valle del Cauca, Colombia, a 1001 msnm, con una precipitación anual de 1.174 mm y temperatura promedio de 25°C. La colección de estudio cuenta con materiales pertenecientes a tres géneros de la familia Rutaceae: *Citrus*, *Poncirus* y *Clausena.*

Extracción de ADN y amplificación con cebadores RAMs

El tejido vegetal se maceró en nitrógeno líquido y se realizó la extracción de ADN siguiendo la metodología [11] con algunas modificaciones. Para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN obtenido se realizaron geles de agarosa al 0,8% corridos en buffer TBE 0,5X (Tris-borato 0045 M; EDTA (ácido etildiaminotetraacético 0,001M) a 100 voltios durante 50 minutos, teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 μg/mL, y visualizados bajo luz ultravioleta.

Las concentraciones se determinaron por comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda. El ADN cuantificado se diluyó en agua HPLC hasta tener la concentración final de 10 ng/μL. El ADN de las accesiones se almacenó en cajas criogénicas a -20ºC, con sus respectivas identificaciones, en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

Para la caracterización molecular se utilizaron siete cebadores RAMs, teniendo en cuenta su habilidad para revelar polimorfismo, el número de bandas polimórficas y su reproducibilidad (cuadro 2). La concentración de la reacción fue: Tampón Taq 1X, dNTPs 0,2 mM (para cada uno), cebadores 4 μM, $MgCl_2$ 2,5 mM, una

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (85-94) Enero _ Junio 2017

Cuadro 1. Patrones de cítricos del banco de germoplasma de CORPOICA C.I. (Palmira), utilizados para la caracterización molecular con microsatélites RAMs.

ENTRADA	NOMBRE COMUN	ESPECIE
UNP - C00	Satinga /SxE	Citrus sunki
UNP - C01	Limón rugoso	Citrus jambhiri Lush
UNP - C02	English large	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C03	Ponkan	Citrus reticulata Blanco
UNP - C04	Rusk	(P. trifoliata x C. sinensis)
UNP - C05	Arizona	Citrus limon (L.) Burm
UNP - C06	cod. 1449	Poncirus trifoliata x Citrus limón
UNP - C07	Crenatifolia	Citrus crenatifolia Lush.
UNP - C08	Rich 21-3	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C09	Kryder 15-3	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C10	Sacaton	C. paradisi x P. Trifoliata
UNP - C11	Cleopatra	Citrus reshni Hort. ex Tan.
UNP - C12	Sunky x Jacobson	C. sunky x P. Trifoliata
UNP - C13	Sunky x English	C. sunky x P. Trifoliata
UNP - C14	Pomeroy	Poncirus trifoliata (L.) Raf.
UNP - C15	cod. 1449	Poncirus trifoliata x Citrus limón
UNP - C16	Naranjo agrio	C. aurantium L.
UNP - C17	Clausena	Clausena lansium (Lour.) Skeels.
UNP - C18	Rangpur	Citrus limonia Osb.
UNP - C19	C - 35	C. sinensis (var. Ruby) x P. trifoliata (clon Webber-Fawcett)
UNP - C20	Pomelo África	Citrus paradisi Macf.
UNP - C21	Amblycarpa	Citrus amblycarpa (Hassk.) Ochse.
UNP - C22	Parson special	Citrus reticulata Blanco.
UNP - C23	Citrus lycopersicum	Citrus lycopersicae
UNP - C25	H - 56	C. reticulata x C. sinensis
UNP - C26	Salerma	Citrus sinensis (L.) Osbeck.
UNP - C27	C. sunki	Citrus sunky Hort. ex Tan.
UNP - C28	CPB 4475	Citrus paradisi (Pomelo Duncan) x Poncirus trifoliata
UNP - C29	Volkameriana	Citrus volkameriana Ten. & Pasq.
UNP - C30	Troyer	Citrus sinensis (Washington navel) x Poncirus trifoliata
UNP - C31	Webberi	Citrus webberii Wester.
UNP - C32	Yuma	C. sinensis x P. trifoliata
UNP - C33	Rangpur x Swingle	C. limonia x (C. paradisi x P. trifoliata)
UNP - C34	Tangor dweet	C. reticulata x C. sinensis
UNP - C35	Armenia	Citrus aurantifolia Burn.
UNP - C36	Milan	Citrus jambhiri Lush.
UNP - C37	Natsudaidai	Citrus natsudaidai Hayata.
UNP - C39	Fly dragon	Poncirus trifoliata var. monstrosa T. ito
UNP - C40	Carrizo	C. sinensis x P. trifoliata

Cuadro 2. Cebadores utilizados en la técnica Microsatélites RAMs.

Cebador	Secuencia (5' A 3')	Temperatura hibridación
CCA	DDBCCACCACCACCACCA	55°C
CT	DYDCTCTCTCTCTCTCTC	55ºC
AG	HBHAGAGAGAGAGAGAGA	48°C
GT	VHVGTGTGTGTGTA	58ºC
CA	DBDACACACACACACACA	50ºC
TG	HVHTGTGTGTGTGTGTGT	55ºC
CGA	DHBCGACGACGACGACGA	58°C

Las siguientes designaciones se usan para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T). Tomado de Morillo et al (2009).

unidad de Taq polimerasa y 10 ng de ADN en un volumen final de 25 μL. La amplificación se realizó en un termociclador (PTC-100 Programable Termal Controller), con las siguientes condiciones: 95ºC por 5 minutos, seguido de 37 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 50-58ºC por 45 segundos (de acuerdo al cebador utilizado (cuadro 2), 72ºC por 2 minutos y una extensión final de 72ºC por 7 minutos.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (37:1 acrilamida – bisacrilamida) en una cámara Biometra, corridos a 150 voltios y 400 mA, durante una hora y 10 minutos. La tinción se realizó utilizando sales de plata (figura 1) [12].

Análisis de datos

La lectura de las bandas se realizó considerando como locus polimórfico aquel en el cual el alelo más común tiene una frecuencia menor al 95% [13]. Se generó una matriz binaria de presencia (uno) y ausencia (cero). A partir de esta matriz y usando los programas SIMQUAL del paquete NTSYS-pc (*Numerical Taxonomy System for Personal Computer, versión 2.02 PC)* y el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analisys) se realizaron los análisis estadísticos.

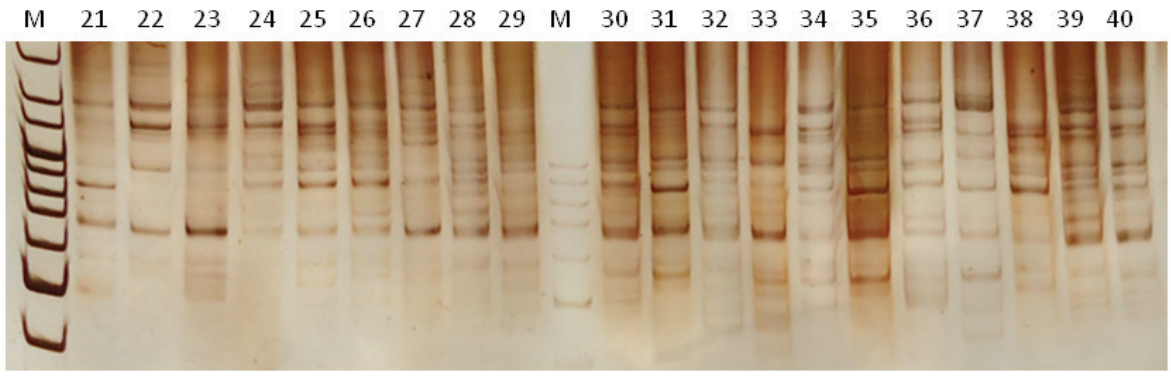
Para cada cebador se obtuvo el número de bandas totales y bandas polimórficas. La similitud genética se calculó mediante el coeficiente de Dice Nei-Li [14]: $S=(2a/2a+b+c)$ donde a = bandas compartidas por ambos individuos, b = bandas presentes en el individuo (1) pero no en (2), y c = bandas presentes en el individuo (2) pero no en (1). El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS-pc (versión 2) utilizando el método UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa *TREE* de NTSYS–pc. Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio esperada (He) y el porcentaje de loci polimórficos (P), los cuales se estimaron sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de [15].

RESULTADOS

Marcadores moleculares RAM's

Se seleccionaron seis cebadores RAM's de los siete inicialmente considerados para el estudio. El cebador CGA se descartó del análisis debido a que no amplificó para la mayoría de las muestras. Los seis cebadores generaron 134 bandas que oscilaron entre 17 para el cebador GT y 26 para el cebador CA (cuadro 3), lo cual también coincide con el número de loci polimórficos,

Figura 1: Gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, cebador AG.



Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (85-94) Enero _ Junio 2017

Cuadro 3. Numero de loci polimórficos, Heterocigosidad promedio estimada y porcentaje de loci polimórficos para los seis cebadores RAMs evaluados en 39 introducciones de patrones de cítricos.

Cebador	No. Loci polimórficos	He estimada	% Loci polimórficos (95%)
AG	19	0,41	100,00
CCA	18	0,28	75,00
CT	24	0,41	95,83
GT	17	0,40	100,00
TG	24	0,38	91,67
CA	26	0,41	92,31
Población total		0,38	92,54

con excepción del cebador CCA que género 18 loci polimórficos de un total de 20 loci.

Las condiciones de amplificación para los cebadores RAM's se tomaron en cuenta de acuerdo a lo descrito por [10]. Sin embargo, las condiciones de amplificación pueden variar dependiendo de la especie estudiada. En este estudio se hizo una variación en la temperatura de hibridación del primer AG (48°C) (figura 1).

Análisis de Diversidad Genética

La heterocigosidad esperada (He) para las 39 introducciones de patrones de Cítricos fue de 0,38, indicando un alto nivel de diversidad genética en la colección (cuadro 3). Teniendo en cuenta que $0 \leq He \leq 0,3$ [16], este valor puede estar asociado a que se evaluaron tres géneros diferentes, *Citrus*, *Poncirus* y *Clausena*, y al interior de ellos diferentes especies y cruzamientos (híbridos). En la caracterización molecular con RAM's del grupo de naranjas del banco de germoplasma de cítricos de CORPOICA, se encontró un valor de He de 0,31 [8], el cual también es alto y similar a lo encontrado en este estudio para patrones de cítricos.

El porcentaje de loci polimórfico encontrado para la colección fue de 92,54%, indica alta diversidad genética, lo cual se debe posiblemente a que la colección está formada por introducciones de tres géneros diferentes y además la mayoría de estos materiales son híbridos intergenéricos e interespecíficos. Los valores de He y porcentaje de loci polimórficos para cada uno de los cebadores RAM's fueron altos. Los valores de He variaron entre 0,41 para AG, y 0,28 para CCA, y valores intermedios importantes fueron registrados en CT y CA: 0,41, GT: 0,40, TG: 0,38. El porcentaje de loci polimórficos osciló entre 75% para CCA, y 100% para AG y GT; de igual forma se registraron valores importantes en los cebadores CT: 95,83%, CA: 92,31%, TG: 91,67%. Los cebadores con secuencias repetidas de dos pares de bases fueron más polimórficos que CCA con tres pares de bases. De manera general hubo correlación entre He y polimorfismo en los cebadores evaluados. Los resultados indican que los seis cebadores evaluados realizaron un aporte significativo al estudio de la diversidad genética de patrones de cítricos constituyéndose en marcadores moleculares útiles para futuros trabajos de investigación.

La colección está compuesta por especies e híbridos de tres géneros diferentes, por lo tanto ésta se organizó en tres grupos: el grupo uno corresponde a materiales del género *Poncirus* y sus híbridos con el género *Citrus*; el grupo dos compuesto por introducciones del género *Citrus* e híbridos interespecíficos (tangores); y el grupo tres formado por un material del género *Clausena.* Debe aclararse que este último no es un grupo como tal debido a que está formado por un solo material y por lo anterior no registró valores de heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos. Estos valores para el grupo uno fueron de 0,34 y 82,09%, respectivamente; mientras que para la población dos, fueron de 0,37 y 90,30%, respectivamente. Estos resultados indican que el grupo dos tiene la mayor diversidad genética de la colección. Lo anterior puede ser explicado debido a que este grupo se compone de mandarinas, naranjas, limones, pomelos, híbridos, y otros materiales que no están incluidos dentro de los grupos anteriores, por ejemplo *Citrus lycopersicae*.

En mandarina *Citrus reticulata* Blanco, se encontró alta heterogeneidad genética (86% polimorfismo) utilizando AFLP a pesar de considerar introducciones altamente relacionadas [17]. Utilizando otras técnicas moleculares, isoenzimas [18], RFLP, RAPD [19] y microsatélites [20] se ha concluido que este grupo reporta mayor diversidad genética dentro del género *Citrus*.

En naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck, se desarrollaron y caracterizaron marcadores moleculares microsatélites polimórficos, encontraron valores de He promedio de 0,50, y de heterocigosidad observada (Ho) promedio de 0,99 [21], que son valores altos que justifican la diversidad genética del género *Citrus*. Sin embargo, en otros estudios con RAM's y microsatélites, se encontraron valores de He de 0,22 y 0,25, respectivamente, y porcentaje de loci polimórficos de 49% y 64,8%, res-

pectivamente [8, 9], los cuales son bajos y contrastan con el presente estudio debido a que las introducciones evaluadas son cultivares clonados de naranjas no híbridas, mientras que en este estudio de la diversidad genética de patrones de cítricos la colección cuenta con materiales híbridos (dos tangores y siete citranges) y una accesión de naranja no híbrida (Salerma).

Los pomelos *Citrus paradisi,* se caracterizan por presentan baja diversidad entre ellos, sin embargo, al ser comparados con otras especies del género *Citrus*, como es el caso del presente estudio, se obtiene alta diversidad. Se evaluaron la variabilidad genética de 38 introducciones de *Citrus paradisi* usando RAPD y SSR encontrando bajo polimorfismo entre los materiales (49%) [22]. Esto sugiere que el polimorfismo morfológico observado entre los pomelos debe estar asociado con mutaciones somáticas, las cuales no son detectadas por los marcadores moleculares utilizados.

A pesar que la mayor diversidad se encontró en el grupo de *Citrus* (He 0,37 y 90,30% loci polimórficos) se debe tener en cuenta que la diversidad del grupo uno (*Poncirus* y sus híbridos con *Citrus*) también es alta (He 0,34 y 82,09% loci polimórficos). Lo anterior puede atribuirse a que éste grupo incluye citranges, citremones, citrumelos, citrandarinas, que son materiales provenientes del cruce entre dos géneros (Cuadro 1).

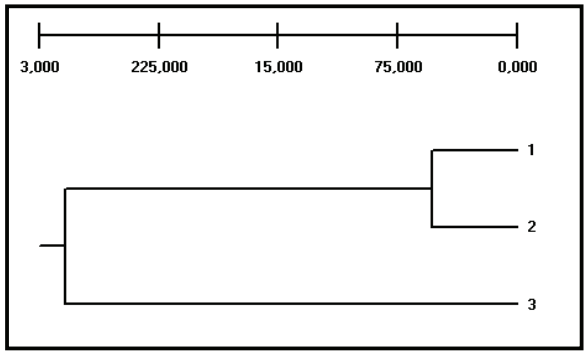
Distancia Genética

Los valores de distancia genética calculados con el índice de Nei [14] mostraron que los grupos 1 y 2, *Poncirus* y *Citrus*, respectivamente, son más cercanos entre ellos (0,05), al ser comparadas con *Clausena lansium* (0,28) (figura 2). Lo anterior puede ser explicado debido a que los géneros *Poncirus* y *Citrus* pertenecen a la misma subtribu (*Citrinae*), dentro de la tribu Citreae, mientras que el género *Clausena* se incluye en la subtribu Clauseninae, dentro de la tribu Clauseneae, ubicándose lejos taxonómicamente.

Análisis de Similitud Genética

El análisis mediante el coeficiente de Dice Nei-Li permite apreciar que los materiales del banco de germoplasma se encuentran dispersos en el dendrograma (figura 3). La falta de agrupamientos puede deberse a que en este estudio no se evaluó una sola especie, sino varias especies e híbridos pertenecientes a tres géneros diferentes. Además, este banco, está compuesto por introducciones de diferentes partes del

Figura 2. Dendrograma de distancia genética.



Distancia genética calculado con el índice de Nei (1978) construido con el método UPGMA para los tres grupos formados. 1) Poncirus y sus híbridos con Citrus, 2) Citrus e híbridos intragenéricos, 3) Clausena lansium.

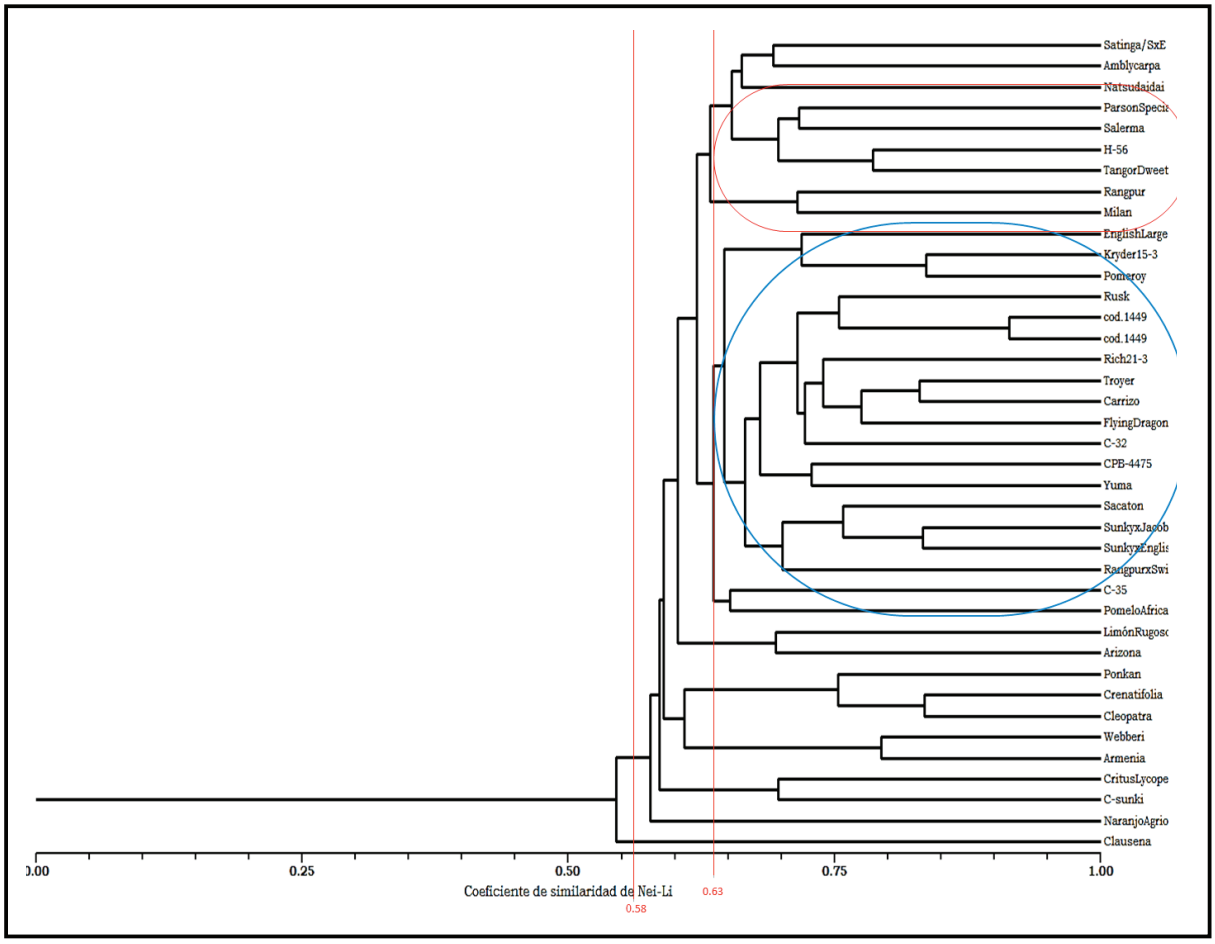
mundo, en particular de Riverside - California, Florida (E.U), Valencia (España), Embrapa (Brasil), entre otros centros de investigación, universidades y fincas de agricultores lo cual hace que la diversidad de la colección sea más amplia.

Sin embargo, a un nivel de similitud de 0,63 se agrupan todos los materiales trifoliados, los cuales corresponden a *Poncirus* y sus híbridos. La influencia de *Poncirus trifoliata* es fuerte en los citranges evidenciado por la naturaleza trifoliada de sus hojas, así como la acidez y amargura de sus frutos y la resistencia al frio [23]. Este nivel de similitud es consistente con el estudio de (5) donde utilizaron marcadores SRAP con el fin de detectar polimorfismo entre 86 materiales de *Citrus* y especies cercanas en la subfamilia Aurantioidea el grupo de *Poncirus* y sus híbridos se agrupó a un nivel de similitud de 0,55. “Pomelo Africa” (*Citrus paradisi*) fue la única accesión del género *Citrus* que se agrupó con los materiales trifoliados. Lo anterior puede ser explicado debido a que “Pomelo Africa” puede estar compartiendo características en común con los materiales de este grupo, el cual posee híbridos de *Citrus paradisi* con *Poncirus trifoliata*.

Dentro del grupo de los materiales trifoliados, a un nivel de similitud del 0,66 se diferencia un subgrupo el cual lo conforman tres materiales *Poncirus trifoliata* (“English large”, “Kryder 15-3” y “Pomeroy”). Otro subgrupo al mismo nivel de similitud reúne materiales *Poncirus trifoliata* e híbridos. Dentro de este subgrupo están dos citremones 1449 (*Poncirus trifoliata x Citrus limon*), los cuales inicialmente se pensaba que se trataba del mismo material en el banco de germoplasma, pero la técnica RAM’s permitió la diferenciación de

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (85-94) Enero _ Junio 2017

Figura 3. Dendrograma de la estructura genética.



Dendrograma de la estructura genética de 39 introducciones de patrones de cítricos del banco de germoplasma de Corpoica basado en el Coeficiente de Nei-Li, y calculado de los datos de 6 cebadores microsatélites RAMs.

estos materiales. Estos citremones tienen el nivel de similitud más alto del análisis (0,92).

Los citranges "Troyer" y "Carrizo" (*Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*), importantes patrones en la citricultura, se agrupan a un nivel de similitud de 0,83, lo que demuestra que estos materiales son cercanos como lo revela la técnica RAMs en este estudio. Con marcadores SRAP, se encontró que "Troyer" y "Carrizo" fueron casi idénticos (0,99) [5]. "Troyer" y "Carrizo" son en realidad un clon único el cual se originó como una plántula zigótica (CPB 4-5019) proveniente del cruce de naranja "Washington navel" *Citrus sinensis* y "naranja trifoliada" *Poncirus trifoliata,* en lugar de las dos plantas hermanas como se había supuesto [24]. Aunque morfológicamente son casi idénticos, el citrange "Carrizo" tiene ventajas agronómicas que han desplazado el uso del citrange "Troyer" [25].

Las citrandarinas "Sunky x Jacobson" y "Sunky x English" (*Citrus sunky x Poncirus trifoliata),* se agruparon a un nivel de similitud de 0,84. Este resultado se esperaba, considerando que ambas introducciones tienen un parental en común (*Citrus sunky*) y dos líneas hermanas: Jacobson e English (*Poncirus trifoliata*). Fuera de este gran grupo de materiales trifoliados (*Poncirus* y sus híbridos), los demás materiales pertenecientes a *Citrus* forman agrupaciones interesantes.

Las limas y limones no forman una agrupación clara, no obstante hay algunas tendencias. La lima "Rangpur" y el limón "Milan" tienden a agruparse a un nivel de similitud de 0,62 con el grupo que reúne mandarina, naranja, pomelo, e híbridos, descrito anteriormente. La lima "Rangpur", es bastante diferente morfológicamente y genotípicamente de las limas y fue considerada como *Citrus reticulata* [21]. El origen y los paren-

tales de los rangpurs son inciertos, pero generalmente han sido clasificados con las mandarinas en estudios previos [5]. "Rangpur" es un híbrido de citrón y mandarina (*Citrus medica x Citrus reticulata)* [26].

Naranjo agrio *Citrus aurantium,* fue distante de los demás materiales (0,57), lo cual puede explicarse dado que es una de las especies más primitivas de los cítricos reportados en la historia después del cidro (*Citrus medica*). Su proceso de evolución y domesticación no ha estado tan marcado como el naranjo dulce y la naranja trifoliada [7].

Clausena lansium, única especie representativa del género *Clausena*, fue la especie más distante del resto de las especies en el dendrograma, con un nivel de similitud de 0,54. Esto puede ser debido a que *Clausena lansium* pertenece a la tribu Clauseneae, una de las dos tribus de la subfamilia Aurantioideae, la cual también incluye la tribu Citreae. La tribu Citreae incluye los géneros *Citrus* y *Poncirus* [2]. Con marcadores SRAP, separaron a un nivel de similitud de 0,32 a *Clausena lansium* de los géneros de la subtribu Citrineae, entre ellos, *Poncirus* y *Citrus* [5], y por lo tanto, los resultados obtenidos están de acuerdo a lo reportado anteriormente.

CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares RAMs son útiles para la evaluación de la diversidad genética en *Citrus* y géneros relacionados, debido a que mostraron altos niveles de polimorfismo, además, pudieron diferenciar el género *Citrus* de sus parientes distantes. La Técnica RAMs fue eficiente en la discriminación de los tres géneros que componen a los patrones de cítricos del banco de germoplasma CORPOICA (*Citrus*, *Poncirus* y *Clausena*). La distancia genética entre *Citrus* y *Poncirus* fue menor en comparación con el género *Clausena*, debido a que se incluyen taxonómicamente en tribus diferentes.

Se esperaba que el grupo uno (*Poncirus* y sus híbridos) tuviese la mayor diversidad genética porque incluye materiales provenientes del cruce de dos géneros, sin embargo se encontró que *Citrus* tenía la mayor diversidad genética debido a que este grupo se compone de mandarinas, naranjas, limones, pomelos, híbridos, y otros materiales que no están incluidos dentro de los grupos anteriores. El análisis de similitud permite apreciar que los materiales del banco de germoplasma se encuentran dispersos en el dendrograma, no obstante las introducciones trifoliadas se agrupan y algunas de *Citrus* tienden a formar agrupaciones. La técnica RAM's tiene potencial en futuros estudios de distancia genética entre los patrones de cítricos estudiados y las principales copas usadas comercialmente, los cuales permitirán entender varios fenómenos como la compatibilidad y afinidad copa-patrón, y el impacto que esto tiene en el desarrollo del árbol.

REFERENCIAS

[1] ORDUZ, R.J.O y MATEUS, C.D.M. Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia [online]. 2012. Disponible: http://hdl.handle.net/10567/561 [citado 4 de Agosto de 2015].

[2] HYNNIEWTA, M., KUMAR, M.S. and RAMA, R.S. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. Meta Gene, 2, 2014, p. 237–251.

[3] GANOPOULOS, I., XANTHOPOULOU, A., MASTROGIANNI, A., DROUZAS, A., KALIVAS, A., BLETSOS, F., KROMMYDAS, K., RALLI, P., TSAFTARIS, A. and MADESIS, P. High Resolution Melting (HRM) analysis in eggplant (*Solanum melongena* L.): A tool for microsatellite genotyping and molecular characterization of a Greek Genebank collection. Biochemical Systematics and Ecology, 58, 2015, p. 64-71.

[4] POONDLA, A.V., BANDIKARI, A.R., SUBRAMANYAM, B.R.A. and SARATHI, O. V.R. Low temperature active pectinases production by Saccharomyces cerevisiae isolate and their characterization. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4, 2015, p. 70–76.

[5] UZUN, A., YESILOGLU, T., AKA-KACAR, Y., TUZCU, O. and GULSEN, O. Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). Scientia Horticulturae, 121, 2009, p. 306-312.

[6] HYNNIEWTA, M., KUMAR, M.S. and RAMA, R.S. Genetic diversity and phylogenetic analysis of *Citrus* (L) from north-east India as revealed by meiosis, and molecular analysis of internal transcribed spacer region of rDNA. Meta Gene, 2, 2014, p. 237–251.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (85-94) Enero _ Junio 2017

[7] LEÓN, J. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. San José (Costa Rica): lica/Catie, 1987, p. 84.

[8] LI, Y., CHEN, W., MA, D. and WU, Y. cDNA-AFLP. Analysis revealed genes potentially implicated in *Catharanthus roseus* flowers during wheat blue dwarf phytoplasma infection. Physiological and molecular plant pathology, 84, 2013, p. 1-9.

[9] MORILLO, A.C., MORILLO, Y., CHAGÜEZA, Y., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J.E. Caracterización de la diversidad genética en naranja y comparación del polimorfismo de microsatélites amplificados al azar (RAMs) usando electroforesis de poliacrilamida y agarosa. Acta Agronómica, 58(4), 2009, p. 234-244.

[10] MORILLO, Y., MORILLO, A.C., CHAGÜEZA, Y., CAICEDO, A. y MUÑOZ, J.E. Caracterización mediante microsatélites de 34 introducciones de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck del Banco de Germoplasma de Corpoica-Palmira. Acta Agronómica, 59(1), 2010, p. 9-19.

[11] MUÑOZ, J.E., MORILLO, A.C. y MORILLO, Y. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. Acta agronómica, 57(4), 2008, p. 219-226.

[12] DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: Versión II. Plant. Molecular Biology Reports, 14, 1983, p. 19-21.

[13] MAURYE, P., BASU, A. and GUPTA, A. Simple and cost effective apparatus for silver staining of polyacrylamide gels with sequential reagents addition and real time monitoring. Bioscience and Bioengineering, 117, 2014, p. 769-774.

[14] BERG, E. and HAMRICK, J. Quantification of genetic diversity at allozyme loci. Canadian of Forest Research, 27, 1997, p. 415-424.

[15] NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89, 1978, p. 583-590.

[16] NEI, M. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70, 1973, p. 3321-3326.

[17] MEDINA, F.H.P., BORDIGNON, R. and SIQUEIRA, W.J. Segregações gaméticas de locos isoenzímicos em porta-enxertos de citros e suas contribuições alélicas na formação de híbridos. Bragantia, 62, 2013, p. 357-367.

[18] YAHMEDA, J.B.B., NOVILLO, B.P., GARCIA, B.A., TALONB, M. and MORILLON, R. Salt tolerance traits revealed in mandarins (*Citrus reticulata* Blanco) are mainly related to root-to-shoot Cl− translocation limitation and leaf detoxification processes. Scientia Horticulturae, 191, 2015, p. 90–100.

[19] SANGA, W., HUANGB, Z.R., YANGA, L.T., GUOA, P. and CHENA L.S. An investigation of boron-toxicity in leaves of two citrus species differing in boron-tolerance using comparative proteomics. Proteomics, 123, 2015, p. 128–146.

[20] WANG, L.Q., YANG, L.T., GUO, P., CHEN, E.J. and CHEN, L.S. Leaf cDNA-AFLP analysis reveals novel mechanisms for boron-induced alleviation of aluminum-toxicity in Citrus grandis seedlings. Ecotoxicology and environmental safety, 120, 2015, p. 349–359.

[21] MAHJBI, A., BARAKET, G., OUESLATI, A. and SALHI-HANNACHI, A. Start Codon Targeted (SCoT) markers provide new insights into the genetic diversity analysis and characterization of Tunisian Citrus species. Biochemical Systematics and Ecology, 61, 2015, p. 390-398.

[22] WANG, J., HAO, H., LIU, R., MA, Q., CHENG, Y. and DENG, X. Comparative analysis of surface wax in mature fruits between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis*) from the perspective of crystal morphology, chemical composition and key gene expression. Food Chemistry, 153, 2014, p. 177–185.

[23] BASTOS, P.M.D., RAYNAUD, M., VENANCIO, A.L., BASSANEZI, R.B. and REDON, R. Identification of citrus varieties using laser-induced fluorescence spectroscopy (LIFS). Computers and Electronics in Agriculture, 95, 2013, p. 11–18.

[24] HALL, D.G., JUSTIN, G. and STEPHEN, L.L. Further investigations on colonization of *Poncirus trifoliata* by the Asian citrus psyllid. Crop Protection, 72, 2015, p. 112-118.

[25] DISTEFANO, G., CIRILLI, M., THOMAS, B. and MULEO, R. Ectopic expression of Arabidopsis phytochrome B in Troyer citrange affects photosynthesis and plant morphology. Scientia Horticulturae, 159, 2013, p. 1–7.

[26] ALBRECHT, U., GREG, M.C. and BOWMAN, K.D. Influence of rootstock variety on Huanglongbing disease development in field-grown sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). Scientia Horticulturae, 138, 2012, p. 210–220.

[27] RODRIGUEZ, M.J., ALQUÉZAR, B., ALÓS, E. and ZACARÍAS, L. Biochemical bases and molecular regulation of pigmentation in the peel of Citrus fruit. Scientia Horticulturae, 163, 2013, p. 46–62.

ISOTERMAS E CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORÇÃO DA ÁGUA DO AMIDO DE QUINOA

ISOTERMAS Y CALOR ISOSTÉRICO DE ADSORCIÓN DE AGUA DE ALMIDÓN DE QUINUA

WATER ADSORPTION ISOTHERMS AND ISOSTERIC HEAT OF QUINOA STARCH

AUGUSTO PUMACAHUA-RAMOS[1,1], KATHERINE MILUSCA LIMAYLLA-GUERRERO[2], JAVIER TELIS-ROMERO[3], JOSÉ FRANSCISO LOPES FILHO[3]

RESUMO

A quinoa possui mais de 60% de amido, sendo uma alternativa de extração e comercialização. Para isto é necessário conhecer o comportamento do amido frente à temperatura e umidade relativa do ar. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as isotermas de adsorção do amido de quinoa em cinco temperaturas (20, 30, 40, 50 e 60ºC) e dez atividades de água (0,036 a 0,907). Os pontos experimentais foram ajustados aos modelos matemáticos GAB, Oswin, Henderson, Peleg e Ferro-Foltan. Foram determinadas as energias de ativação da adsorção da água pelas constantes do modelo GAB e o calor isostérico pelo modelo de Peleg. As isotermas mostraram ser do tipo II na classificação de Brunauer. Os teores de água da monocamada (X_m) determinados pelo modelo de GAB variaram de 7,90% a 10,38% base seca (b.s.) para temperaturas de 60 e 20°C e as energias de ativação obtidas pelas constantes X_m, C e K do modelo de GAB foram de 300; 160 e 6 kJ/kg, respectivamente. O calor isostérico de adsorção foi de 3732 kJ/kg para umidade de equilíbrio de 0,5% b.s. e diminuiu com o aumento da umidade até valor próximo ao calor latente de vaporização da água pura a 36% b.s. As propriedades determinadas são características de amidos com elevado teor de amilopectina.

Recibido para evaluación: 17 de Julio de 2015. **Aprobado para publicación:** 25 de Julio de 2016.

1 Universidad Peruana Unión. EP. Ingeniería en Industrias Alimentarias. Dr. Ingeniería de Alimentos. Juliaca, Perú.
2 Programa Nacional de Alimentación Escolar Qali Warma. Ing. de Alimentos. Puno, Perú.
3 Universidade Estadual Paulista (UNESP).Instituto de Biociencias, Letras y Ciencias Exatas (IBILCE). Dpto. Engenharia de Alimentos. Dr. Engenharia de Alimentos. São José do Rio Preto, SP. Brasil.

Correspondencia: augusto.pumacahua@upeu.pe

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (95-104) Enero _ Junio 2017

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate adsorption isotherms and isosteric heats of quinoa's starch at five temperatures (20, 30, 40, 50 and 60°C) and ten water activities (0,036 to 0,907). The experimental values were fitted to mathematical models of GAB, Oswin, Henderson, Peleg and Ferro-Foltan. Activation energies for water adsorption were determined by the constants of GAB model and the isosteric heat by Peleg model. The isotherms exhibited type II in the classification of Brunauer. Monolayer moisture contents (X_m) obtained by GAB model ranged from 10,38 to 7,90% in dry basis (d.b.) at temperatures of 20 to 60°C, respectively. Activation energies determined using constants X_m, C and K of GAB model were 300, 160 and 6 kJ/kg, respectively. The isosteric heat of adsorption was 3732 kJ/kg at moisture equilibrium of 0,5% d.b. The value decreased next to latent heat of vaporization of pure water as moisture increased up to 36% d.b. The results obtained are characteristic of starches with high amylopectin content.

RESUMEN

La quinua posee más de 60% de almidón, siendo una alternativa de extracción y comercialización. Para esto es necesario conocer el comportamiento del almidón frente a la temperatura y la humedad relativa del aire. El objetivo de esta investigación fue evaluar las isotermas de adsorción del almidón de quinua en cinco temperaturas (20, 30, 40, 50 y 60ºC) y diez actividades de agua (0,036 a 0,907). Los puntos experimentales fueron ajustados a los modelos matemáticos GAB, Oswin, Henderson, Peleg y Ferro-Foltan. Fueron determinados las energías de activación da la adsorción del agua por las constantes del modelo GAB y el calor isostérico por el modelo Peleg. Las isotermas mostraron ser del tipo II según la clasificación de Brunauer. Los contenidos de agua de la monocapa (X_m) determinados por el modelo GAB variaron de 7,90% a 10,38% base seca (b.s.) para temperaturas de 60 y 20°C y las energías de activación obtenidas por las constantes X_m, C y K del modelo GAB fueron de 300, 160 y 6 kJ/kg, respectivamente. El calor isostérico de adsorción fue de 3732 kJ/kg para la humidad de equilibrio de 0,5% b.s. y disminuyó con el aumento de la humedad hasta un valor próximo al calor latente de vaporización del agua pura a 36% b.s. Las propiedades determinadas son característicos de almidones con elevado contenido de amilopectina.

PALAVRAS-CHAVE:
Chenopodium quinoa Willd, Amido de quinoa, Isotermas de adsorção, Calor isostérico de adsorção.

KEY WORDS:
Chenopodium quinoa Willd, Quinoa starch, Isoterms sorption, Sorption isosteric heat.

PALABRAS-CLAVE:
Chenopodium quinoa Willd, Almidón de quinua, Isotermas de adsorción, Calor isostérico de adsorción.

INTRODUÇÃO

A quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) é um grão andino com características de grãos de cereais que possui elevado teor de amido (em média 60%). O Peru é um dos principais produtores e exportadores do grão cujos valores somaram U$ 142 milhões no ano de 2015, com exportações para os Estados Unidos, Holanda, Alemanha e Austrália [1]. Não existem dados sobre a exportação de derivados deste grão na forma de amido, pois a principal forma de comercialização é como grãos inteiros. Para agregar valor ao produto e disponibilizar matérias primas mais elaboradas, há necessi-

dade de separar os componentes do grão de maior interesse como o amido e o germe.

O amido é o principal componente do grão de quinoa e pode ser extraído por processos de moagem semelhante à moagem úmida do milho. Segundo Pumacahua-Ramos [2], a extração do amido via moagem úmida, mostrou rendimento médio de extração em torno de 60% referente ao grão inteiro. O diâmetro médio do grânulo está em torno de 1 μm, que é 20 vezes menor que do amido de mandioca e 10 vezes menor que do amido de milho. Também possui baixo teor de amilose (< 12%) e elevado teor de amilopectina que apresenta característica cristalina de interesse para indústrias papeleira, alimentícia, têxtil, e outras [2].

A determinação das atividades de água em função do teor de umidade de equilíbrio (X_e) expressas em porcentagem base seca (% b.s.) do amido é de grande importância para sua conservação. Estas propriedades podem ser estudadas determinando experimentalmente as isotermas de adsorção ou de desorção. Na conservação de alimentos secos quatro fatores são importantes: a atividade de água (a_w), o teor de umidade de equilíbrio (X_e), a umidade relativa e a temperatura do ambiente. A a_w é uma característica principal, pois dependendo deste valor no alimento pode-se determinar a sua vida de prateleira. Sabe-se que em alimentos com a_w acima de 0,67 os fungos se desenvolvem levando o alimento à deterioração. Curvas isotermas de sorção determinam a dependência da a_w com a X_e que podem ser representadas mediante diversos modelos matemáticos. Estudos desta dependência foram realizados para diversos alimentos secos.

Pelo estudo da termodinâmica dos alimentos, existem três tipos de água nos alimentos com seus respectivos calores de sorção que estão relacionados às a_w. A água absorvida, a água da monocamada e a água da multicamada. Se esta água se relaciona com a temperatura pode ser determinada a energia de ativação (E_a) correspondente, sendo que a E_a da absorção deve ser considerado um parâmetro independente ao processo de difusão-sorção. Todos estes calores podem ser determinados pelas constantes do modelo de GAB [10].

O fenômeno de sorção pode ser explicado por uma equação de estado denominada calor isostérico de sorção. Esta propriedade termodinâmica pode ser determinada em função das atividades de água dos alimentos em pelo menos três temperaturas. O calor isostérico (Q_s) representa a energia necessária para romper a ligação da água com o substrato do alimento. Atualmente duas equações termodinâmicas são utilizadas para determinar seu valor [14].

Dada à importância do amido de quinoa na industrialização dos grãos e sua conservação, os objetivos desta pesquisa foram: obter e avaliar as isotermas de adsorção da água no amido de quinoa extraído mediante moagem úmida, determinar os modelos que melhor representem os dados experimentais e determinar o calor isostérico de adsorção do processo.

MÉTODO

Grãos de quinoa da variedade *Blanca de Juli* foram hidratadas em solução de 0,55% de ácido láctico e 0,2% de SO_2 durante 4 h. Após, os grãos passaram por processos de trituração, retirada do germe, moagem fina, peneiramento, decantação e secagem do amido. O amido recuperado foi moído, peneirado em peneira de 80 mesh e colocado em saco plástico sob refrigeração. As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl com fator de correção de 6,25, as gorduras pelo método Bligh-Dyer e a porcentagem de amilose segundo o método descrito por Mahmood *et al*. [15].

Na construção das isotermas utilizou-se o método estático gravimétrico [10]. Foram preparadas soluções saturadas de 10 sais diferentes e colocadas em recipientes com tampa de rosca com suporte interno para colocação das amostras. As soluções saturadas (Tabela 1) proporcionaram a_w entre 0,036 a 0,907 para as cinco temperaturas (20, 30, 40, 50 e 60°C). As temperaturas foram equilibradas mediante câmara incubadora tipo BOD (Modelo TE-391, TECNAL, Brasil). Aproximadamente 1 g de amido foi colocado no interior do recipiente. A umidade de equilíbrio (X_e) foi determinada pelo método padrão de estufa (105°C por 24 h) quando a amostra não apresentou variação da massa. Os teores de umidade foram expressos em porcentagem de base seca (%b.s.).

Para o ajuste aos dados experimentais os seguintes modelos matemáticos foram utilizados: O modelo de Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) [16] (Eq. 1) e suas constantes dependentes da temperatura (Eqs. 2, 3 e 4) [10, 11].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (95-104) Enero _ Junio 2017

Tabela 1. Valores de atividades de água das diferentes soluções saturadas de sais.

Soluções saturadas de sais	Atividade de água (aw)				
	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C
Na OH	0,089	0,075	0,062	0,049	0,036
LiCl	0,113	0,112	0,111	0,110	0,109
$KC^2H^3O^2$	0,246	0,223	0,206	0,189	0,175
$MgCl^2$	0,331	0,324	0,316	0,305	0,293
K^2CO^3	0,446	0,419	0,400	0,382	0,363
$Mg(NO^3)^2$	0,544	0,514	0,484	0,444	0,408
$NaNO^2$	0,660	0,627	0,615	0,599	0,590
NaCl	0,760	0,756	0,744	0,742	0,741
KCl	0,851	0,836	0,823	0,812	0,803
$BaCl^2$	0,907	0,900	0,893	0,884	0,876

$$X_e = \frac{X_m\ C\ K\ A_w}{(1-K\ A_w)(1-K\ A_w+C\ K\ A_w)} \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$X_m = X_0 \exp\left(\frac{\Delta X_m}{RT}\right) \quad \text{(Eq. 2)}$$

$$C = C_0 \exp\left(\frac{H_m - H_n}{RT}\right) \quad \text{(Eq. 3)}$$

$$K = K_0 \exp\left(\frac{H_L - H_n}{RT}\right) \quad \text{(Eq. 4)}$$

Oswin [17]

$$X_e = A\left(\frac{a_w}{1-a_w}\right)^B \quad \text{(Eq. 5)}$$

Henderson [18]

$$X_e = \left(\frac{-\ln(1-a_w)}{A}\right)^{1/B} \quad \text{(Eq. 6)}$$

Peleg [19]

$$X_e = K_1 a_w^{n_1} + K_2 a_w^{n_2} \quad \text{(Eq. 7)}$$

Ferro-Foltan [20]

$$X_e = \left(\frac{A}{\ln(B/a_w)}\right)^{1/C} \quad \text{(Eq. 8)}$$

Onde, X_e: teor de umidade de equilíbrio (%); X_m, C e K: constantes do modelo GAB; A, B, C, K_1, K_2, n_1 e n_2 constantes dos modelos (Eqs, 5, 6, 7 e 8); R é a constante geral dos gases (0,462 kJ/kg K) e T é a temperatura absoluta.

No modelo de GAB, X_m representa o teor de água na monocamada, C a constante de Guggenheim referente à diferença da entalpia de sorção da monocamada e multicamada, K é o fator de correção referente à entalpia de sorção da multicamada com relação ao da água pura. As constantes ΔX_m, H_m, H_n e H_L (kJ/kg) são as energias de ativação para atingir a umidade de equilíbrio X_e, os calores de sorção da água da monocamada, multicamada e a entalpia de vaporização da água pura, respectivamente [10, 11].

O calor isostérico de sorção, Q_S, (Eq. 9) é a soma do calor isostérico líquido de sorção (q_S) e a entalpia de vaporização da água pura (H_L) na temperatura média aritmética:

$$Q_S = q_S + H_L \quad \text{(Eq. 9)}$$

O calor isostérico líquido de sorção, q_s, foi calculado pela Eq. 10 [14, 21]:

$$q_s = R\left(\frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1}\right)\ln\left(\frac{a_{w2}}{a_{w1}}\right) \quad \text{(Eq. 10)}$$

O modelo de Peleg foi utilizado para determinar as atividades de água da Eq. 10.

Adicionalmente foram determinadas a variação da energia livre de Gibbs e a variação da entropia mediante as equações:

$$\Delta G = RTln(a_w) \quad \text{(Eq. 11)}$$

$$\Delta S = \frac{Q_s - \Delta G}{T} \quad \text{(Eq. 12)}$$

em que ΔG, é a energia livre de Gibbs (kJ/kg) e ΔS, a entropia de adsorção (kJ/kg K).

A fim de obter um modelo que expresse o calor isostérico de adsorção em função da X_e, as seguintes equações foram testadas [21 – 23]:

$$Q_s = q_0 \exp\left(-\frac{X_e}{X_0}\right) + H_L \quad \text{(Eq. 13)}$$

$$Q_s = q_0 \exp(-K_1 X_e) X_e^{-K_2} + H_L \quad \text{(Eq. 14)}$$

$$Q_s = q_0 X_e^{-K_1} + H_L \quad \text{(Eq. 15)}$$

em que q_0 é o calor isostérico de adsorção da monocamada, X_0 o teor de umidade inicial do amido (%), K_1 e K_2 são constantes.

Em relação aos dados experimentais, os valores das umidades de equilíbrio X_e e os calores isostéricos determinados pelos modelos matemáticos foram avaliados pelo coeficiente de determinação (R^2) e pela Média Absoluta percentual do Erro (MA%E) definido como:

$$MA\%E = \frac{100}{N} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{|A_e - A_C|}{A_e} \quad \text{(Eq. 16)}$$

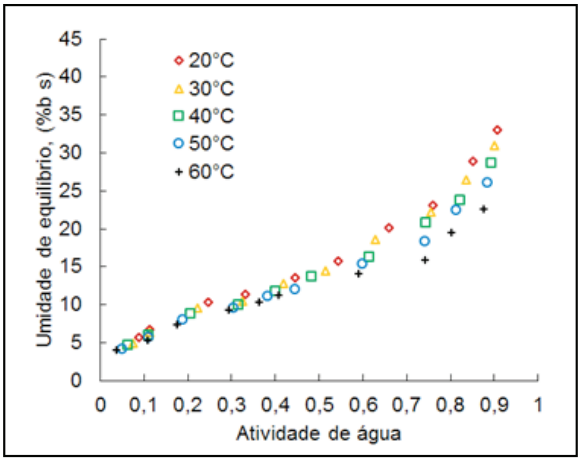
em que N; número de determinações, A; o parâmetro X_e ou Q_s, os sub índices, e, C; significam experimental e calculado.

RESULTADOS

As análises químicas mostraram que o amido de quinoa contém 3,41 % (±0,40%) de proteína, 0,80% (±0,14%) de gordura e 10,93% (±1,23%) de amilose. A Figura 1 apresenta as umidades de equilíbrio X_e em função da a_w nas 5 temperaturas, como resultado da parte experimental do estudo de adsorção pelo método estático gravimétrico.

Verifica-se que na faixa de a_w entre 0,59 a 0,66 que a X_e variou de 20,13 a 14,10% nas quatro temperaturas. Esses valores representam teores de umidade de segurança para inibir o desenvolvimento microbiano. Umidades de equilíbrio abaixo de 0,65 de a_w são seguros contra o crescimento de fungos por longos períodos de tempo. A 20°C e 0,6 de a_w, a farinha de *Eragrostis tef* apresentou 11% de umidade de equilíbrio [13], o amido de mandioca 10,5% [12], farinha de casca de laranja de 18% [10] e bagaço de mandioca de 13% [11]. Se considerarmos uma temperatura ambiente de 30°C e 0,6 de a_w o amido de quinoa não deverá ter mais que 17% de umidade para se manter seguro, porem X_e abaixo deste valor são recomendáveis. Conclui-se que o amido de quinoa apresenta-se com maior capacidade de absorção de água e maior estabilidade que os demais produtos em pó mencionados.

Figura 1. Isotermas de adsorção do amido de quinoa em cinco temperaturas.



Na Tabela 2 são apresentados os valores das constantes de ajuste dos modelos matemáticos, o coeficiente de determinação (R^2) e a média relativa do erro (MA%E) nas atividades de água de 0,03 até 0,91.

Observa-se que o modelo de Peleg descreve melhor os dados experimentais de adsorção do amido de quinoa na maioria das atividades de água testadas. A média do MA%E do modelo de Peleg nas 5 temperaturas foi de 4,07%, respectivamente. Os modelos de GAB, Oswin, Henderson e Ferro-Foltan ajustaram-se com médias entre 5,10 a 7,10%, respectivamente. Observou-se que as MA%E dos modelos diminuem quando comparados a partir de 0,18 de a_w. Verificou-se que todos os modelos testados podem ser utilizados satisfatoriamente para determinar X_e ou a_w do amido de quinoa em baixas a_w. Os valores da MA%E desta pesquisa foram próximos ou melhores que de outros amidos, como o de ahipa e pinhão [21, 24].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (95-104) Enero _ Junio 2017

Tabela 2. Constantes dos modelos de ajuste.

Modelo	Constante	20°C	30°C	40°C	50°C	60°C	Média
GAB	Xm	10,380	9,700	9,000	8,600	7,900	-
	C	16,170	15,500	15,000	14,500	14,000	-
	K	0,777	0,778	0,779	0,780	0,781	-
	R^2	0,999	0,998	0,998	0,997	0,989	-
	MA%E	3,746	2,591	3,444	5,740	11,898	5,484
OSWIN	A	15,194	14,303	13,445	12,723	11,912	-
	B	0,362	0,352	0,347	0,337	0,323	-
	R^2	0,995	0,995	0,997	0,997	0,991	-
	MA%E	4,361	5,674	5,114	5,177	5,182	5,101
HENDERSON	K	4,70x10-3	4,6 x10-3	4,43 x10-3	4,26 x10-3	4,13 x10-3	-
	N	1,794	1,862	1,892	1,935	2,005	-
	R^2	0,990	0,992	0,991	0,989	0,988	-
	MA%E	5,803	4,559	4,956	5,387	5,076	5,156
PELEG	K1	19,971	19,859	19,758	18,933	17,669	-
	n1	0,478	0,495	0,517	0,528	0,546	-
	K2	22,885	21,435	21,337	21,222	20,258	-
	n2	4,577	5,296	6,994	7,766	8,220	-
	R^2	0,998	0,997	0,996	0,995	0,995	-
	MA%E	3,791	4,088	3,494	3,564	5,399	4,067
FERRO-FOLTAN	A	60,000	56,000	52,000	50,000	48,000	-
	B	1,133	1,158	1,161	1,171	1,240	-
	C	1,597	1,573	1,581	1,589	1,581	-
	R^2	0,995	0,994	0,995	0,993	0,984	-
	MA%E	5,241	7,431	1,342	7,211	8,322	5,909

O modelo de GAB fornece dados de calores de adsorção dos alimentos quando suas constantes mostram dependência com a temperatura. As constantes do modelo de GAB (X_m, C e K) mostraram essa dependência. A X_m variou entre 10,380% para 20°C até 7,900% para 60°C. A constante C diminuiu de 16,17 para 14,00 e a constante K aumentou de 0,770 até 0,781. Com esses valores das constantes, as curvas apresentaram formas sigmóides, típicas de isotermas tipo II de Brunauer, pois $0 < K \leq 1$ e $C \geq 2$ [25]. Doporto *et al*. [24] fizeram estudos de isotermas de amido de casava nas temperaturas de 10, 20 e 30°C, determinando as constantes X_m (11,6 a 7,2%), C (26,2 a 10,3) e K (0,71 a 0,8).

Como as constantes do modelo de GAB mostraram dependência com a temperatura, os calores envolvidos no processo de adsorção foram determinados (Eqs. 2, 3 e 4) e apresentados na Tabela 3.

Pelos dados da Tabela 3 a energia de ativação para o teor de água da monocamada (ΔX_m) é ligeiramente maior que o valor para o amido com elevado teor de amilopectina e menor que nos amidos de mandioca e pinhão. O calor da monocamada, H_c, de 160 kJ/kg é ligeiramente superior ao do amido de mandioca e inferior aos demais amidos. O calor da multicamada, H_K, de 6 kJ/kg é ligeiramente superior ao amido com alto teor de amilopectina e inferior aos demais amidos. Como era de se esperar, o calor de adsorção da monocamada é maior que o da multicamada, confirmando que a ligação das moléculas de água são mais fortes na monocamada.

Os dados experimentais das umidades de equilíbrio X_e foram ajustados pelo modelo de Peleg e apresentados na Figura 2. Este modelo apresenta um bom ajuste na média das atividades de água a 20, 30, 40, 50 e 60 °C.

Tabela 3. Energias de ativação pelas constantes do modelo de GAB para o amido de quinoa e outros amidos.

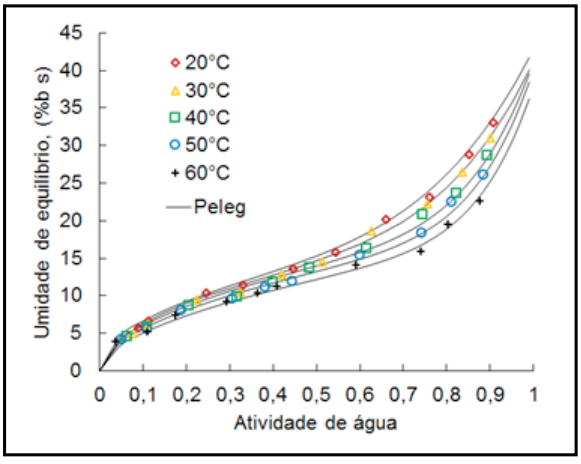
Amidos	Intervalo	ΔXm	HC	HK	Fonte
	°C	kJ/kg	kJ/kg	kJ/kg	
Quinoa	20 – 60	300	160	6	Presente trabalho
R^2		0,992	0,999	0,998	
Amido com alto teor de amilopectina	30 – 60	260	1259	2	[26]
Mandioca	5 – 45	399	157	41	[27]
Pinhão	10 – 40	525	2073	46	[21]

Para a determinação das propriedades termodinâmicas da água utilizou-se os resultados obtidos das a_w e das umidades de equilíbrio X_e em pelo menos três temperaturas. Utilizou-se o modelo de Peleg (Eq. 7), devido à melhor média de ajuste dos dados experimentais ($R^2 \geq 0,995$ e

MA%E = 4,067, para determinar os valores de X_e entre 0,5 a 37%, isso, mediante iteração por meio da ferramenta Solver© do programa Excel© do Windows 7©, com um valor inicial arbitrário. Com as a_w determinadas nas temperaturas de 20 e 60°C determinou-se o calor isostérico de adsorção (Eqs. 13, 14 e 15).

Todos os modelos empíricos que relacionam o calor isostérico com X_e ajustaram satisfatoriamente com $R^2 > 0,952$ e MS%E < 1%, sendo os modelos da Eqs. 12 e 13 os que apresentaram melhores resultados. Com as constantes dos modelos das Eqs. 13 a 15 as seguintes equações permitem determinar o calor isostérico de adsorção em função das X_e do amido:

Figura 2. Isotermas de adsorção da agua no amido de quinoa experimentais e ajustadas pelo modelo Peleg .



$$Q_s = 1074 \exp\left(-\frac{X_e}{13,1}\right) + 2407 \; R^2 = 0,952; \text{MA\%E} = 1,0\% \quad \text{(Eq. 17)}$$

$$Q_s = 1190 \exp(-0,053X_e)X_e^{-0,194} + 2407 \; R^2 = 0,996; \text{MA\%E} = 0,6\% \quad \text{(Eq. 18)}$$

$$Q_s = 3622 \, X_e^{-0,106} + 2407 \; R^2 = 0,988; \text{MA\%E} = 0,8\% \quad \text{(Eq. 19)}$$

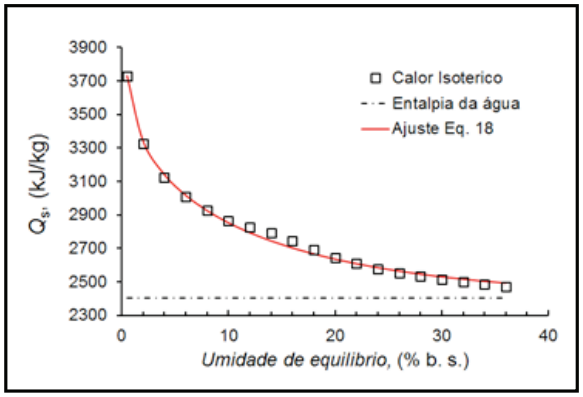
A Eq. 16 foi a que melhor se ajustou aos dados, como mostrado na Figura 2.

Pela Eq. 18, nas X_e de 0,5; 5; 10; 20 e 30% o calor isostérico de adsorção foi de 3731,7; 3050; 2867,1; 2646,6 e 2515,3 kJ/kg, respectivamente. Este calor diminui até próximo ao valor do calor latente de vaporização da água pura conforme a umidade de equilíbrio aumenta. Observa-se um incremento notável quando o X_e é próximo de 0%. Segundo Tsami [22] a água nos alimentos com X_e entre 2 a 8% se encontra fortemente ligada nos sítios ativos da camada monomolecular. Para X_e maiores que 10% consideram-se ligações na multicamada com menor força e para X_e maiores que 25% considera-se como água livre. Observa-se na Figura 3 que para X_e menores que 10% o calor isostérico aumenta exponencialmente e para altas X_e os calores descem a níveis do calor latente de vaporização, H_L. Resultados semelhantes foram reportados para alimentos, como arroz com casca, farinha de babaçu, bagaço de mandioca e D-limoneno, sementes de pimenta [5, 9, 11, 28, 29].

Quanto ao valor do calor isostérico, pesquisas apresentaram resultados distintos ao do amido de quinoa. Amido de pinhão a 10% teve 3222 kJ/kg de Q_S [21]. O Q_S da farinha de mandioca a 5% e X_e foi de 6611

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (95-104) Enero _ Junio 2017

Figura 3. Calores isostéricos de adsorção de água experimental e calculado pela Eq. 18 no amido de quinoa.



kJ/kg e a 35% de 2500 kJ/kg [30]. O Q_s da farinha de Ahipa a 10% foi de 5000 kJ/kg [24]. Portanto verifica-se que o amido de quinoa da variedade *Blanca de Juli* apresentou menor valor de calor isostérico de adsorção que os outros amidos mencionados. Segundo Pumacahua-Ramos [2], os grânulos do amido de quinoa da variedade *Blanca de Juli* possuem diâmetros de aproximadamente 1,3 μm, muito menores que os amidos comerciais. A adsorção de água pelos grânulos pequenos é mais fácil comparada ao de maior tamanho. Isto pode explicar o menor valor do calor isostérico de adsorção.

Na Figura 3 e 4, estão representados o comportamento da energia livre de Gibbs e da entropia, em função da umidade de equilíbrio.

Como o calor isostérico de sorção diminui quando aumenta a temperatura, e a entropia aumenta, quando aumenta a temperatura, a energia livre de Gibbs é negativa ($\Delta G<0$) (Figura 4). Da mesma forma, a ΔG tende ao equilíbrio ($\Delta G = 0$) ao aumentar a umidade de equilíbrio. Sabe-se que a maior agua livre, menores os sítios ativos de adsorção da água. Estes resultados indicam que o processo de adsorção de água pelo amido de quinoa é espontâneo. A influência da temperatura nos fenômenos de adsorção também pode ser observada nas Figuras 4 e 5. Ao aumentar a temperatura ΔG e ΔS diminuem, pois as moléculas de água em altas temperaturas possuem maiores energias na adsorção. Resultados semelhantes foram reportados para o ΔG do D-limoneno em pó [29], para o ΔS do bagaço de mandioca e sementes de nopal [7, 11].

Figura 4. Mudanças da energia livre de Gibbs da água no amido de quinoa em função da umidade de equilíbrio.

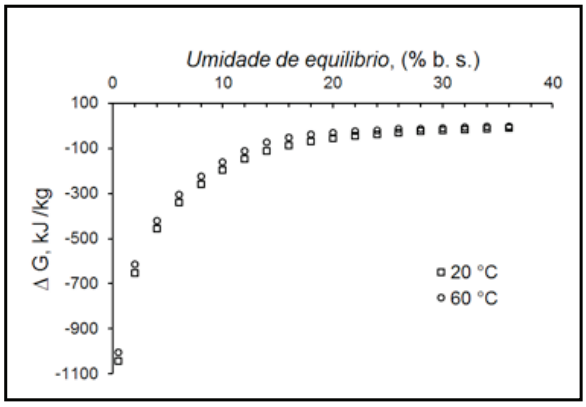
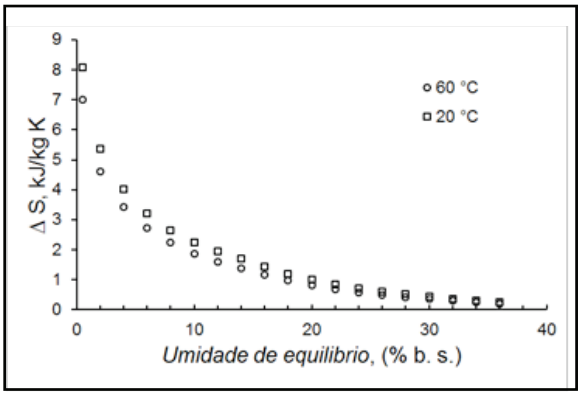


Figura 5. Mudanças da entropia da água do amido de quinoa em função da umidade de equilíbrio.



CONCLUSÕES

O amido de quinoa pode ser conservado em segurança com relação ao desenvolvimento de fungos desde que possua umidade de equilíbrio entre 13,7 a 17,9% nas temperaturas de 60 a 20°C, respectivamente. Entretanto estudos específicos de microbiologia devem ser conduzidos.

Os modelos matemáticos para as isotermas ajustaram-se satisfatoriamente aos dados experimentais, porém o modelo de Peleg teve o melhor ajuste médio. Os ajustes mostraram-se melhores nas temperaturas de 20, 30 e 40°C do que para as temperaturas de 50 e 60°C.

Pelas constantes do modelo de GAB determinaram-se os calores envolvidos no processo de adsorção. Estes calores foram menores comparados a outros amidos e farinhas.

O calor isostérico, a energia livre de Gibbs e a entropia diferencial diminuiram à medida que a X_e e a temperatura aumentaram. Da mesma forma os três modelos matemáticos ajustaram muito bem os valores dos calores isostéricos de sorção experimentais.

Novas pesquisas devem ser feitas com amidos de outras variedades de quinoa, pois nos países produtores existem muitas outras variedades.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Peruana Unión – Juliaca - Peru e ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – SP, Brasil pelo apoio financeiro.

REFERENCIAS

[1] AGRODATA. Exportaciones de quinua peruana [online]. 2014. Disponible: http://www.agrodata-peru.com/category/quinua-exportacion. [Citado 28 de abril del 2014].

[2] PUMACAHUA-RAMOS, A. Extração e caracterização de amido de quinoa, cañihua e Mirabilis jalapa [Tesis doctoral]. São Paulo (Brasil): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2014, 126 p.

[3] SORMOLI, M. and LANGRISH, T. Moisture sorption isotherms and net isosteric heat of sorption for spray dried pure orange juice powder. Food Science Technology, 62, 2015, p. 875–882.

[4] LI, Y., WANG, X., JIANG, P. and LI, X. Sorption equilibrium moisture and isosteric heat of adsorption of Chinese dried wheat noodles. Journal of Stored Products Research, 67, 2016, p. 19–27.

[5] YOGENDRARAJAH, P. SAMAPUNDO, S. DEVLIEGHERE, F., DE SAEGER, S. and DE MEULENAER, B. Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of whole black pepercorns (*Piper nigrum* L.). LWT - Food Science and Technology, 64(1), 2015, p. 177–188.

[6] POHNDORF, R.S., CADAVAL, T.R.S. and PINTO, L.A. A. Kinetics and thermodynamics adsorption of carotenoids and chlorophylls in rice bran oil bleaching. Journal of Food Engineering, 185, 2016, p. 9–16.

[7] HASSINI, L., BETTAIEB, E., DESMORIEUX, H., TORRES, S.S. and TOUIL, A. Desorption isotherms and thermodynamic properties of prickly pear seeds. Industrial Crops and Products, 67, 2015, p. 457–465.

[8] MARTÍNEZ-LAS HERAS, R., HEREDIA, A., CASTELLÓ, M.L. and ANDRÉS, A. Moisture sorption isotherms and isosteric heat of sorption of dry persimmon leaves. Food Bioscience, 7, 2014, p. 88–94.

[9] OLIVEIRA, G.S., COSTA, J.M.C. and AFONSO, M.R.A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 18(10), 2014, p. 1059–1064.

[10] VILLA-VÉLEZ, H.A., DE SOUZA, S.J.F., PUMACAUA-RAMOS, A., POLACHINI, T. and TELIS-ROMERO, J. Thermodynamic properties of water adsorption from orange peels. Journal Bioenergy Food Science, 2(2), 2015, p. 72–81.

[11] POLACHINI, T.C., BETIOL, L.F.L., LOPES-FILHO, J.F. and TELIS-ROMERO, J. Water adsorption isotherms and thermodynamic properties of cassava bagasse. Thermochimica Acta, 632, 2016, p. 79–85.

[12] CHISTÉ, R.C., CARDOSO, J.M., DA SILVA, D.A. and PENA, S. Hygroscopic behaviour of cassava flour from dry and water groups. Ciência Rural, 45(8), 2015, p. 1515–1521.

[13] ABEBE, W. and RONDA, F. Flowability, moisture sorption and thermal properties of tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter] grain flours. Journal Cereal Science, 63, 2015, p. 14–20.

[14] CHEN, C. Obtaining the isosteric sorption heat directly by sorption isotherm equations. Journal of Food Engineering, 74(2), 2006, p. 178–185.

[15] MAHMOOD, T. TURNERA, M.A. and STODDARDB, F.L. Comparison of Methods for Colorimetric Amylose Determination in Cereal Grains. Starch/Stärke, 59, 2007, p. 357–365.

[16] VAN DEN BERG, C. and BRUIN, S. Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects, in Water Activity: Influences on Food Quality. New York (USA): Academic Press, 1981, p. 1– 61.

[17] OSWIN, C.R. The kinetics of package life III. The isotherm. Journal of Chemical Industry, 65, 1945, p. 419–421.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (95-104) Enero _ Junio 2017

[18] HENDERSON, S.M. A basic concept of equilibrium moisture. Agricultural Engineering, 33, 1952, p. 29–32.
[19] PELEG, M. Assessment of a semi-empirical four parameter general model for sigmoid moisture sorption isotherms. Journal of Food Process Engineering, 16, 1993, p. 21–37.
[20] FERRO-FONTAN, C., CHIRIFE, J., SANCHO, E. and IGLESIAS, H.A. Analysis of a model for water sorption phenomena in foods. Journal of Food Science, 47, 1982, p. 1590–1594.
[21] THYS, R.C.S., NOREÑA, C.P.Z., MARCZAK, L.D.F., AIRES, A.G. and CLADERA-OLIVERA, F. Adsorption isotherms of pinhão (*Araucaria angustifolia* Seeds) starch and thermodynamic analysis. Journal of Food Engineering, 100(3), 2010, p. 468–473.
[22] TSAMI, E. Heat of sorption of water in dried fruits. International Journal of Food Science and Technology, 25(3), 1991, p. 350–359.
[23] MULET, A., SANJUÁN, R. and BON, J. Sorption Isosteric Heat Determination by Thermal Analysis and Sorption Isotherms. Journal of Food Science, 64(1), 1999, p. 64–68.
[24] DOPORTO, M.C., DINI, C., MUGRIDGE, A., VIÑA, S.Z. and GARCÍA, M.A. Physicochemical, thermal and sorption properties of nutritionally differentiated flours and starches. Journal of Food Engineering, 113(4), 2012, p. 569–576.
[25] BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical aproach. Journal of Food Engineering, 65(4), 2004, p. 489–495.
[26] AL-MUHTASEB, A.H., MCMINN, W.A.M. and MAGEE, T.R.A. Water sorption isotherms of starch powders. Journal of Food Engineering, 61(3), 2004, p. 297–307.
[27] SANDOVAL, A.J. and BARREIRO, J.A. Moisture adsorption isotherms of amorphous cassava starch at different temperatures determined by a dynamic vapor sorption technique. Revista de la Facultad de Agronomia (LUZ), 29, 2012, p. 475–493.
[28] MATOS, E.N.V., SAMPAIO, R.M. and DO L. DE PAULA, M. Determinação das isotermas de adsorção e do calor de sorção de farinha de babaçu comercial. Cadernos de Pesquisa, 21, 2014, p. 1–9.
[29] RUBIANO, K. y ASOCIADO, P. Evaluación de las propiedades termodinámicas y térmicas del d-limoneno encapsulado. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 18(2), 2015, p. 425–434.
[30] AYALA-PONTE, A. Estimación de las isotermas de adsorción y del calor isostérico en harina de yuca, Biotecnología en el Sector agropecuario y agroindustrial, 9(1), 2011, p. 88–96.

MÉTODO DELPHI EN ESTUDIOS DE PROSPECTIVA TECNOLÓGICA: Una aproximación para calcular el número de expertos y aplicación del coeficiente de competencia experta "K"

DELPHI METHOD IN TECHNOLOGICAL FORESIGHT STUDIES: An approach to calculating the number of experts and the application of the competence coefficient "K" expert

MÉTODO DELPHI EM ESTUDOS DE PROSPECTIVA TECNOLÓGICA: Uma aproximação para calcular o número de expertos e aplicação do coeficiente de competência experta "K"

JHON WILDER ZARTHA - SOSSA[1], JUAN MANUEL MONTES - HINCAPIÉ[2],
IVAN DARIO TORO - JARAMILLO[3], RAUL HERNANDEZ - ZARTA[4],
HECTOR SAMUEL VILLADA – CASTILLO[5], JOSE LUIS HOYOS – CONCHA[6]

Recibido para evaluación: 13 de Julio de 2016. **Aprobado para publicación**: 14 de Diciembre de 2016.

1 Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de ingenierias. Msc. Gestión tecnológica. Medellin, Colombia.
2 Universidad de Medellín, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Ph.D. Proyectos de Innovación Tecnológica en la Ingeniería de Producto y Proceso. Medellin, Colombia.
3 Universidad de Medellín, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Ph.D. Filosofía. Medellin, Colombia.
4 Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de ingenierias. Esp. Gestión y Desarrollo Agroindustrial. Medellin, Colombia.
5 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ph.D. Ingeniería Con Enfasis En Alimentos. Popayán, Colombia.
6 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ph.D. Ingeniería Con Enfasis En Alimentos. Popayán, Colombia.

Correspondencia: jhon.zartha@upb.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (105-115) Enero _ Junio 2017

RESUMEN

Este artículo trata sobre el método Delphi, sus orígenes y características. El principal aspecto a abordar es el de proveer información para identificar el número adecuado de expertos en la elección de temas en las aplicaciones del método Delphi en prospectiva. Para este propósito un estudio Delphi fue evaluado en el periodo 2012-2015 en tecnologías prioritarias relacionadas con empaques biodegradables al año 2032. Sobre los resultados de este estudio la incidencia del número de expertos fue evaluada con 9, 15, 22 y 24 expertos. Los resultados muestran la existencia de un núcleo común de tecnologías que fueron prioritarias desde el análisis con 9 a 24 expertos; con relación al coeficiente de competencia experta "k" los resultados con los 16 expertos con coeficiente "k" mayor o igual a 0.8, en cuatro de los cinco grupos lograron porcentajes de acuerdo altos con relación al grupo medular de temas prioritarios.

PALABRAS CLAVE:
Estudios de futuro, Numero de participantes, Empaques biodegradables.

KEYWORDS:
Future studies, Number of participants, Biodegradable packaging.

PALAVRAS-CHAVE:
Estudos de futuro, Número de participantes, Embalagens biodegradáveis

ABSTRACT

This paper deals with the Delphi method, its origins and characteristics. The main aspect to address is to provide information to identify an adequate number of experts in the choice of topics in the applications of the Delphi method in foresight. For that purpose, one Delphi study was evaluated in the period 2012 - 2015 on priority technologies regarding biodegradable packaging in the year 2032. On the results of this study, the incidence of the number of experts was evaluated with 9, 15, 22 and 24 experts. The results highlighted the existence of common core of technologies that were priorities from analysis 9 to 24 experts; regarding the expert competence coefficient "k" the results with the 16 experts with a coefficient "k" greater than or equal to 0.8, in four of the five groups, achieved high agreement percentages in relation to the core group of priority topics.

RESUMO

Este articulo trata sobre o método Delphi, suas origines e características. O principal aspecto a estudar é o fornecedor de informação para identificar o número adequado de expertos na eleição de temas, tecnologias ou variáveis nas aplicações do método. Para isto, foram avaliados Um estudo Delphi no período 2012-2015 em aspectos e tecnologias prioritárias relacionadas com embalagens biodegradáveis ao ano 2032, A partir dos resultados obtidos, foi avaliada a incidência do número de expertos com 9, 15, 22 e 24 expertos. Os resultados mostram a existência de um núcleo comum de tecnologias que foram prioritárias desde a analises com 9 a 24 expertos com relação ao coeficiente de competência experta "K" os resultados com os 16 expertos com coeficiente "K" maior ou igual a 0.8, em quatro dos cinco grupos lograram percentagens de acordo altos com relação ao grupo medular de temas prioritários.

INTRODUCTION

This article is part of a PhD thesis related to the modified Delphi method as a driving force for innovation strategy in the framework of an innovation management model in productive sector organizations.

The main purpose is to provide evidence to establish an appropriate number of experts for application of the Delphi method. To this end, one Delphi study evaluated in the period 2012 - 2015 on priority issues and technologies in biodegradable packaging in the year 2032, the project is part of a component in a larger study on biodegradable packaging and was supported by the National Planning Department of Colombia, the general system of royalties, governor of Cauca and the University of Cauca.

Specifically what is sought is to provide inputs for decision making with the appropriate number of experts and if a small number of experts is enough to make a Delphi study. Additionally, this article presents an application of expert competence coefficient "k", its interpretation and the group's relationship with a higher coefficient "k" with the issues presented as results from the study with the total number of experts.

The article is divided into a variety of sections: Introduction, theoretical framework on the Delphi method, the modified Delphi and competence coefficient "k" expert, as well as the methodology, results, discussion and conclusions.

Theoretical frame

The Delphi method had its beginnings between 1940 and 1960 [1], according to [2] its origin is attributed to the RAND - Research and Development Corporation, in the late 40s, Santa Monica - United States. The method originated with a study of the Cold War American industrialists to identify potential targets and their vulnerability to Soviet ammunition [3], according to [4] the Delphi is a method that has been used in national technology foresight exercises, and began by being used by Japan in their five-year foresight.

The original method, instead of using the traditional approach to reaching consensus through open discussion, completely eliminates the activity of a committee, which reduces the influence of certain psychological factors such as persuasion, the unwillingness to abandon publicly expressed opinions and the contagion effect of the majority of opinion.

This technique replaces direct debate by a carefully designed program of sequential individual interrogations through interspersed information and feedback derived by consensus, calculated from previous rounds of questionnaires.

Comparison between applications of the Delphi Method

International applications have been made from the Delphi method in various sectors; presented below in Table 1, is the analysis of applications made by 14 authors of scientific publications:

Also, there have been other studies related, for example, opinions Delphi experts facing the assessment of factors related to supply chain companies in Taiwan [17], application in the framework a foresight project in the textile industry in Poland [18], Characteristics and functions for place brands [19], analysis of forest fires causes and their motivations in northern Algeria [20] a patient centered early warning system to prevent readmission after colorectal surgery [21] and identification the baseline food safety training practices for retail delis using the Delphi expert consensus method [22].

Other applications of the Delphi method can be found in innovation public policies. Such is the case of the OCDE studies regarding the "technology push" stimulus, meaning supply through R+D public investment and incentives to companies that are considered innovative [23]. Other studies can be found about a new focus of innovation management, approaching it from a more articulated manner that involves a variety of mechanisms for diffusion and ownership of knowledge in function to the impact on the rate, the course of innovation and the technical change [24] In the same line lies the study of [25] on demand based policies, where the result of these is affirmed, bowed to the context and an emphasis is made towards well-articulated objectives.

Various studies have been made in Colombia, the most recent ones are qualitative work related foresight studies in the construction sector, whose objective was to identify the future necessities of the human resources that will arise from the impact of technological and organizational tendencies. These tendencies will diffuse in the construction sector in Colombia in the next 5 to 10 years [26]. The research methodology proposed by a guide of clinical prevention, diagnostic and treatment

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (105-115) Enero _ Junio 2017

Table 1. Applications of the Delphi Method in diverse sectors.

Autor	Country or organization	Purpose	Number of Experts
[5]	Astrazéneca Foundation	A study which intends to anticipate the future of the pharmaceutical industry in Spain	67 and 65 respectively
[6]	Brigham Young University, Bournemouth University	The purpose is to introduce, analyze and explain Delphi and its evolution and applications in public relations	Duke (2009): 10 to 15, McKinnon et al. (2001): 7, Boynton (2006) and Watson (2008): 30
[7]	Bank of Finland	Financial market variables	10 experts were used, Citing Rowe and Wright (1999):10
[3]	Canada	Investigation project of Participative Action (IAP) in Canadian healthcare leadership.	First round with 39 experts.
[8]	Spain	Probiotics as treatment in vaginitis	123 experts
[9]	Spain	Information blocks that should have a future formative action on university TIC teaching.	First round with 68 and second round with 65
[10]	Finland	The study is about CO2 emissions in cargo transport by road in Finland	24 and 20 respectively
[11]	France	Establish a determination base on experts from the beginning until the end of influenza epidemics in France	57 answered the three rounds
[12]	France	Consensus for the diagnose of a typical “Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy”	32
[13]	Canada and the United States	The article provides a guide for the selection process of adequate experts on the Delphi study	Between 10 and 18 for each panel
[2]	Spain	Social science area.	Cites Cataluña study with 14 experts
[14]	Canada	Clinical criteria for the diagnose of the carpal tunnel syndrome.	14 and 12 respectively
[15]	United States	Decision making	10 a 15 respectively
[16]	United States	Leadership profiles of the NDP stages in USA companies	11 to 12 experts .

Source. Self Elaboration

of acute diarrhea in children under 5 years old is a critical analysis of evidence, related to the opinion of a group of experts [27]. The study proposed a guide for the performance of panels of experts on transferable risk assessment in projects linked to the public and private sectors [28].

In the table 1, it can be seen that there is no consensus on the number of experts who answer the Delphi rounds; some authors performed their studies with high values, such as: 30, 32, 37, 39, 57, 65, 67, 68 and 123 experts, while other authors have suitable experts as figures such as: 7, 9, 10,

11, 12, 14, 15, 18, 20 or 24. This type of gaps related to the number of experts continues, as even for some researchers there is no evidence that increasing the panel size will improve accuracy. Some authors argue that ranging from 5 to 20 people is sufficient [29].

Expert competence coefficient "K"

The calculation of the "expert competence coefficient " is made from the opinion rendered by an expert on a high level of knowledge about a research problem, as well as the sources that allow arguments on the established criteria [30].

The coefficient is obtained by applying the following formula: K = ½ (Kc + Ka), where: Kc = is the "coefficient of knowledge" or information that the expert on the subject or problem posed. It is calculated from the assessment made by the expert himself on a scale of 0 to 10, multiplied by 0,1.

Ka = this is called the "coefficient of argument" or foundation of expert opinion. It is obtained from assigning scores to a number of different sources of argument that could wield the expert. In Table 2, the scores are usually used for assessing the sources of arguments [30].

With the final values obtained experts are classified into three groups, if K is greater than 0,8, greater than or less than or equal to 1: then there is high influence from all sources, if K is greater than or equal to 0,7, or greater than or equal to 0,8: then there is no influence average from all sources, now, if K is greater than or equal to 0,5, or greater than or equal to 0,7 then there is little influence from all sources [19].

According to guidelines [19] experts with values less than 0,8 are not included in the study and therefore are rejected.

METHOD

Phase I

Were reviewed scientific articles based on scientific data, theses and specific bases in leading universities in the Delphi method. Also, patent databases and technical documents related to the method and the problem were identified to be treated in this case related to the number of experts who answer a round Delphi.

This aspect is important since several studies conducted in recent years have had the problem of achieving a large number of experts, and even the invitations are a number of approximately 100 experts, only a small percentage of these rounds were answered [32, 33, 34].

Quantities of experts were used in the cases presented in the papers established and some of the figures related to the lowest values were selected, in this case: 9, 15, 22 and the final number of experts. The quantity of 7 experts was not elected for analysis because this multiple number of values of the same mode theme, such as technology or variable is presented.

Phase II

One Delphi study in the period 2012-2015 was evaluated on issues, technologies and priorities variables in biodegradable packaging in 2032.

As for the choice of topics, technologies and priority, criteria variables were held constant, which consists in calculating mode, modal frequency and percentage of consensus on these data. The average percentage of agreement was determined for each group, based on this information, the following criteria was established:

Theme, technology or priority variable, consensus group above average and mode of 4 or 5, the scale was 0-5 where the order of priority was:

0 = No priority. 1 = Very Low. 2 = Low. 3 = Media. 4 = High. 5 = Very High. N = Do not know / No answer

Phase III

Percentages of common topics or technologies in each of the courts, in order to show whether the issues or technologies effectively remained constant or changed when the number of experts that were established was higher.

Phase IV

Expert coefficient competence "K" was calculated, which is considered a measure of the level of competence in a component panel of experts, and in this sense, can be useful to obtain the coefficient of competence proposed [31].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (105-115) Enero _ Junio 2017

Table 2: Rating of the argument sources for obtaining "Argument coefficient" (Ka)

Source of argument	Degree of influence of each of the sources in their criteria		
	A (High)	M (Middle)	B (Low)
Theoretical analyzes conducted by the expert	0,3	0,2	0,1
Experience obtained	0,5	0,4	0,2
Research work on the topic of colombian authors	0,05	0,05	0,05
Research work on the topic of foreign authors	0,05	0,05	0,05
Own Knowledge about the state of the problem abroad	0,05	0,05	0,05
Intuition Expert	0,05	0,05	0,05

Source. Cabero y Barroso (2013)

The methodology for calculating the coefficient comprises on calculating two coefficients: ka and kc, where kc is the "coefficient of knowledge" or owned expert information about the problem or issue raised; and a self-assessment on a scale of graphic seal (0-10) and multiplied by 0,1. [31]

In Table 2, the form of rating sources to obtain the "Argument coefficient" (Ka) required is presented for finding the expert competence coefficient "k"

Issues and technologies that had been shown as a final result of the Delphi study, the total number of experts, topics and technologies that had been a priority for the group coefficient "k" were finally compared. Greater than 0.8 is considered high and for the group of coefficient "k" low is less than 0.8.

RESULTS

Delphi Biodegradable Packaging.

A structured and anonymous survey was done to experts in Colombia and other countries such as France, Spain, Mexico, Italy and Argentina, on technological innovations, raw materials for the production of biodegradable polymer materials, raw materials for the production of biodegradable packaging, and additives to the year 2032 via a digital questionnaire of 198 items classified in 5 group of technologies. The survey was answered by experts; these results are shown in Table 3.

In the group "TECHNOLOGICAL INNOVATIONS", we can see that there is a common core of 5 topics that

Table 3. Nucleus of common topics and different topics in the 5 group Delphi.

Nº Experts	DELPHI GROUPS OF BIODEGRADABLES PACKAGING				
	Technological Innovation	Raw materials for the production of Biodegradable polymers	Raw materials to obtain biodegradable packaging	Additives	Technologies
9	5 themes *********	6 themes ***	7 themes *****	1 theme ***	6 themes **
15	5 themes *****	6 themes *	7 themes ****	1 theme **	6 themes ***
22	5 themes ***	6 themes ****	7 themes ******	1 theme *	6 themes *******
Final number of experts: 24	5 themes ******	6 themes ***	7 themes ***	1 theme ****	6 themes *********

* Common Nucleus

recur in the 4 groups of responses. In the group "RAW MATERIALS FOR THE PRODUCTION OF BIODEGRADABLE POLYMERS ", we can see that there is a core of 6 common topics that recur in the 4 groups of responses. In the group "RAW MATERIALS TO OBTAIN BIODEGRADABLE PACKAGING", we can see that there is a common core of 7 topics that recur in the 4 groups of responses. In the consolidator "ADDITIVES", we can see that there is a common core of one recurring theme in the 4 groups of responses. Finally, in the group "TECHNOLOGY", we can see that there is a common core of six topics that recur in 4 groups of responses.

Expert competence coefficient "k"

The following Table shows the calculation of the coefficient "k" to the experts of the Delphi study of biodegradable packaging. The presented information was obtained from the information requested from the nominees, about their self-worth in terms of degree of knowledge on the subject and level of argumentation.

According to the calculation of the coefficient "k", 16 experts obtained a higher value of 0,8. With this information we proceeded to analyze the results obtained by this new group of experts.

In the group of Technological Innovations, with 9 answers, a common core of 5 topics plus 8 different topics in relation to 22 experts was obtained. Along with 15 responses, he obtained a common core of 5 topics plus 4 different topics in relation to 22 experts, In this case, the results were acquired with less variation of the 15 experts.

In the group of Raw Materials for the Production of Biodegradable Polymers, with 9 answers, a common core of 6 topics plus 2 different topics related to 22 experts. Along with 15 responses, a common core of 6 topics was obtained plus 1 topic varying differently to 22 experts, again with less variation of 15 experts was obtained.

Table 4: Expert competence coefficient "k"

EVALUATION OF DEGREE OF KNOWLEDGE ON THE SUBJECT, kc		Expert 1	Expert 2	Expert 3	Expert 4	Expert 5	Expert 6	Expert 7	Expert 8	Expert 9	Expert 10	Expert 11	Expert 12	Expert 13	Expert 14	Expert 15	Expert 16
		EVALUATION OF DEGREE OF KNOWLEDGE ON THE SUBJECT, kc															
I am not an expert neither I possess any knowledge of the subject	0																
I´m no expert and I have little knowledge of the subject	0,3		0.3														
I´m no expert and I have some knowledge of the subject	0,6				0,6											0,6	
I am a specialist in the subject and I have enough knowledge of the subject	0,9	0,9	0,9	0,9			0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9		0,9
I am a specialist in the topic and I have full knowledge of the subject	1					1											
Level of knowledge Kc =		0,9	0,9	0,9	0,6	1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,6	0,9
Competition coefficient K expert =		0,90	0,85	0,85	0,80	1,00	0,95	0,95	0,90	0,85	0,90	0,85	0,90	0,85	0,90	0,80	0,85

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (105-115) Enero _ Junio 2017

In the group of Raw Materials for the Production of Biodegradable Packaging, with 9 answers, a common core of 8 topics plus 4 different topics in relation to 22 experts. Along with 15 responses, a common core of 8 topics plus 0 subjects was achieved relative to 22 various experts. This time the same end results were acquired with 15 experts, that is, there was no variation between the final answers reported by the 22 experts compared to 15 experts.

In the group of additives, with 9 answers, a common core of 1 topic plus 3 different topics were achieved in relation to 22 experts. When 15 responses were obtained, a common core of 1 item plus 1 different topic was acquired in comparison to the 22 experts. Again the least variation was presented with the 15 experts.

In the group of technologies, with 9 answers, a common core of 6 topics plus 1 different theme was achieved in comparison to 22 experts. Along with 15 responses, a common core of 6 topics plus 1 different theme was obtained compared to 22 experts. In this particular case, the same results with experts 9 and 15 compared with the final results reported.

According to the analysis in the Delphi study, it can be observed that the value of experts with less variation are 15 experts to study biodegradable packaging. In the latter, the number of 15 experts scored second in terms of less variation in the results, this is consistent with the comments made by several authors. For example [14], applied the Delphi method for the selection of appropriate experts and detailed principles for decision-making during the process to ensure the validity of a Delphi study. They mention an example in e-commerce in Sub-Saharan Africa that used 10 to 18 experts for each panel, and there were 4 panels in total.

On the other hand [35], presented their results with only 14 and 12 experts in order to reach consensus among a panel of experts. The results were used to establish the best clinical criteria for the diagnosis of carpal tunnel syndrome.

[8], in the study of prognostic variables of financial market in a controlled experiment used only 10 experts. In this same study cited back to [29], it mentions that ten people are enough and that there is not evidence to suggest increasing the size beyond 7 to 10 people improves accuracy.

Results obtained with expert competence coefficient “k”

The results about the appropriate number of experts were completed by the calculation of the coefficient “k” for the study of biodegradable packaging. The results achieved with the 16 experts presented that when coefficient “k” is greater than 0,8 there is a higher percentage of agreement with the final results. With the results given by the experts, it is presented that when coefficient “k” is lower there is a higher variation when compared to the final results. Furthermore, these “less expert” have risen to the level of “priority” topics than that of the final results that arrived at the level of “discussion” topics. If this study had been conducted with 16 experts with a higher “k”, the “most experts” would have obtained virtually the same results as with the final 22 experts.

The results of percentage of matches are shown in Table 5.

Experts with a lower coefficient “k” in the grouping “Technological innovation” presented that the priority topics are those that the total number of experts had determined as “discussion”. That means, when compared to the final results there is an increase of 63,63 in the priority topics, compared to only 9,09% of experts who reported changes with a higher coefficient “k”. In the grouping “premiums for the Production of Biodegradable Polymer materials”, experts with a lower coefficient “k” presented an increase of 100% in the priority topics, as compared to 22% who reported changes in a higher coefficient “k”. Within the grouping “Raw Materials for the Production of Biodegradable Packaging”, experts with a lower coefficient “k” saw an increase of 80% in the priority topics, as compared to 40% who reported changes in the experts with a higher coefficient “k”. In the grouping “Additives”, experts with a lower coefficient “k” saw an increase by 120% in the priority topics, versus 0% of experts who reported changes in a higher coefficient “k”. In the grouping “Technologies”, experts with a lower coefficient “k” presented a 46,67% increase in the priority topics, as compared to 0% of the reported changes experts with a higher coefficient “k”.

Table 5. Results on the adequate number of experts that complemented the "k" coefficient calculus in the Delphi groups of biodegradable packaging.

"K" Coefficient	DELPHI GROUPS OF BIODEGRADABLES PACKAGING									
	Technological Innovation		Raw materials for the production of Biodegradable polymers		Raw materials to obtain biodegradable packaging		Additives		Technologies	
	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% Priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority
"K" ≥ 0.8	63,63%	9,09%	78%	22%	80%	40%	60%	0%	60%	0%
	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussio n that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority	% priority	% of themes for discussion that were classified as priority
"K" < 0.8	63,63	63,63%	78%	100%	60%	80%	40%	120%	73,33	46,67%

CONCLUSIONS

According to the results of the study, it can be observed that regardless of the number of experts, a common core of subjects is presented. In this perspective, although the study had been done with a small number of experts, it could have had medullary winning topics.

Uncertainty about the appropriate number of experts and the desirability of increasing the number may have been reduced because there is not enough evidence that increasing the number of experts would obtain different results to those obtained with 15 experts.

As for the expert competence coefficient "k" in the Delphi study on biodegradable packaging, the results obtained with the 16 experts with a coefficient "k" greater than or equal to 0,8, in four of the five highest percentages of agreement groups were achieved with the common core of priority topics, while experts with a coefficient less than 0,8 in the five aggregators "k" showed percentages of high variation given the same common core subjects. This means that "less expert" highlighted other issues that were not priorities for the group of experts and the common core. According to this study, it is better to work with a small number of experts with a high coefficient "k".

The main limitations of the work carried out in this article has to do with the need to perform the analysis with a larger number of experts, and verify whether other applications of the method in a common core of subjects that do not change when the increase occurs in the number of experts; also, if this common set of issues is the same as mentioned by the group of experts with highest coefficient k.

REFERENCES

[1] NIELSEN, C. and THANGADURAI, M. Janus and the Delphi oracle: Entering the new world of international business research. Journal of International Management, 13, 2007, p. 147-163.
[2] LANDETA, J. Current validity of the Delphi method in social sciences. Technological Forecasting and Social Change, 73(5), 2006, p. 467–482.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (105-115) Enero _ Junio 2017

[3] FLETCHER, A. and MARCHILDON, G. Using the Delphi Method for Qualitative, Participatory Action Research in Health Leadership. International Journal of Qualitative Methods, 13(1), 2014, p. 1–18.

[4] CASTELLÓ, M. y CALLEJO, J. La prospectiva tecnológica y sus métodos. Dirección nacional de planificación y evaluación [online]. 2000. Disponible en http://www.oocities.org/es/derviscorro/plan/05.pdf [Citado 12 de octubre de 2015].

[5] CHUANG, Y., CHIA, S. and WONG, J. Supply Chain Alliance Factors Evaluation by the Delphi-AHP Method. Wseas transactions on business and economics, 10(2), 2013, p. 69–79.

[6] CODURAS, A. y SEÑARÍS, J. Análisis Prospectivo Delphi Sobre el Futuro de la Prestación Farmacéutica. Fundación Gaspar Casal – Fundación Aztrazeneca [online]. 2009. Disponible en http://www.fgcasal.org/publicaciones/delphi.pdf 2009 [Citado 20 de octubre de 2015].

[7] WAKEFIELD, R. and WATSON, T. Delphi 2.0: A reappraisal of Delphi method for public relations research. Public Relations Review, 40(3), 2013, p. 577–584.

[8] KAUKO, K. and PALMROOS, P. The Delphi method in forecasting financial markets— An experimental study. International Journal of Forecasting, 30(2), 2014, p. 313 – 327.

[9] CANCELO, M., NEYRO, J. y BAQUERO, J. Tratamiento adyuvante de la vaginitis con probióticos. Progresos de Obstetricia y Ginecología, 57(1), 2014, p. 4–13.

[10] CABERO, J. Formación del profesorado universitario en TIC – Aplicación del método Delphi para la selección de los contenidos formativos. Educación XX1, 17(1), 2013, p. 112–130.

[11] LIIMATAINEN, H., KALLIONPÄÄ, E., PÖLLÄNEN, M., STENHOLM, P., TAPIO, P. and MCKINNON, A. Decarbonizing road freight in the future - Detailed scenarios of the carbon emissions of Finnish road freight transport in 2030 using a Delphi method approach. Technological. Technological Forecasting and Social Change, 81(1), 2013, p. 1- 40

[12] DEBIN, M., SOUTY, C., TURBELIN, T., BLANCHON, T., BOËLLE, P., HANSLIK, T., HEJBLUM, G., LE STRAT, Y., QUINTUS, F. and FALCHI, A. Determination of French influenza outbreaks periods between 1985 and 2011 through a web-based Delphi method. BMC Medical Informatics and Decision Making, 13(138), 2013, p. 1472–6947.

[13] CREANGE, A. and CAREYRON, A. The diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: A Delphi-method approach. Journal of Neurology. 260(12), 2013, p. 3015–3022.

[14] OKOLI, C. and PAWLOWSKI, S. The Delphi method as a research tool: An example, design considerations and applications. Information & Management, 42(1), 2004, p. 15–29.

[15] GRAHAM, B., REGEHR, G. and WRIGHT, J. Delphi as a method to establish consensus for diagnostic criteria. Journal of Clinical Epidemiology, 56(12), 2003, p. 1150–1156.

[16] GORDON, T. and PEASE, A. RT Delphi: An efficient, bround-lessQ almost real time Delphi method. Technological Forecasting and Social Change, 73, 2006, p. 321–333.

[17] MOORE, A. A modified Delphi Study of Leadership Profiles of the New Product Development Process Stages. [Ph.D. Thesis Doctor of Management]. Seattle (United States): University of Phoenix, 2001, 155 p.

[18] WYSOKINSKA, Z., KOSZEWSKA, M., CZAJKOWSKIT, T. and OLSZOWY, M. Future of the Polish Textile Industrial Sector. An Overall Analysis of the Empirical Research Performed with the Delphi Method within the Project Foresight 'Modern Technologies for the Textile Industry. A Chance for Poland. Fibres and Textiles in Eastern Europe, 21(4), 2013, p. 10–15.

[19] VELA, E., CAVIA, F., NOGUE, J. and MORALES, M. Characteristics and functions for place brands based on a Delphi method. Revista Latina de Comunicación Social. 68, 2013, p. 656–675.

[20] SAHAR, O., MEDDOUR, R., LEONE, V., LOVREGLIO, R. and DERRIDJ A. Analysis of forest fires causes and their motivations in northern Algeria: the Delphi method. Biogeosciences and Forestry, 6(5), 2013, p. 247-254.

[21] LI, L., MILLS, W., GUTIERREZ, A., HERMAN, L., BERGER, D. and NAIK, A. A Patient-Centered Early Warning System to Prevent Readmission after Colorectal Surgery: A National Consensus Using the Delphi Method. Journal of the American College of Surgeons, 216(2), 2013, p. 210–216.

[22] KIM, K., CORLISS, A., O'BRYAN., PHILLIP, G., CRANDALL., STEVEN, C., RICKE, JACK, A. and NEAL JR. Identifying baseline food safety training practices for retail delis using the Delphi expert consensus method. Food Control, 32(1), 2013, p. 55–62.

[23] ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICO (OCDE). Promoviendo el desarrollo de sistemas locales de innovación. El caso de Medellín Colombia. Medellin (Colombia): 2015.

[24] ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICO (OCDE). Cuestionario OCDE - Lista de información necesaria Para el informe de antecedentes. Apoyo al desarrollo de sistemas de innovación: El caso de Medellín y Colombia. Medellin (Colombia): 2013.
[25] EDLER, J. Review of policy measures to stimulate private demand for innovation. Concepts and effects. Compendium of Evidence on the Effectiveness of Innovation Policy Intervention, Nesta Working Paper, 13(13), 2013, p. 1–40.
[26] COLOMBIA. MINISTERIO DE TRABAJO. Prospectiva laboral cualitativa para el sector construcción de edificaciones en Colombia. Bogotá (Colombia): 2015, 130 p.
[27] COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL – COLCIENCIAS. Guía de práctica clínica para prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad diarreica aguda en niños menores de 5 años. Bogotá (Colombia): 2013, 236 p.
[28] COLOMBIA. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PLANEACIÓN (DNP). Guía para la realización de paneles de expertos en la valoración de riesgos transferibles en proyectos de asociación público privada. Bogotá (Colombia): 2014, 16 p.
[29] ROWE, G. and WRIGHT, G. Expert opinions in forecasting: the role of the Delphi technique. International journal Armstrong, Principles of forecasting, 2001, p. 125–144.
[30] CABERO, J. y BARROSO, J. La Utilización del Juicio de Experto para la Evaluación de Tic: El Coeficiente de Competencia Experta. Bordón, 65(2), 2013, p. 25–38.
[31] ROMERO, R., CABERO, J., LLORENTE, M. y VÁZQUEZ, A. El método Delphi y la formación del profesorado en TIC. Universidad de Sevilla [online]. 2011. Disponible en https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/24653/file_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [citado el 14 de 2015].
[32] ZARTHA, J., MONTES, J., TORO, I. y VILLADA, H. Método Delphi - Propuesta para el cálculo del número de expertos en un estudio Delphi sobre empaques biodegradables al 2032. Revista Espacios, 35(13), 2014, p. 10–11.
[33] HERNANDEZ, R., VILLADA, H., ZARTHA, J., ARANGO, B., GÓMEZ, R., WALTEROS, L., DELGADO, K., MONTILLA, C., VARONA, G., MORENO, J., OROZCO, G. y PALACIO, J. Vigilancia tecnológica y análisis del ciclo de vida de la tecnología: evaluación del potencial comercial de un prototipo de guantes biodegradables a partir de almidón termoplástico de yuca. Revista Espacios, 37(13), 2016, p. 27–28.
[34] ZARTHA, J., VILLADA, H., HERNANDEZ, R., FERNANDEZ, A., ARANGO, B., OROZCO, G., BERMUDEZ, R., JOAQUI, D., CERON, A. and MORENO, J. Aplication of Delphi Method in a foresigth study on biodegradable packaging up to 2032. Revista Espacios, 36(15), 2015, p. 3–4.
[35] GRAHAM, B., REGEHR, G. and WRIGHT, J. Delphi as a method to establish consensus for diagnostic criteria. Journal of Clinical Epidemiology, 56(12), 2003, p. 1150–1156.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)116-122
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (116-122) Enero _ Junio 2017

ANÁLISIS DE LAS FUERZAS DEL MERCADO DENDROENERGÉTICO EN LA VEREDA CAJETE DEL MUNICIPIO DE POPAYÁN

ANALYSIS OF MARKET FORCES WOOD ENERGYIN BOWL VILLAGE MUNICIPALITY OF POPAYAN

ANÁLISE DO MERCADO DE FORÇAS ENERGIA DA MADEIRANA BACIA ALDEIA MUNICÍPIO DE POPAYAN

ALEX ENRIQUE ORDOÑEZ-HOYOS[1], RONALD ALEJANDRO MACUACÉ-OTERO[2], ROMÁN OSPINA-MONTEALEGRE[3]

RESUMEN

Este artículo presenta un análisis de las fuerzas del mercado dendroenergético en la vereda Cajete del municipio de Popayán. La metodología llevó a la realización de un muestreo aleatorio de maderas empleadas como dendrocombustible y sobre el cual se procedió a la aplicación de una encuesta estratificada a 64 usuarios seleccionados de acuerdo con patrones de consumo previamente identificados. Se encontró que las especies más utilizadas como dendrocombustible en la vereda fueron el Café (Coffea arabica) con un 22%, Pino (Pinus sp) 18%, Cucharo (Myrsine guianensis) 15% y el Yarumo (Cecropia peltata) 15%. La demanda total de leña estimada para la vereda fue de 122,7 m^3 mensuales, siendo los hogares los que representan la mayor proporción 96,2%, mientras que los hornos y restaurantes representan 3,8%. Con respecto a la oferta, se encontró que el 63% de los usuarios recolecta leña de los bosques y fincas de la zona, mientras que el 37% compran el producto que proviene principalmente de los aserraderos ubicados en el área urbana del municipio de Popayán.

Recibido para evaluación: 16 de Septiembre de 2015. **Aprobado para publicación:** 2 de Agosto de 2016.

1 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias. Ingeniero Forestal. Popayán, Colombia.
2 Universidad del Cauca, Departamento de Ciencias Económicas, Grupo de investigación Desarrollo y Políticas Públicas – POLINOMÍA. Magister. Popayán, Colombia.
3 Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación para el Desarrollo Rural TULL. Magister Scientiae. Popayán, Colombia.

Correspondencia: enrique656@hotmail.com, rmacuace@unicauca.edu.co; rospina@unicauca.edu.co

ABSTRACT

This paper presents an analysis of the wood energy market forces in the village of Cajete the municipality of Popayan. The methodology led to the realization of a random sampling of wood used as woodfuel and proceeded on which the application of a stratified survey of 64 selected users according to previously identified patterns of consumption. They were found to be the most commonly used species such as fuelwood in the sidewalk coffee (Coffea arabica) with 22%, pine (Pinus sp) 18%, Cúcharo (Myrsine guianensis) 15% and the Yarumo (Cecropia peltata) 15%. The total demand for fuelwood estimated for the sidewalk was 122,7 m³ per month, being households that represent the highest proportion 96,2%, while ovens and restaurants represent 3,8%. With respect to the offer found that 63% of users collect firewood from the forests and farms of the area, while 37% buy the product that comes mainly from sawmills located in the urban area of the municipality of Popayán.

PALABRAS CLAVE:
Leña, Demanda, Oferta, Canales de Comercialización.

KEY WORDS:
Firewood, Demand, Supply, Marketing Channels.

PALAVRAS CHAVES:
Lenha, Procura, Oferta, Canais de comercialização.

RESUMO

Este artigo apresenta uma análise das forças do mercado de energia da madeira na aldeia Cajete município de Popayan. A metodologia levou à realização de uma amostragem aleatória de madeira usada como lenha e prosseguiu em que o pedido de um levantamento estratificada de 64 usuários selecionados de acordo com padrões previamente identificados de consumo. Verificou-se que as espécies mais utilizadas como lenha na aldeia foram café (Coffea arabica) com 22%, Pine (Pinus sp) 18% Cucharo (Myrsine guianensis) 15% Yarumo (Cecropia peltata) de 15%. A demanda total estimada para a madeira para a vila foi 122,7 m³ por mês, com as famílias que representam a maior quota de 96,2%, enquanto os fornos e restaurantes representam 3,8%. No que diz respeito à oferta, verificou-se que 63% dos usuários de coletar lenha das florestas e fazendas na região, enquanto 37% compram o produto vem principalmente de serrarias localizadas na área urbana de Popayan. Finalmente, as respectivas conclusões surgem.

INTRODUCCIÓN

Los bosques naturales han sido reducidos principalmente para establecer praderas y cultivos agrícolas, donde los remanentes han quedado sometidos a procesos de degradación por actividades extractivas. En la actualidad, muchas personas dependen total o parcialmente de la madera como combustible o fuente de energía. Más de la mitad de la población mundial emplea la madera como fuente de energía, tanto para la cocción de alimentos, como para la calefacción doméstica y otras actividades productivas y de servicios [1, 2, 3]. La madera por su condición de energía renovable minimiza la emisión de gases de efecto invernadero y si bien en algunos casos su uso ha sido negativo, hay abundantes ejemplos en que la utilización de biomasa leñosa ha impulsado diversas formas de aprovechamiento sostenible de los recursos forestales [1].

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (116-122) Enero _ Junio 2017

Para el caso específico, dentro de los factores que llevaron a la escogencia del lugar para desarrollar la investigación, se encuentra que en la zona hay un importante grupo de pequeños productores de derivados del maíz, llamado "la Ruta del maíz"; de donde las preparaciones parten de una cocción del maíz en recipientes de aluminio fundido con la utilización de hornos de leña, donde se obtiene la masa que se transforma en productos tales como: tortillas, envueltos, arepas y carantanta, productos típicos por excelencia.

En este orden de ideas, el presente artículo se encarga de realizar un análisis del mercado dendroenergético en la vereda Cajete del municipio de Popayán, en el cual se establecen la oferta, demanda, canales de comercialización y se destacan las respectivas conclusiones frente a este particular mercado.

MÉTODO

Se tomó como referencia la guía para encuestas de demanda, oferta y abastecimiento de combustible de madera propuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura - FAO [2] y a partir de la misma, se adaptó una encuesta específica para el lugar. La zona se dividió en dos categorías, la primera correspondiente a los hogares y la segunda a hornos y restaurantes. Para conocer la muestra óptima de encuestas se tomó como base el número de familias reportadas en el Censo Nacional de Población [5] para el municipio de Popayán, estableciéndose una muestra óptima de 64 encuestas, a partir de la aplicación de la ecuación para cálculo de muestras en población finita [4]. La encuesta, tenía como fin identificar características socioeconómicas relacionadas, determinar el nivel de consumo y conocer los principales combustibles energéticos utilizados en la zona.

Esta etapa se llevó a cabo organizando la información tomada en campo con respecto al peso y tipo de especies, los datos reportados por las personas de la zona y comerciantes de leña. El diligenciamiento de este formato permitió identificar y caracterizar los consumidores y distribuidores, el origen de la misma y sus características. Con la información suministrada por los consumidores y comercializadores se establecieron precios de compra y venta, volúmenes promedios de consumo semanal y mensual.

De otro lado, la oferta de dendrocombustibles es el conjunto de la biomasa energética que está a disposición de los consumidores [2]. La misma se estimó con base en la demanda actual, considerando que la oferta actual es equivalente al consumo actual y que los dendrocombustibles no suelen almacenarse por periodos largos de tiempo [2].

Por otra parte, es casi imposible calcular la oferta potencial ya que ésta implica cuantificar todas las fuentes de dendrocombustibles disponibles dentro y fuera de la zona de estudio.

Es de señalar que, en los manuales tradicionales de economía [6] se establecen los determinantes del mercado, los cuales al discriminarse, por parte de la oferta corresponden a: costo de los insumos utilizados para generar el producto, tecnología y productividad, impuestos y subsidios, expectativas frente a los precios, y el número de empresas en la industria. Por su parte, los determinantes de la demanda son: el ingreso, los gustos y preferencias, los precios de los bienes relacionados y el número de compradores.

Si bien es cierto, los determinantes señalados hacen parte de la generalidad de los bienes y servicios, existen algunos mercados en los cuales no operan estos precisamente [2].

Ahora bien, dado que el mercado dendroenergético es particular [7] y sobre el cual se ha avanzado en la elaboración de una metodología específica, a partir de la guía para encuestas de demanda, oferta y abastecimiento de combustible de madera propuesto por la FAO, éste será el referente metodológico para el análisis del mercado.

RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de la aplicación de la encuesta.

Fuentes energéticas utilizadas en la preparación de alimentos

El combustible más utilizado para la cocción de alimentos en la vereda Cajete es la leña, la cual es empleada sola en un 25%, asociada con gas y con electricidad suman el 53%, mientras que el gas es empleado en un 14%. El principal uso para la leña reportado en la vereda, fue la cocción de alimentos representando el 86% y el restante 14% es empleado para diversas actividades.

Cuadro 1. Especies reportadas como dendrocombustible.

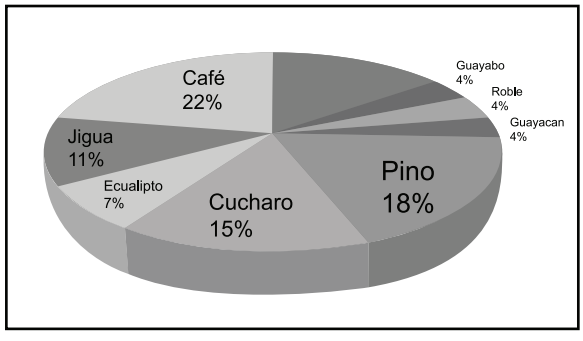
Especies	Nombre científico	Familia	N	%	Densidad
Roble	Quercus Humbolti	FAGACEAE	9	17%	0,73
Café	Coffea Arabiga	RUBINACEA	9	17%	0,69
Pino	Pinus Sp	PINACEA	7	13%	0,64
Yarumo	Cecropia peltata	URTICACEAE	7	13%	0,63
Surrumbo	Trema michrantha	ULMACEAE	5	9%	0,63
Caucho	Ficus cautrecasana	MORACEAE	5	9%	0,6
Eucalipto	Eucaliptus Sp	MYRTACEAE	4	7%	0,6
Cucharo	Myrsine Guianensis	MYRSINACEAE	2	4%	0,57
Mortiño	Miconia sp	MELASTOMATACEAE	2	4%	0,38
Sp1	Sin identificar	Sin identificar	2	4%	0,37
Sp2	Sin identificar	Sin identificar	2	4%	0,36
Jigua	Nectandra Sp	LAURACEAE	1	2%	0,36
Arrayán	Myrtus communis	MYRTACEAE	1	2%	0,48
Pomarrosa	Syzgium jambos	MYRTACEAE	1	2%	0,32
			57	100%	

Especies utilizadas como dendrocombustible en la vereda.

Se reportaron 14 especies empleadas como combustible en la vereda (Cuadro 1), siendo las más frecuentes en los arrumes de leña, el café (*Coffea arabica*) con el 17%, roble (*Quercus humboldtii*) con 17%, yarumo (*Cecropia sp*) con el 13% y pino (*Pinnus sp)* con 13%.

La Figura 1 muestra la preferencia de especies usadas como leña, siendo el Café (22%) la más utilizada en la vereda, esto se debe a la presencia de este tipo de cultivo en la zona, seguido por el Pino (18%), el cual es una especie que se puede conseguir fácilmente en los aserraderos de madera de la variante municipio de Popayán.

Figura 1. Preferencias de leña en la Vereda Cajete, Municipio de Popayán



Características de la leña.

De acuerdo con el muestreo, las maderas empleadas para leña se hallaron en estado seco al aire, sus densidades fueron de medias a altas y se encontraban en buen estado, lo que sugiere que los usuarios no la almacenan durante largos periodos, pues de ser así, presentarían deterioro por factores climáticos y biológicos [8].

El cuadro 1 muestra las especies utilizadas como leña y sus densidades correspondientes [9]. Allí se puede observar que las especies de menor densidad como yarumo, jigua y mortiño, son utilizadas principalmente para mantener el calor en los hornos, sin que alcancen altas temperaturas que causen una pérdida de los productos; entretanto, las maderas más densas como el roble, café y pino, son utilizadas para iniciar el calentamiento de los hornos y para cocinar el maíz y demás productos, a nivel de la agroindustria.

Por su parte, los hogares no discriminan la leña, cualquier tipo es utilizada para el proceso de cocción de alimentos, calentar agua, preparar alimentos para animales o para cualquier uso.

Unidades locales de leña.

Se reportaron como las unidades más utilizadas el atado, piaggio, guamo y arrume, en cada una de estas se observó que pueden contener diferentes tipos de leña

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (116-122) Enero _ Junio 2017

Cuadro 2. Unidades locales de leña, con su volumen aproximado en m^3.

Unidades locales de leña	Tipos de leña	Precio	Volumen M3
Atado	Cucharo, jigua, caucho	$2.000	0,018
Piaggio	Pino, eucalipto	$35.000	0,227
Guamo	Café, yarumo, pomarrosa	$5.000	0,01
Arrume	Pino, eucalipto, surrumbo, mortiño	$7.0000	0,203

y al momento de cubicarlas cada una corresponde a un volumen real diferente. Por otra parte, se encontró que el precio puede variar de acuerdo a la temporada del año, aunque la variación no es muy alta (Cuadro 2).

Demanda de leña en la vereda

Como se muestra en el Cuadro 3, la demanda actual de leña estimada para toda la vereda fue de 122,7 m^3 mensuales, lo que sugiere un consumo anual de 1472,4 m^3. El consumo de leña por parte de los hogares alcanza la mayor proporción 96,2% (118,04 m^3/mes), mientras que el de los hornos alcanzó el 3,8% (4,7 m^3/mes).

Oferta de leña en la vereda

Es importante diferenciar entre la oferta actual, que es la efectivamente disponible, y la oferta potencial, que es la que podría obtenerse con un aprovechamiento integral y sostenible de los recursos. Por lo general, la oferta actual es igual al consumo actual [2]; es decir, que en estos momentos la oferta de leña en la vereda Cajete es de 122,7m^3.

La cuantificación de la oferta potencial es más compleja, porque implica la identificación y levantamiento cuantitativo de todas las fuentes de dendrocombustibles, y la correcta estimación de su productividad bajo regímenes de aprovechamiento sostenible [2].

Cuadro 3. Demanda de madera como dendrocombustible en la vereda Cajete, Municipio de Popayán.

Categoría	m^3/Mes Usuario	No Usuarios	m^3/Mes Vereda	m^3/Año Vereda
Hogares	0,30	356	105,4	1265
Hornos y restaurantes	1,23	14	17,3	207
Promedio	0,33		122,7	
Total usuarios		370		1472

Principales fuentes de obtención de leña

En la vereda se reportaron dos tipos de fuentes de dendrocombustibles, las directas e indirectas, considerando la clasificación propuesta por la FAO. Las fuentes directas son las fincas, cercos, relictos de bosque y rastrojos disponibles en la zona o áreas cercanas a la vereda. Las fuentes indirectas, son los aserraderos del área urbana del municipio de Popayán, principales abastecedores indirectos de leña en la vereda Cajete, siendo las especies pino y eucalipto las más comercializadas. De acuerdo con la figura 2 se puede observar que el 71% (87,12 m^3) del consumo mensual de leña para la vereda proviene de la recolección mientras que el 29% (35,58 m^3) se compra.

En contraste con las estrategias para la obtención de leña por parte de los hogares y la agroindustria de la vereda; en los hogares el 84% de la leña utilizada es recolectada, y solo el 16% es comprada, mientras que para los hornos y restaurantes es todo lo contrario el 86% de los usuarios compran la leña y solo el 14% la recolecta.

De acuerdo con el tipo de propiedad de donde proviene la leña que es recolectada, el 86% de los usuarios reportaron que recolectan en terrenos propios, mientras que el 14% lo hacen en propiedades privadas ajenas.

Al analizar los tipos de coberturas reportadas por los usuarios, como fuentes de leña para la recolección en la vereda, se encontró que las principales fuentes son, las socas del café (63%), seguido del bosque (21%) y en menor proporción cafetal y cerca viva.

Figura 2. Fuentes de obtención de leña en la Vereda Cajete.

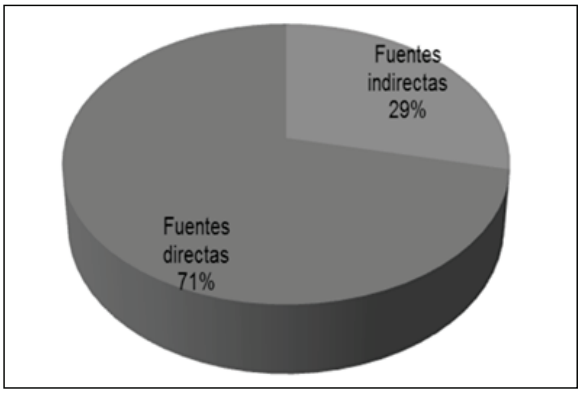
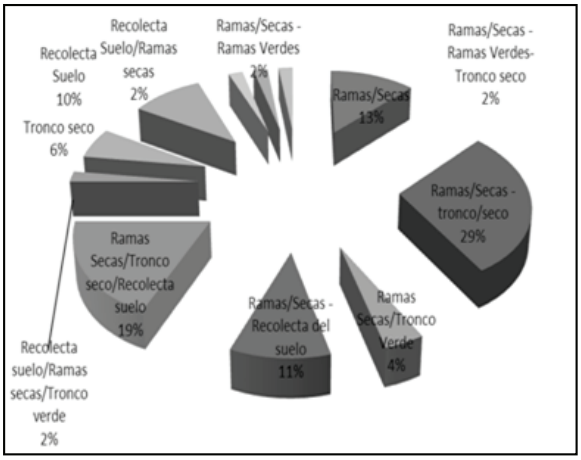


Figura 3. Como obtiene la leña que recolecta.

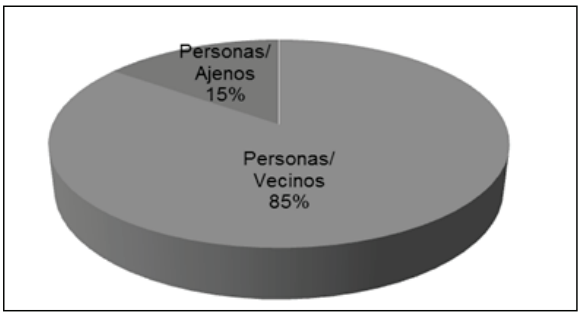


Por otra parte, los usuarios manifestaron que prefieren recolectar del suelo ramas y troncos secos (77%), pocos recolectan troncos o ramas verdes (33%); esto se debe a que prefieren usar maderas con poco contenido de humedad y además, que no tumban árboles verdes, pues tal como se logró establecer a partir de la investigación, los usuarios de leña en los últimos años han venido tomando conciencia ambiental (figura 3).

Con respecto a la leña que se obtiene de manera indirecta, el 85% de los usuarios manifestaron que la compran a vecinos de la vereda, mientras que el 15% lo hacen a personas ajenas a la misma (figura 4).

A pesar que la vereda en los últimos años ha venido incorporando fuentes energéticas como gas y electricidad para la cocción de alimentos, la leña sigue siendo la principal fuente de energía tanto para los hogares, restaurantes y la agroindustria del maíz. De acuerdo a esto, la leña juega un papel importante, pues es un bien que se puede conseguir fácilmente en la zona.

Figura 4. Canales de comercialización de la leña.



Con respecto a las especies empleadas como leña, la más representativa es el café (*Coffea arabica*), esto se debe a que el estudio coincidió con una temporada de renovación de cultivos entre los meses de mayo a septiembre que se presenta en la vereda Cajete por parte de la Federación Nacional de Cafeteros – FNC y a las cosechas que se han venido implementando; si por alguna circunstancia el estudio se hubiese hecho en otra época del año, posiblemente la especie más utilizada podría ser otra.

Con la encuesta se determinó que los usuarios realizan recolección de leña en su mayoría, en predios propios. A su vez, las recolectas son llevadas a cabo el 87% por los hombres y el restante 13% por mujeres, lo que indica que la recolección es una actividad preponderantemente masculina.

Considerando que gran parte de los usuarios recolectan leña a nivel de hogares la mayoría de ellos prefieren obtener las ramas y los troncos de los árboles que se encuentran secos, debido a que es más fácil rajar la madera en ese estado, además de esto, porque pueden presentar una combustión duradera, reducida producción de humo y alta capacidad calorífica [10].

Con respecto al consumo de leña en la vereda Cajete, se determinó que es alto; esto se debe a la tradición, el nivel de ingresos, los hábitos que tienen para la cocción de alimentos y la alta disponibilidad del recurso forestal, pues como se mencionó, se encuentra disponible dentro de sus propios predios.

Entre los factores que favorecen el uso de leña sobre otras fuentes energéticas, está relacionado con aspectos de tipo cultural, en la medida que, toda la vida han empleado la leña para la cocción de alimentos a nivel de los hogares, hornos y restaurantes, y ligado a ello, el sabor que le da a los alimentos, que entre otras cosas, es lo que mantiene en el tiempo la predilección de estos productos por parte de los consumidores, situación que le brinda estabilidad al mercado a través del tiempo.

Por esta razón, a pesar de presentarse cambios a otras fuentes de energía, las fuentes son complementarias, puesto que no reemplazan la leña de manera radical.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (116-122) Enero _ Junio 2017

CONCLUSIONES

La leña en la vereda Cajete, es en la actualidad el combustible más utilizado por los usuarios para la cocción de alimentos a nivel de hogares, restaurantes y la agroindustria de maíz; no solo por las condiciones económicas, sino por las condiciones culturales que se presentan en la comunidad.

Las especies más utilizadas como dendrocombustible por los usuarios actualmente son el café, pino, cucharo, yarumo, jigua, la mayoría de estas especies a excepción del pino, son recolectadas por los usuarios en los bosques, rastrojos, cercas y cafetales de la vereda.

Se encontró que los usuarios tienen una alta preferencia por la leña que está seca y que presenta densidades medias a altas, que no se encuentren en un estado deteriorado que pueda afectar la combustión. Este tipo de preferencias son más usuales a nivel de los hornos debido a que el proceso que ellos realizan con las tortillas es especial.

Las fuentes de obtención de leña a nivel los hogares refleja que hay una mayor tendencia a recolectar o conseguir de fuentes directas el producto, mientras que en los hornos ocurre todo lo contrario, puesto que hay mayor disposición a comprar o conseguirlo de fuentes indirectas.

Una característica clara de la dinámica del comercio de leña en la vereda, refleja que hay personas que recolectan leña de sus predios para comercializarla a los vecinos que requieran este producto; no obstante, hay comerciantes de afuera de la comunidad que les llevan el producto que se obtiene de los aserraderos del municipio de Popayán.

Por último, se logró calcular la demanda actual, estimada de manera mensual y anual; además, se determinó la oferta actual efectiva disponible y las fuentes directas e indirectas de abastecimiento de leña en la vereda Cajete.

REFERENCIAS

[1] SANTOS, A., ESTRADA, E. y RIVAS, G. Uso de la leña y conservación del bosque en el volcán Huitepec, Chiapas, México. LiminaR Estudios Sociales y Humanísticos, X(1), 2012, p. 138-158.

[2] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Guía para encuestas de demanda, oferta y abastecimiento de combustibles de madera [online]. 2003. Disponible: http://www.fao.org/docrep/005/AC693S/AC693s00.htm#TopOfPage [citado 3 de Julio de 2014].

[3] COLOMBIA. PROEXPORT. Sector forestal en Colombia [online] 2012. Disponible: http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/Perfil_Forestal_2012.pdf [citado 25 de Julio de 2014].

[4] DEPOOL, R. y MONASTERIO, D. Probabilidad y estadística: aplicaciones a la ingeniería. Universidad Nacional Experimental Politécnica Antonio José de Sucre. Barquisimeto (Venezuela): 2013, 25 p.

[5] COLOMBIA. DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (DANE). Proyecciones de población a partir del Censo Nacional de Población [online]. 2014. Disponible: http://www.dane.gov.co/index.php/poblacion-y-demografia/proyecciones-de-poblacion [citado 5 de mayo de 2014].

[6] MANKIW, G. Principles of Economics. 7 ed. New Jersey (United States): Cengage Learning, 2014, 65 p.

[7] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Sistema de información sobre la dendroenergía (WEIS) [online]. 2002. Disponible: www.fao.org/forestry/FOP/FOPH/ENERGY/databa-e.stm [citado 25 de Julio de 2014].

[8] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN (FAO). Disponibilidad de leña en los países en desarrollo. Roma (Italia): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1983, 54 p.

[9] LONDOÑO, A. Guía para el curso de ingeniería de la madera. Ibagué (Colombia): Universidad del Tolima, 2012, 38 p.

[10] CHILE. MINISTERIO DE ENERGÍA. Guía práctica para el buen uso de la Leña: Leña Seca - Leña Eficiente. [online]. 2014. Disponible:
http://www.minenergia.cl/archivos_bajar/Documentos/Guia_buen_uso_de_la_lena.pdf [citado 13 de Julio de 2014].

COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LA FRACCIÓN PROTEÍCA DEL GRANO DE AMARANTO EXTRAÍDA MEDIANTE MOLIENDA HÚMEDO-ÁCIDA

RHEOLOGICAL BEHAVIOR of Amaranth Protein-Enriched Fraction OBTAINED by acid wet-milling procedure

ComPortamento REOLOGICO DE PROTEÍNA FRAÇÃO DE GRÃO AMARANTO, REMOVIDO PELO ÁCIDO moagem úmida

DIEGO-ROA[1] , VICENTE-ORTIZ[2], MARCELA-TOLABA[1]

RESUMEN

El interés por el grano de amaranto se ha incrementado en los últimos años gracias a su gran potencial como alimento funcional. Se investigó el efecto de las condiciones de maceración en medio ácido (temperatura y concentración de SO_2) sobre el comportamiento termo-viscoelástico de la fracción proteica (FP) del grano de amaranto. Se utilizó un diseño factorial 3^2, involucrando dos factores: temperatura (40-60ºC) y concentración de SO_2 (0,01–0,1% p/v). Se usó reometría oscilatoria dinámica con ciclos de calentamiento y enfriamiento (25-90ºC) y atemperado a 90ºC seguido de un barrido de frecuencia (0,1 y 10 Hz) a temperatura constante. El módulo viscoelástico (MV) y las propiedades térmicas fueron afectados por ambos factores, siendo significativo el efecto de la interacción. Los espectros mecánicos de las FP desnaturalizadas previamente se realizaron por barrido entre 0,1 y 10 Hz a 25ºC y deformación constante (0,5%). Los resultados revelaron la formación de geles cuyo carácter fue dependiente de las condicio-

Recibido para evaluación: 30 de Septiembre de 2015. **Aprobado para publicación:** 20 de Junio de 2016.

1 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Grupo de Investigación de Postcosecha. Ph.D. Buenos Aires, Argentina.
2 Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Grupo de Investigación de Postcosecha. M.Sc. Ph.D. Buenos Aires, Argentina.
3 Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingenierías, Grupo de Investigación GIEPRONAL. M.Sc. Popayán, Colombia.

Correspondencia: vicente.ortiz@unad.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (123-130) Enero _ Junio 2017

nes de maceración. Las diferentes condiciones de maceración provocaron diferentes grados de desnaturalización de los componentes proteicos, los cuales influyeron en el comportamiento reológico.

ABSTRACT

Interest in the grain amaranth has increased in recent years due to its great potential as a functional food. The investigation showed the effect of soaking conditions in an acid atmosphere (temperature and concentration of SO_2) on thermo-viscoelastic behavior of the protean fraction (FP) of the amaranth grain. It used a 3^2 factorial design, involving two factors: temperature (40-60°C) and concentration of SO_2 (0,01-0,1% w/v). By the same way, it used a dynamic oscillatory rheometry, with heating and cooling cycles (25-90°C), tempered at 90°C, and followed by a frequency sweep (0,1 to 10 Hz) at a constant temperature. The viscoelastic module (MV) and the thermal properties were affected by both factors, with significant interaction effects. Mechanical FP spectra were previously denatured by sweeping from 0,1 to 10 Hz at 25°C, and constant (0,5%) deformation. The results revealed the formation of gels whose character depends on the soaking conditions. The different conditions of maceration caused different degrees of denaturation of the protein components, which influenced the rheological behavior.

PALABRAS CLAVE:
Amaranto, Molienda Húmeda, Proteínas.

KEY WORDS:
Amaranth, Wet-Milling, Proteins.

PALAVRAS-CHAVE:
Amaranto, Wet moagem, Proteínas

RESUMO

O interesse no amaranto tem aumentado nos últimos anos, devido ao seu grande potencial como um alimento funcional. O efeito das condições de imersão em meio ácido (de temperatura e de concentração de SO_2) sobre o comportamento do termo-viscoelástico da fracção de proteína (FP) de amaranto foi investigada. Desenho fatorial 3^2 envolvendo dois fatores: temperatura (40-60°C) e concentração de SO_2 (0,01 - 0,1% w/v). Reometria oscilatório dinâmico foi utilizado com ciclos de aquecimento e de arrefecimento (25-90°C) e anelamento a 90°C, seguido por um varrimento de frequência (0,1 a 10 Hz) a uma temperatura constante. O módulo viscoelástico (MV) e as propriedades térmicas foram afetados por fatores, com efeitos significativos de interação. Os espectros de FP mecânicos foram realizados previamente desnaturado por varrimento de 0,1 a 10 Hz, a 25°C e tensão constante (0,5%). As diferentes condições de maceração causada diferentes graus de desnaturação dos componentes proteicos, que influenciado o comportamento reológico.

INTRODUCCIÓN

El interés por el grano de amaranto se ha incrementado en los últimos años debido a su alto valor nutricional y a algunas ventajas relativas a su cultivo tales como el alto rendimiento, la resistencia a las sequías y su corto tiempo de producción. El amaranto, un pseudocereal, es una planta dicotiledónea cuyos granos presentan un importante contenido de proteínas (14-19% p/p) con un excelente balance de aminoácidos. Éstas poseen adecuados

niveles de lisina, triptófano y metionina, los cuales se encuentran en bajas concentraciones en granos de cereales y leguminosas de uso común [1]. Recientes estudios han mostrado una potencial actividad funcional de estas fracciones proteicas, como por ejemplo en el tratamiento de inhibidores de células cancerígenas [2], aumento de la capacidad antitrombotica [3], propiedades antinflamatorias [4] y capacidad antioxidante [5]. La maceración de granos es una etapa importante que afecta las propiedades de las diferentes fracciones de molienda. El efecto de la temperatura y concentración de agentes químicos (alcalinos y/o ácidos) han sido estudiados en algunos trabajos con diferentes propósitos [6]. Sin embargo, hasta el momento se han desarrollado pocos trabajos sobre los molienda húmeda del grano de amaranto, Roa *et al*, 2014 [7] utilizaron una solución alcalina de hidróxido de sodio con el fin de obtener almidón nativo de amaranto, esta operación fue asistida mediante un molino planetario de alto impacto, lo que favoreció la disgregación de la matriz almidón-proteína, mientras que, Villareal *et al.* [6] usaron una solución acuosa de hidróxido de sodio con proteasas para la maceración del amaranto, encontrando que el pH y la concentración de proteasas tenían un marcado efecto en la velocidad de absorción de agua en el grano de amaranto. Ellos determinaron que la presencia de hidróxido de sodio en el medio de maceración no solo incrementaba la velocidad de absorción de agua sino también el nivel de saturación dentro del grano. Recientemente, Calzetta *et al.* [8] investigaron el efecto de la temperatura de maceración y la concentración de metabilsulfito sobre el rendimiento y composición de las diferentes fracciones obtenidas mediante la molienda del grano de amaranto. Como resultado de ese trabajo fue posible establecer las condiciones óptimas para obtener un rendimiento máximo en la fracción proteica con bajo contenido de almidón. Bolontrade [9] y Condes *et al.* [10] encontraron que diferencias en el proceso de extracción alcalino producía cambios en la composición y funcionalidad de las proteínas de amaranto, observando también cambios en la estructura de los geles obtenidos de las proteínas del amaranto. De acuerdo a estos autores los cambios en los geles son inducidos también por agentes no proteicos como por ejemplo el almidón residual.

El propósito del presente trabajo fue evaluar el potencial uso de la fracción proteica obtenida a partir de la molienda húmeda, como subproducto de la separación del almidón en medio ácido, investigando el efecto de la temperatura y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) durante la etapa de maceración del grano en las características termo-visco elásticas de los mismos.

MÉTODO

Material

Se emplearon granos de *Amaranthus cruentus* con 11% de humedad (base seca), se extrajeron materias extrañas por zarandeado y posterior observación visual y los granos se almacenaron en bolsas plásticas a 4ºC hasta la molienda. La composición centesimal del grano en base seca se realizó según el método AOAC (AOAC, 1996): grasa 7,7%, proteína 16,8% (N = 6,25) y cenizas 3,1%, el contenido de almidón fue 73,0% según método AACC 76-11 [11].

Preparación de las muestras

Se utilizó el procedimiento a escala laboratorio propuesto por Calzetta *et al*., [8]. Se remojaron 100 g de amaranto en 600 mL de solución acuosa de ácido sulfuroso a temperatura y concentración de ácido constante según el diseño experimental (Cuadro 1). El tiempo de remojado (24 h) se estableció con base a ensayos previos de cinética de hidratación de modo de garantizar la saturación del grano. Después del remojado se trituró el grano en presencia de solución en una procesadora Waring Blender (Dynamic Corporation of America, Hartford, CT) a velocidad máxima por el término de dos minutos. En una primera etapa se separó la fibra por tamizado y en una segunda etapa se separaron los aislados proteicos del almidón por sucesivas centrifugaciones y extrayendo la capa proteica de menor densidad. La fracción proteica se secó a 40ºC por 48 horas en estufa de convección forzada, se disgregó en un mortero y se tamizó seleccionándose la fracción retenida entre 74 y 177 micrones. Las muestras fueron almacenadas herméticamente hasta su posterior uso.

Determinación de propiedades viscoelásticas

Las propiedades viscoelásticas se deter-minaron mediante ensayos oscilatorios realizados en un reómetro Paar Physica Rheolab Rheometer, modelo MCR 300 (Anton Paar, Austria) utilizando un sistema de platos planos paralelos, PP 30S de 3 cm de diámetro y 1 mm de distancia entre platos. Los bordes de la muestra

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (123-130) Enero _ Junio 2017

se sella-ron con aceite siliconado con el propósito de controlar la evaporación y evitar varia-ciones de concentración de las suspensiones acuosas empleadas [9,10]. Mediante un barrido de amplitud entre 0,1% y 20% a 25°C a frecuencia constante (1Hz) se determinó la región de viscoelasticidad lineal (RVL)

Ensayos de barrido de temperatura

Se prepararon y estabilizaron suspensiones acuosas de las fracciones proteicas a diferentes concentraciones (5 10, 20 %p/v) y se sometieron a un ciclo de calentamiento dinámico (30-90ºC), estabilización (90ºC durante 20 minutos) y enfriamiento (90-25ºC) a 10ºC/min, siendo la frecuencia de 1 Hz y la deformación de 0,5%. Se registraron mediante el software del equipo los perfiles de los módulos viscoelásticos en función de la temperatura.

Ensayos de barrido de frecuencia

Estos ensayos se realizaron a 25ºC sobre muestras sometidas previamente al barrido de temperatura, con una amplitud de deformación fija de 0,5%, variándose la frecuencia entre 0,1 y 10 Hz. El espectro mecánico de la muestra que se obtiene mediante este ensayo brinda información acerca de la estructura del sistema la cual resulta útil para determinar si las muestras gelifican o forman pasta.

Modelo de Ross- Murphy

Para evaluar el comportamiento reológico de las suspensiones proteicas de amaranto en función de la frecuencia, se utilizó en este trabajo una ecuación relativamente simple, a dos parámetros, conocida como ecuación de Ross-Murphy (Ec. 1) [10].

$$\text{Log } G' = n \text{ Log } (w) + \text{Log } K \qquad \text{(Ec. 1)}$$

Donde K y *n* son los parámetros a determinar. El valor de *n* permite establecer la naturaleza del gel. Según la clasificación dada por algunos autores [11] cuando *n* tiende a cero el modulo G´ resulta independiente de la frecuencia y puede considerarse que el gel tiene carácter fuerte, en tanto que para valores de índice *n* con tendencia a 2, el sistema puede considerarse como dispersión. Este criterio es el que se empleará a continuación para la caracterización del sistema estudiado.

Diseño experimental y análisis MSR

Las experiencias se realizaron de acuerdo al diseño factorial 3^2 siendo los niveles de temperatura 40º, 50º y 60ºC y los de concentración de SO_2 0,1, 0,55 y 1,0 (g/L). Cada experimento se realizó por duplicado, a excepción del punto central del diseño que se triplicó. En el Cuadro 1 se muestran las combinaciones de factores del diseño experimental.

Para analizar el efecto de las condiciones de maceración tienen sobre las propiedades estudiadas en los aislados proteicos se empleó el método de superficies de respuesta (MSR). Las respuestas estudiadas (YK, K= 1,... p) se ajustaron en función de las variables del proceso codificadas (x_i, i=1,..., n) mediante el siguiente modelo polinómico (Ec. 2) asociado al diseño experimental [7].

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^{n} a_i x_i + \sum_{i=1}^{n} a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ i<j}}^{n} a_{ij} x_i x_j \qquad \text{(Ec. 2)}$$

Los coeficientes a_o, a_i y a_{ii} representan los efectos constantes, lineales y cuadráticos, respectivamente, en tanto que los coeficientes a_{ij} representan el efecto de interacción entre los factores codificados x_i y x_j. Se adoptó una codificación lineal entre los valores reales y las variables codificadas. Se empleó el paquete estadístico Statgraphics® (Statistical graphics Corporation, U.S.A.) para procesar los resultados obtenidos.

Cuadro 1. Condiciones experimentales de molienda húmeda, rendimiento y contenido proteico de aislados

Muestra	T (°C)	SO2 (p/v %)	Rendimiento (%)	Proteína (%)
1	40	0,01	13,8	18,0
2	40	0,055	17,3	19,3
3	40	0,1	11,3	19,5
4	50	0,01	15,6	29,1
5	50	0,1	13,2	26,7
6	50	0,055	17,5	29,9
7	50	0,055	16,5	29,0
8	50	0,055	15,9	30,0
9	60	0,1	16,6	18,1
10	60	0,055	19,9	20,3
11	60	0,01	18,9	17,1

Se reportó el valor promedio de duplicados.
El valor del error para todas las mediciones fue menor al 5%.

RESULTADOS

Obtención de aislados proteicos de amaranto

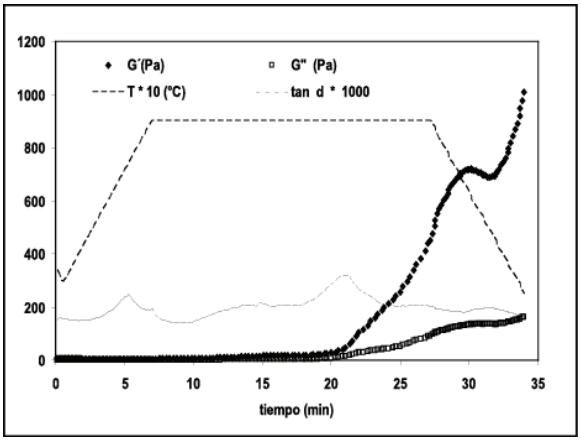
El cuadro 1, muestra el diseño experimental usado, los valores del rendimiento de la fracción proteica y el contenido proteico. Cabe señalar que la fracciones obtenidos en este trabajo difieren significativamente de los concentrados proteicos (proteína > 70%) cuya elaboración requiere harina desgrasada y un procedimiento más largo y costoso [8, 10].

Barrido de temperatura

El registro de los módulos viscoelásticos en función de la temperatura se muestra en la Figura 1, se observa que el modulo G´ supera a G" en todo el ciclo de calentamiento y enfriamiento, esto quiere decir que el sistema tiene características sólidas, así mismo, esto se confirma con el valor de la tan δ, la cual oscila en un valor de 0,2 confirmando que G´ supera a G.

Un marcado incremento del módulo G´ se inicia a los 20 minutos durante el atemperado a 90°C y luego el decaimiento a los 30 minutos en el enfriamiento, este comportamiento nos muestra la desnaturalización de las proteínas globulares del amaranto, especialmente las globulinas 7S. Condes *et al*., [10] encontraron perfiles similares durante el barrido de temperatura de concentrados proteicos, estos autores atribuyeron el comportamiento observado a la desnaturalización de proteína y almidón presentes en los concentrados analizados.

Figura. 1. Evolución de los módulos G´, G´´y tan δ de una dispersión al 10%p/v de proteínas de amaranto, durante un ciclo de calentamiento y enfriamiento.



Durante la etapa de enfriamiento la diferencia entre G´ y G" se incrementaron respecto a los valores alcanzados durante el calentamiento evidenciando de esta manera el fortalecimiento y estabilidad del gel, el fortalecimiento y estabilidad del gel se debe principalmente al entrecruzamiento ordenado de las proteínas durante el enfriamiento, generalmente las estructuras ordenas producen geles translucidos y con alta retención de agua. Con el objeto de establecer la influencia de las condiciones de remojado o condiciones en el reactor sobre los módulos viscoleasticos de las fracciones proteicas se utilizó el MSR. Los valores de los parámetros viscoelasticos (G' y n) se muestran en el cuadro 2.

Como la maceración del grano es un proceso difusivo, el efecto de la concentración depende del nivel de temperatura, esto se hace evidente cuando se compara los valores del módulo ($G´_{25°}$) a 40°C y 60°C (cuadro 2). Una de las posibles razones se puede atribuir al efecto de desnaturalización proteica que provoca el aumento de la concentración de SO_2 en la matriz, lo que posteriormente puede facilitar la formación de entrecruzamientos en el gel en la etapa de enfriamiento.

El efecto de las variables de remojo (temperatura y concentración del ácido) se estudió mediante MSR y se muestra en el cuadro 3, donde se puede obser-

Cuadro 2. Valores del módulo elástico y Ross de las fracciones proteicas al final del calentamiento ($G´_{90°C}$) y del enfriamiento ($G´_{25°C}$) a las diferentes condiciones de remojo.

Muestra	Índice de Ross-Murphy (n)	Módulo Elástico (G´90°C)	Módulo Elástico (G´25°)
1	0,1426	462	1000
2	0,1676	2350	3380
3	0,1826	2036	4153
4	0,2639	1310	4260
5	0,1627	1630	5246
6	0,1701	1840	5550
7	0,1658	1950	5590
8	0,1594	1810	5560
9	0,0316	2690	6320
10	0,0203	2660	6080
11	0,0392	1580	6400

Se reportó el valor promedio de duplicados.
El valor del error para todas las mediciones fue menor al 5%.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (123-130) Enero _ Junio 2017

Cuadro 3. Efecto de las condiciones de maceración en los módulos elásticos G' al final del calentamiento y enfriamiento.

Coeficiente		Modulo G´90°C (Pa)	Modulo G´25°C (Pa)
Constante	a0	2880	6398,8
Lineal	a1	13,7 NS	-122,2 NS
	a2	499NS	2287,2**
Cuadrático	a1.1	- 893,7*	---------
	a2.2	--------	----------
Interacción	a1.2	- 1171,0**	-3018,3**
Correlación	r2	0,8448	0,7630

a ***, **,* : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo; -----: coeficiente eliminado

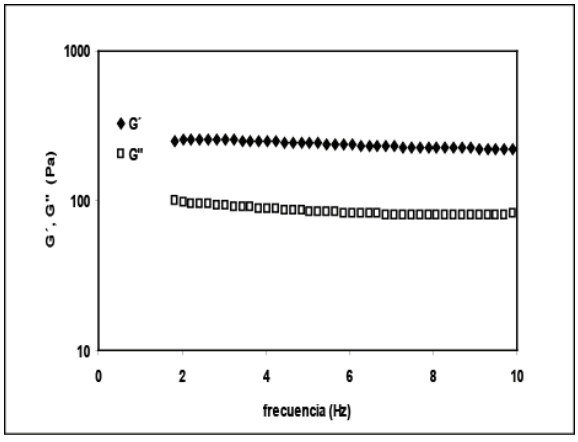
var una significativa influencia de la concentración de ácido sobre ambos módulos siendo apreciable la interacción temperatura-concentración tanto para $G'_{90°C}$ como para $G'_{25°C}$.

Barrido de frecuencia

La figura 2 corresponde al espectro mecánico de un gel proteico de amaranto con carácter fuerte, esto se comprueba con G´ mayor a G" e independientes de la frecuencia. El carácter elástico del sistema se manifiesta con valores del factor de pérdida tan δ menores a la unidad.

Con el propósito de modelar el espectro mecánico de los aislados proteicos representado por el barrido de frecuencia se utilizó el modelo de Ross-Murphy [14] [15]. El modelo resultó satisfactorio ($r^2 > 0,99$) para simular el comportamiento viscoelástico de los geles obtenidos. El Cuadro 2 muestra los valores del índice *n,* obtenidos mediante regresión utilizando la forma lineal de la ecuación de Ross-Murphy (ecuación 1), en función de las condiciones de remojado. Las características de los geles formados oscilaron entre geles de tipo fuerte (*n* tendencia a cero) y geles de débil firmeza (*n* tendencia a 0,3).

Figura 2. Barrido de frecuencia a 25°C para el gel proteico de amaranto.



Con el objeto de interpretar cuantitativamente el efecto de las condicione de remojado en los valores del índice de Ross-Murphy se realizó un análisis MSR. Los resultados del mismo se dan en el Cuadro 4 donde se muestran los coeficientes de la ecuación (1) y su nivel de significación.

Se observó el efecto lineal negativo de la temperatura, por lo tanto el índice (*n*) disminuye (gel firme) con el aumento de la temperatura. Probablemente la hidratación y la desnaturalización favorecidas a mayores temperaturas propician la formación de uniones entre las cadenas de proteína y contribuyen a formar una estructura más dura [16]. Por otra parte la concentración de ácido afecta cuadráticamente al índice *n* y por lo tanto existen ciertas concentraciones más convenientes para la elaboración de geles más fuertes [17]. Así mismo el efecto del ácido podría estar relacionado con cam bios en la estructura de las proteínas, facilitando la formación en sistemas emulsionados [18]. El efecto del ácido es complejo dado el carácter heterogéneo de los aislados proteicos obtenidos en este trabajo.

Cuadro 4. Efectos de las condiciones de maceración sobre el índice "*n*" de Ross-Murphy.

Coeficiente		Indice "n" de Ross Murphy
Constante	a0	0,1873
Lineal	a1	-0,052***
	a2	0,0132NS
Cuadrático	a1.1	0,0204NS
	a2.2	- 0,086***
Interacción	a1.2	- 0,0217NS
Correlación	r2	0,9210

a ***, **,* : Coeficiente significativo para intervalo de confianza de 99%, 95% y 90%, respectivamente; NS: coeficiente no significativo; -----: coeficiente eliminado

CONCLUSIONES

Con base a los resultados obtenidos puede concluirse que las condiciones de remojado afectaron de modo significativo el comportamiento reológico de los aislados proteicos de amaranto obtenidos mediante molienda húmeda. Los diferentes comportamientos reológicos observados podrían atribuirse a los diferentes grados de desnaturalización de los componentes proteicos y no proteicos de los aislados logrados a partir de condiciones de remojado no equivalentes.

La obtención de geles de mayor firmeza estuvo asociada al uso de mayores temperaturas de remojado sin embargo también incide la concentración de ácido de modo cuadrático. El modelo de Ross-Murphy se usó con éxito para caracterizar los geles encontrándose en la manipulación de las condiciones de remojado una herramienta eficaz para modificar las características de los geles formados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero provisto por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (FCEN - UBA).

REFERENCIAS

[1] ARENDT-ELKE, K. and ZANNINI, E. Amaranth, Cereal Grains for the Food and Beverage Industries. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition, 248, 2013. p. 439-473.
[2] QUIROGA, A., BARRIO, D. and AÑÓN, M. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. LWT - Food Science and Technology, 60, 2015, p. 478-485.
[3] SABBIONE, A.C., SCILINGO, A. and AÑON, M.C. Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. LWT - Food Science and Technology, 60, 2015, p. 171-177.
[4] MORONTA, J., SMALDINI, P., DOCENA, G. and AÑÓN, M. Peptides of amaranth were targeted as containing sequences with potential anti-inflammatory properties. Journal of Functional Foods, 21, 2016, p. 463-473.
[5] ORSINI, M., TIRONI, V.A. and AÑÓN, M.C. Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestión. LWT - Food Science and Technology, 44, 2011, p. 1752-1760.
[6] VILLARREAL, M., RIBOTTA, P. AND ITURRIAGA, L. Comparing methods for extracting amaranthus starch and the properties of the isolated starches. LWT - Food Science and Technology, 51, 2013, p. 441-447.
[7] ROA, D.F., SANTAGAPITA, P.R., BUERA, M.P. AND TOLABA, M.P. Amaranth milling strategies and fraction characterization by FTIR. Food and Bioprocess Technology, 7, 2014, p. 2723-2731.
[8] CALZETTA-RESIO, A.N., TOLABA, M.P. and SUAREZ, C. Correlations between wet-milling characteristics of amaranth grain. Journal of Food Engineering, 3(92), 2009, p. 275-279.
[9] BOLONTRADE, A., SCILINGO, A. and AÑÓN, M. Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation-Part 1. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, 105, 2013, p. 319–327.
[10] CONDÉS, M.C., SPERONI, F., MAURI, A. and AÑÓN, M.C. Physicochemical and structural properties of amaranth protein isolates treated with high pressure. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 14, 2012, p. 11-17.
[11] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC). Official methods of analysis. Washington (USA): AOAC, 1986.
[12] AACC, A.A.O.C.C. Approved Methods of the Association of Cereal Chemists. St Paul (USA): The Association, 1995.
[13] CONDÉS, M.C., SPERONI, F., MAURI, A. and AÑÓN, M.C. Amaranth protein films from thermally treated proteins. Journal of Food Engineering, 119, 2013, p. 573-579.
[14] LOUBES, M.A., CALZETTA-RESIO, A.N., TOLABA, M.P. and SUAREZ, C. Mechanical and thermal characteristics of amaranth starch isolated by acid wet-milling procedure, Food Science and Technology, 46, 2012, p. 519-524.
[15] RAMOS, J., KIRJORANTA, S., TENITZ, S., PENTTILÄ, P., SERIMAA, R., LAMPI, A. and JOUPPILA, K. Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks. Journal of Cereal Science, 2013, p. 1-9.
[16] KOPPALU, V., PREETHAM, K., USHA, D., SURESH, D., SAKHARE, A. and INAMDAR, A. Preparation of protein and mineral rich fraction from grain amaranth and evaluation of its functional

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (123-130) Enero _ Junio 2017

characteristics. Journal of Cereal Science, 2016, p. 451–458.

[17] SANZ-PENELLA, J., WRONKOWSK, M., SORAL-SMIETANA, M. and HAROS, M. Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. LWT-Food Science Technology, 50, 2013, p. 679-685.

[18] BOLONTRADE, A., SCILINGO, A. and AÑÓN, M. Amaranth proteins foaming properties: Film rheology and foam stability – Part 2. Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, 141, 2016. p. 643–650.

DETECCIÓN SEROLÓGICA DEL BLV EN MUESTRAS DE LECHE EN UNA POBLACIÓN DE VACAS HOLSTEIN, ANTIOQUIA

SEROLOGICAL DETECTION OF BLV IN MILK SAMPLES IN A POPULATION OF HOLSTEIN COWS, ANTIOQUIA

DETECÇÃO SOROLÓGICO DO BLV EM AMOSTRAS DE LEITE EM UMA POPULAÇÃO DE VACAS DA RAÇA HOLSTEIN, ANTIOQUIA

CRISTINA ÚSUGA-MONROY[1], LINA MARCELA LÓPEZ-LÓPEZ[2], KAREN YEPES-LUNA[3], JOSÉ JULIÁN ECHEVERRI-ZULUAGA[4], ALBEIRO LÓPEZ-HERRERA[5]

RESUMEN

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) es el agente etiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE), esta enfermedad es infecciosa, crónica y específica del ganado bovino, presentando alta prevalencia, pero un bajo porcentaje de enfermos con manifestaciones clínicas. Entre 30-70% los animales infectados puede desarrollar Linfocitosis Persistente (LP) y entre el 0,1-10% de los bovinos con más de tres años de infección sufre algún tipo de Linfosarcoma (LS). El objetivo de este trabajo fue detectar serológicamente el BLV en muestras de leche de vacas Holstein en tres hatos lecheros del departamento de Antioquia. Se tomaron 133 muestras de leche de vacas Holstein de tres hatos lecheros ubicados en los municipios de Medellín y Belmira, se realizó una ELISA indirecta contra

Recibido para evaluación: 2 de Mayo de 2016. **Aprobado para publicación:** 14 de Septiembre de 2016.

1 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M Sc, (e) Ph.D. Medellín, Colombia.
2 Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. (e) Zoot. Medellín, Colombia.
3 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. (e) Zoot. Medellín, Colombia.
4 Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M.Sc, Ph.D. Medellín, Colombia.
5 Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación BIOGEM. Zoot, M.Sc, Ph.D. Medellín, Colombia.

Correspondencia: cusugam@unal.edu.co

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (131-137) Enero _ Junio 2017

la proteína de envoltura gp51 viral. La prueba ELISA mostró una seroprevalencia del 79,69% (106/133) para el total de muestras evaluadas. El hato con la mayor seroprevalencia fue el hato 1 (82,86%), seguido por el hato 2 (80%) y por último el hato 3 (77,08%). La presencia del BLV ha aumentado en Antioquia durante los últimos años, el diagnóstico rápido y eficiente a través de metodologías confiables permitiría el control sobre la diseminación de la enfermedad en los hatos lecheros.

ABSTRACT

The Bovine Leukosis Virus (BLV) is the etiological agent of the Enzootic Bovine Leukemia (EBL), this disease is infectious, chronic and specifically cattle, presenting a low percentage of patients with clinical manifestations. Between 30-70% of infected animals can develop persistent lymphocytosis (LP) and between 0,1-10% of cattle over three years of infection suffers some form of lymphosarcoma (LS). The aim of this work was serologically detection of BLV in milk samples from Holstein cows in three dairy herds in the department of Antioquia. Were taken 133 milk samples from Holstein cows three dairy herds located in the municipality of Medellin and Belmira, was conducted an indirect ELISA against gp51 envelope protein of the virus. The ELISA test showed a seroprevalence of 79,69% (106/133) for all samples tested. The herd was the largest herd seroprevalence 1 (82,86%), followed by the herd 2 (80%) and finally the herd 3 (77,08%). The presence of the BLV has increased in recent years in Antioquia, so fast and efficient diagnosis through reliable methodologies allow control over the spread of the disease in dairy herds.

PALABRAS CLAVE:
Seroprevalencia, ELISA, Glicoproteína-gp51.

KEYWORDS:
Seroprevalence, ELISA, Glycoprotein-gp51.

PALAVRAS-CHAVE:
Soroprevalência, ELISA, Glicoproteína-gp51.

RESUMO

A leucose vírus (BLV) é o agente etiológico da Leucose Bovina Enzootica (EBL), esta doença é infecciosa, crônica, e, gado especifica, apresentando uma baixa percentagem de pacientes com manifestações clínicas. Entre 30-70% dos animais infectados podem desenvolver linfocitose persistente (LP) e entre 0,1-10% dos bovinos com mais de três anos de infecção sofre alguma forma de linfossarcoma (LS). LBE. O objetivo deste trabalho foi detecção sorologicamente o BLV em amostras de leite de vacas da raça Holstein em três rebanhos leiteiros no departamento de Antioquia. 133 amostras de leite de vacas da raça Holstein em três rebanhos leiteiros localizados no município de Medellín e Belmira tomaram um ELISA indireto contra a proteína do envelope gp51 do vírus foi realizado. O teste de ELISA mostrou uma soroprevalência de 79,69% (106/133) para todas as amostras testadas. a maior seroprevalência era evidente no rebanho (82,86%), seguido do rebanho 2 (80%) e, finalmente, o rebanho 3 (77,08%). A presença do BLV tem aumentado Antioquia nos últimos anos, o diagnóstico rápido e eficiente através de metodologias fiáveis permitem o controle sobre a propagação da doença em rebanhos leiteiros.

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Leucosis Bovina (BLV) es miembro del género *Deltaretrovirus*, familia *Retroviridae*. El BLV es el agente causante de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) y se ha descrito en todo el mundo [1]. La mayoría de los animales infectados (60%) no muestran signos hematológicos de la infección y se convierten en portadores asintomáticos del virus. Entre 30-70% los animales infectados puede desarrollar Linfocitosis Persistente (LP) y entre el 0,1-10% de los bovinos con más de tres años de infección sufre algún tipo de Linfosarcoma (LS) [2,3].

La detección de ganado infectado con BLV es fundamental para el control de la infección la mayoría del ganado infectado con BLV no muestra síntomas clínicos, por lo que no puede detectarse a través de las prácticas de examen de rutina; sin embargo, algunos animales presentan exoftalmia la cual se caracteriza por la degeneración del tejido retro ocular y/o de las estructuras internas del ojo, este signo es bastante específico como signo de la enfermedad [4]. En otros casos los nódulos linfáticos aumentan de tamaño en animales con más de 3 años de infección, la palpación de los ganglios linfáticos es importante para identificar los animales infectados con BLV. Los principales métodos serológicos para identificar un portador infectado con el BLV son la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) [5]. Ambas técnicas de diagnóstico son recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para la detección de anticuerpos específicos contra las proteínas gp51 y p24 que hacen parte de la envoltura del virus [3,6].

La Leucosis Bovina Enzoótica se encuentra dentro de las 14 enfermedades bovinas sin control en nuestro país [7], lo que ha permitido que el desconocimiento juegue un papel a favor en la diseminación de la enfermedad. Durante el 2005 y 2009 se procesaron muestras de suero sanguíneo para determinar la seroprevalencia de LBE en algunos departamentos de Colombia; el departamento de Antioquia obtuvo una seropositividad del 28% y el departamento de Córdoba registró la mayor seroprevalencia de todos los departamentos evaluados (59%) [8], en tanto el resultado para Colombia fue del 25% de positividad [9]. La seroprevalencia del BLV en Colombia durante el 2014 fue del 42.7% en animales y del 67,7% en los hatos, esta información se obtuvo a partir del análisis serológico (ELISA) de 8150 bovinos ubicados en los departamento de Antioquia, Boyacá, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Nariño y Meta [10]. La detección serológica del BLV en muestras de leche no se ha realizado en nuestro medio; sin embargo, se han detectado anticuerpos de BLV en muestras de tanques de leche [11]. De otra parte se ha reportado que la sensibilidad y especificidad de la técnica ELISA en muestras de leche son similares a las obtenidas en muestras de suero [12]. Detectar el BLV en leche es ideal por ser menos invasivo ya que la toma de muestras se realiza durante el ordeño, además la toma de muestras de sangre crea un factor de estrés en los bovinos, por lo que algunos productores son reacios a esta práctica en sus hatos. La identificación de los animales infectados y el conocimiento de la prevalencia del BLV son parámetros de gran importancia, ya que permiten tomar medidas de control importantes para la producción. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia serológica del Virus de Leucosis Bovina en muestras de leche en una población de vacas Holstein en el departamento de Antioquia.

MÉTODO

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías propuestas por "The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" [13]. Para la toma de muestras se obtuvo la aprobación por parte del comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia (CE-MED-007, 14 de mayo de 2012).

Área de estudio

Se tomaron muestras de leche de 133 vacas Holstein que pertenecen a hatos de lechería especializada entre primer y quinto parto con edades de 3 a 7 años, las cuales pertenecen a 2 municipios del departamento de Antioquia. Las muestras estuvieron distribuidas de la siguiente forma: un hato de 35 vacas ubicado en el municipio de Medellín y dos hatos ubicados en el municipio de Belmira uno con 50 vacas y otro con 48 vacas. El manejo, la alimentación y sanidad son variables y dependen de cada hato.

Toma de muestras de leche

Para la toma de muestras de leche se limpió la ubre y cada uno de los pezones con servilletas de papel, se recolectaron los primeros chorros antes de poner las

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (131-137) Enero _ Junio 2017

pezoneras antes de iniciar el ordeño. La leche se recolectó en tubos individuales de 50 mL, cada tubo tenía como conservante un antimicrobiano (Bronopol). Las muestras fueron marcadas por vaca y hato, se homogeneizaron por inversión y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración (-4°C) para su posterior procesamiento el día siguiente al muestreo. Todos los hatos contaban con ordeño mecánico.

Extracción de sueros de leche

Las muestras de leche se trasladaron a tubos de 15 mL y se centrifugaron a 1500 g por 10 minutos para separar la leche en fracción grasa y fracción clarificada o suero. Se retiró la fracción grasa y el suero se recolectó en tubos marcados de 1,5 mL. Las muestras se conservaron a -20°C para su posterior análisis de anticuerpos por la técnica ELISA.

Prueba serológica ELISA

Para el diagnóstico de anticuerpos contra el BLV (gp51) en las 133 muestras de leche se usó la técnica de ELISA. El procedimiento se realizó con un kit comercial (SVANOVIR® BLV gp51-Ab). Se adicionaron 4 μL del reactivo A (control positivo) y 4 μL del reactivo B (control negativo) en los pozos para los controles. Se adicionaron 100 μL de suero de cada muestra en los otros pozos. Se agitó el plato y se incubó a 37°C por 1 hora. Se lavó el plato con la solución PBS-Tween en un lavador de platos y se adicionaron 100 μL del conjugado (peroxidasa de rábano conjugado con anticuerpos monoclonales anti-IgG bovino) en cada pozo y se incubó a 37°C por 1 hora. Se repitió el lavado con la solución PBS-Tween y se adicionaron 100 μL de solución sustrato (Tetrametilbenzidina en tampón de substrato con H_2O_2), se incubó 10 minutos a 25°C. Se adicionaron 50 μL de solución de parada (Ácido sulfúrico 2M). Se midió la densidad óptica (DO) de los controles y las muestras a 450 nm en un espectrofotómetro para microplatos (BioTek® ELx800)

Análisis estadístico

De acuerdo con la DO se consideraron positivas a la presencia de anticuerpos contra la proteína del BLV (gp51) aquellas muestras que obtuvieron un valor positivo porcentual (PP) mayor o igual a 10 de acuerdo con los criterios del fabricante. Los resultados fueron tabulados en el paquete estadístico Excel® (Microsoft Office) mediante tablas, el análisis de los resultados se realizó de forma descriptiva.

RESULTADOS

Se estableció una prevalencia serológica total del 79,69% en los tres hatos evaluados. La mayor seroprevalencia se encontró en el hato 1 con un porcentaje de 82,86% ubicada en el municipio de Medellín, seguido del hato 2 con 80% de seropositividad en el municipio de Belmira y por último el hato 3 con 77,08% de seropositividad también ubicado en el municipio de Belmira (Cuadro 1). No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la presencia del virus y el hato (X^2c= 0,4215 P=0,8100 P>0,05), entre la presencia del BLV y el municipio (X^2c=0,2928 P=0,5885 P>0,05), ni entre la presencia del BLV y el número de parto (X^2c=7,6944 P=0,4639 P>0,05).

El Virus de la Leucosis Bovina tiene distribución mundial su tasa de prevalencia varía ampliamente entre países y continentes, en Estados Unidos y Europa la enfermedad es considerada como enzoótica. El BLV Tiene una alta prevalencia serológica en Estados Unidos uno de los principales productores de leche (83,9%) [14]. En Suramérica también se han encontrado altas seroprevalencias en muestras de suero sanguíneo, en Uruguay la seroprevalencia para BLV fue del 45% en vacas de recría en ganado lechero [15], en Brasil la seroprevalencia fue del 27,78% en bovinos con edades entre 11 y 15 años de edad [16], en Chile se han encontrado prevalencias serológicas del 23,9%

Cuadro 1. Seroprevalencia del BLV en tres 3 hatos lecheros del departamento de Antioquia.

Hatos	Número de vacas	ELISA+	ELISA -	Seropositivos (%)	Seronegativos (%)
Hato 1	35	29	6	82,86%	17,14%
Hato2	50	40	10	80,00%	20,00%
Hato 3	48	37	11	77,08%	22,92%

en predios chicos (<40 animales), 43,5% en predios medianos (40-200 animales) y del 83,3% en predios grandes (>200 animales) [17].

La prevalencia de anticuerpos en muestras de leche del presente estudio encontró un 79,69% de muestras antigénicamente positivas a la proteína gp51, Felmer *et al.,* (2006) encontró una prevalencia del 82,5% en muestras de leche del estanque predial [18]. Otro estudio realizado en Argentina encontró una seroprevalencia del 84% en muestras que también provenían de tanques de almacenamiento de leche [19]. Los resultados en muestras individuales y un "pull" de leche son similares; sin embargo, el manejo de muestras individuales permite detectar los individuos sanos de los infectados, lo cual es una estrategia para de desarrollo de planes de control de la enfermedad.

En el contexto nacional se han encontrado múltiples resultados de evaluaciones de la presencia del BLV en distintos departamentos, pero hasta el momento no se ha reportado la detección del virus en muestras de leche. En el municipio de montería se encontró una seroprevalencia del 21% en muestras de suero sanguíneo de animales que presentaban problemas reproductivos [20], siendo este valor menor respecto al encontrado en esta investigación, lo cual puede darse debido al tipo de sistema de producción, ya que se evaluó la seroprevalencia del virus en ganado cebuíno y en doble propósito y no en lechería especializada.

Betancur *et al.,* (2008) encontraron una mayor seropositividad en ganado doble propósito (82,9%) con respecto al ganado de carne (17,1%). Lo anterior puede explicarse debido a que el manejo ganadero en sistemas de producción de carne es extensivo, por lo cual no es tan frecuente la infección iatrogénica en el sistema; en contraste los sistemas de producción de leche intensiva o doble propósito en la cual durante el ordeño se requiere una alta intervención y manipulación de los animales que facilita la diseminación iatrogénica de partículas virales en el hato a través de la leche, equipos o manos de los operarios.

Se ha reportado que la leche de vacas infectadas presenta exosomas que contienen proteínas del BLV, que aunque "no son infecciosas" son transmitidas por una vía alternativa diferente de la infección viral y tienen un papel importante en la eliminación de proteínas del BLV a través de células infectadas [21]. En el Departamento de Antioquia la prevalencia serológica del BLV en hatos lecheros del Municipio de San Pedro de los Milagros, por medio de la técnica de AGID fue del 12,07%, encontrándose la mayor prevalencia en el grupo etario de 5 a 9 años [22]. Esta misma técnica fue aplicada en muestras de suero sanguíneo de la Sabana de Bogotá y de los Valles de Ubaté y Chiquinquirá, encontrándose una seroprevalencia del 45,28% [23].

Las técnicas de diagnóstico AGID y ELISA han sido aceptadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico serológico del BLV [3]; ambas técnicas detectan anticuerpos anti-BLV, los anticuerpos son generados por el estímulo que genera la infección viral la cual se desencadena como parte de respuesta inmune humoral frente a las proteínas inmunogénicas gp51 y p24 [6]. El valor de sensibilidad de la prueba ELISA para la detección del BLV en muestras de leche respecto al AGID fue del 100%, mientras que la especificidad fue del 51% [12]. Por lo tanto la técnica ELISA detecta el 100% de los animales verdaderamente infectados.

El aumento en la seroprevalencia del BLV en los hatos lecheros puede ser explicado por malas prácticas de manejo. La reutilización de agujas para procesos de vacunación [10], de guantes durante la palpación [25] o el descorne [26] ayudan a la diseminación del virus. Los toros con BLV pueden transmitir la infección a través del semen, en el cual se ha encontrado el genoma del virus [27]. Los insectos hematófagos como los tábanos (*Tabanus spp*) también se encargan de distribuir el virus entre los animales [28], pero aún se desconoce el papel de la mosca con cuernos (*Haematobia irritans*) y la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) que se presentan con mayor frecuencia en las producciones. Estas prácticas probablemente explican la diferencia entre las seroprevalencias encontradas en este trabajo con las reportadas por otros autores.

CONCLUSIONES

La seroprevalencia del BLV en muestras de leche de hatos lecheros del Antioquia fue del 79,69%, esta alta seroprevalencia indica la capacidad de diseminación del virus en los hatos lecheros. El diagnóstico serológico en leche del BLV se propone como alternativa de fácil uso para ser aplicada en los hatos lecheros.

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (131-137) Enero _ Junio 2017

REFERENCIAS

[1] WU, D., MURAKAMI, K., MOROOKA, A., JIN, H. and SENTSUI, H. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. Virus Research, 97(2), 2003, p. 81-87.

[2] DEES, C., GODFREY, V., SCHULTZ, R. and TRAVIS, C. Wild type p53 reduces the size of tumors caused by bovine leukemia virus infected cell. Cancer Letter, 101(1), 1996, p.115-122.

[3] ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE LA SALUD ANIMAL. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres [online]. 2012. Disponible: http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.04.10_Leucosis_bovina_enzo%C3%B3tica.pdf. [Citado 01 de Agosto 2016].

[4] MALATESTINIC, A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. Canadian Veterinay Journal, 44(8), 2003, p. 664-666.

[5] MARTIN, D., ARJONA, A, SOTO, I., BARQUERO, N., VIANA, M. and GÓMEZ-LUCÍA, E. Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health, 48(2), 2001, p. 97-106.

[6] GILLET, N., FLORINS, A., BOXUS, M., BURTEAU, C. *et al*. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. Retrovirology, 4(18), 2007, p. 1-32.

[7] SANTOS, S. 14 enfermedades sin control oficial atacan al ganado en Colombia [online]. 2014. Disponible: http://www.contextoganadero.com/reportaje/14-enfermedades-sin-control-oficial-atacan-al-ganado-en-colombia. [Citado 20 Mayo de 2016].

[8] ALARCÓN, G. Caracterización epidemiológica de los Efectos Adversos Seguidos a la Vacunación (EASV) producidos en el primer ciclo de vacunación de 2010 y análisis de la situación sanitaria de enfermedades no sujetas a control oficial (ENSCO) entre 2005 y 2009, de la especie bovina en Colombia [Tesis Médico Veterinario]. Medellín (Colombia): Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 2011, 26 p.

[9] ALARCÓN, G. Enfermedades reproductivas, un problema con muchas causas [online]. 2013. Disponible: http://www.contextoganadero.com/reportaje/enfermedades-reproductivas-un-problema-con-muchas-causas. [Citado 10 Mayo de 2016].

[10] ORTEGA. D., SÁNCHEZ, A., TOBÓN, J., CHAPARRO, Y., CORTÉS, S. and GUTIERRÉZ, M. Seroprevalence and risk factors associated with bovine leukemia virus in Colombia. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health, 8(5), 2016, p. 35-43.

[11] NEKOUEI, O., DUROCHER, J. and KEEFE, G. Diagnostic performance of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect bovine leukemia virus antibodies in bulk-tank milk samples. Canadian Veterinay Journal, 57(7), 2016, p.778-80.

[12] FELMER, R., ZÚÑIGA, J. and RECABAL, M. Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA y AGID en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de suero, sangre y leche. Archivos de Medicina Veterinaria, 38(2), 2006, p. 137-141.

[13] COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals [online]. 2012. Disponible: https://grants.nih.gov/grants/olaw/Guiding_Principles_2012.pdf. [Citado 20 Mayo de 2016].

[14] UNITED STATED DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Bovine Leukosis Virus (BLV) on U.S. Dairy Operations, 2007 [Online]. 2008. Disponible: https://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/dairy07/Dairy07_is_BLV.pdf. [Citado 02 de Agosto de 2016].

[15] ALGORTA, A. Leucosis bovina enzoótica en un campo de recría de ganado lechero en el sur del Uruguay [Ph.D Tesis en Ciencias Veterinarias]. Montevideo (Uruguay): Universidad de la República, Facultad de Veterinaria, 2014, 27 p.

[16] BIANCHI, I. Prevalência da leucose enzoótica bovina na região Norte Fluminense [MSc. Tese em Produção Animal]. Campos dos Goytacazes (Brasil): Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências de Tecnologias Agropecuárias, 2003, 26 p.

[17] GRAU, M. and MONTI, G. Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. Archivos de Medicina Veterinaria, 42(2), 2010, p. 87-91.

[18] FELMER, R., ZÚÑIGA, J., RECABAL, M. and CHÁVEZ, R. Diagnóstico y tipificación del virus de la leucosis bovina mediante una prueba de

PCR-RFLP a partir de ADN extraído desde células somáticas de la leche. Archivos de Medicina Veterinaria, 38(3) 2006, p. 253-257.

[19] MARIÑO, B., NOGUES, M., IGUZQUIZA, I., GUTIERREZ, S., RODRIGUEZ, N., ESTEBAN, E. and OCHHI, H. Prevalencia de tambos infectados con el Virus de la Leucosis Bovina (BLV) mediante determinación de anticuerpos en leche por ELISA 108. Revista FAVE-Ciencias Veterinarias, 2(2), 2003, p. 117-121.

[20] BETANCUR, C. and RODAS, J. Seroprevalencia del Virus de la Leucosis Bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. Revista MVZ Córdoba, 13, 2008, p. 1197-1204.

[21] YAMADA, T., SHIGEMURA, H., ISHIGURO, N. and INOSHIMA, Y. Cell Infectivity in Relation to Bovine Leukemia Virus gp51 and p24 in Bovine Milk Exosomes. PLOSone, 8(10), 2013, p. 1-7.

[22] AGUILAR, L. Prevalencia serológica de la Leucosis Enzoótica Bovina en hatos lecheros del municipio de San Pedro Antioquia [Tesis Médico Veterinario]. Medellín (Colombia): Universidad de Antioquia, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1989, 61 p.

[23] ALFONSO, R., ALMANSA, J. and BARRERA, C. Prevalencia serológica y evaluación de los factores de riesgo de la leucosis bovina enzoótica en la Sabana de Bogotá y los Valles de Ubaté y de Chiquinquirá, Colombia. Rev Sic Tech Off Int Epi, 17(3), 1998, p. 723-732.

[25] DIVERS, T., BATRTHOLOME, W. and GALLINGAN, D. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in commercial dairy herd. Preventive Veterinary Medicine, 23, 1995, p. 133-141.

[26] DIGIACOMO, R., DARLINGTON, R. and EVERMANN, J. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy calves by dehorning. Canandian Journal of Veterinary Research, 49(3), 1985, p. 340-324.

[27] DUS SANTOS, J., TRONO, K., LAGER, I. and WIGDOROVITZ, A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. Veterinary Microbiology, 119(1), 2007, p. 10-18.

[28] MANET, G., GUILBERT, X., ROUX, A., VUILLAUME, A. and PARODI, A. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (Tabanus spp.). Veterinary Immunology and Immunopathology, 22(3), 1989, p. 255-263.

doi: http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)138-143
CC BY NC ND
Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
ISSN - 1692-3561 | ISSN - 1909-9959 Vol 15 No. 1 (138-143) Enero _ Junio 2017

PROPIEDADES MECÁNICAS Y VISCOELÁSTICAS DE QUESO FRESCO ELABORADO CON LECHE DE BUFALA Y VACA

MECHANICAL PROPERTIES AND VISCOELASTICITY OF FRESH CHEESE MAKE FROM BUFFALO AND COW MILK

PROPRIEDADES MECÂNICAS E VISCOELASTICIDADE DE QUEIJO FRESCO PREPARADO COM BÚFALO E DO LEITE DE VACA

ROGER DE HOMBRE1, ARMANDO ALVIS-BERMUDEZ2*, CARLOS GARCÍA-MOGOLLON3

RESUMEN

El queso fresco es un derivado lácteo con alto contenido de humedad con características texturales como la firmeza, elasticidad y viscoelásticas, que son determinadas por la disposición espacial de sus componentes y las modificaciones durante el proceso. Se evaluaron las propiedades mecánicas de quesos frescos elaborados a partir de leche de búfala y vaca. Para ello se utilizó una prueba de compresión uniaxial entre platos paralelos del queso cortado en forma de cubo con 2 cm. El queso se comprimió a una velocidad de deformación de 20 cm/min hasta el 40% de su altura y se descomprimió a esa misma velocidad, cubriendo un ciclo completo de compresión-descompresión para determinar los módulos de deformabilidad, esfuerzo de compresión y el grado de recuperación elástica. En otro ensayo, cada queso se comprimió y se permitió su relajamiento durante 300 s. Se ajustó el modelo de normalizado de Peleg y Maxwell mediante regresión no lineal. De acuerdo con los resultados obtenidos puede decirse que el queso fresco

Recibido para evaluación: 14 de Julio de 2016. **Aprobado para publicación:** 11 de Octubre de 2016.

1 Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia, Ph.D. en Ciencias Técnicas, La Habana, Cuba

2 Universidad de Córdoba, Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de Vegetales. Ph.D. en Ingeniería. Montería, Colombia.

3 Universidad de Sucre, Facultad de Ingenierías, Grupo PADES. M.Sc. Ciencias Agroalimentarias. Montería, Colombia.

Correspondencia: aalvis2@hotmail.com

elaborado a partir de leche de búfala presenta valores del módulo elástico, el módulo de deformabilidad y el grado de recuperación elástica superiores al elaborado a partir de leche de vaca. Los quesos frescos son mucho más elásticos y de menor dureza.

ABSTRACT

The fresh cheese is a dairy derivative with high moisture content properties textural as firmness, elasticity and viscoelastic, which are determined by the spatial arrangement of its components and modifications during the process. We assessed mechanical properties of fresh cheeses made from the milk of Buffalo and cow. This was a test of uniaxial compression between parallel plates of cheese cut into cube with 2 cm. The cheese was compressed at a rate of deformation of 20 cm/min up to 40% of its height and go at that same speed, covering a complete cycle of compression-decompression. To determine the deformability, compressive stress and the degree of elastic recovery modules. In another trial, each cheese is compressed and allowed its relaxation during 300s. The model was adjusted for standardized Peleg and Maxwell using non-linear regression. According to the results we can say that the cheese made from buffalo milk presents values of the elastic modulus, deformability module and the degree of elastic recovery exceeding the made from cow's milk. The cheese is much more elastic and lower hardness.

PALABRAS CLAVE:
Lácteo, Textura, Deformabilidad, Test de relajación, Compresión.

KEYWORDS:
Milky, Texture, Deformability, Test of relaxation, Compression.

PALAVRAS-CHAVE:
Produtos lácteos, Textura, Deformabilidade, Teste de relaxamento, Compressão.

RESUMO

O queijo fresco é um derivado de laticínios, com elevado teor de humidade propriedades texturais firmeza, elasticidade e viscoelástico, que são determinados pelo arranjo espacial dos seus componentes e modificações durante o processo. Avaliamos as propriedades mecânicas de queijos frescos, feitas a partir do leite de vaca e o búfalo. Isto foi um teste de compressão uniaxial entre placas paralelas de queijo cortado em cubo com 2 cm. O queijo foi comprimido a uma taxa de deformação de 20 cm/min até 40% de sua altura e ir com essa mesma velocidade, cobrindo um ciclo completo de compressão-descompressão. Para determinar a deformabilidade, tensão de compressão e o grau de módulos de recuperação elástica. Em outro julgamento, cada queijo é comprimido e permitiu seu relaxamento durante 300s. O modelo foi ajustado para padronizada Pelegue e Maxwell usando regressão não-linear. De acordo com os resultados, podemos dizer que o queijo feito de leite de búfala apresenta valores do módulo de elasticidade, módulo de deformabilidade e o grau de recuperação elástica excedendo o feito do leite da vaca. O queijo é muito mais elástica e baixa dureza.

INTRODUCCIÓN

El queso fresco es un derivado lácteo con alto contenido de humedad, no madurado y sin conservantes. Estos quesos son producidos con leche pasteurizada y la adición de renina u otra enzima que promueva la

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (138-143) Enero _ Junio 2017

coagulación como resultado de la desestabilización de las micelas de caseína. De tal forma, que forma una fase acuosa (lactosuero) que es expulsada de la fase solida o cuajo [1]. La estructura del queso está determinada por la disposición espacial de sus componentes, en especial la caseína, la cual sufre modificaciones durante el proceso con una textura firme, elástica, esponjosa y muestra propiedades viscoelásticas [2]. La expectativa de los consumidores es obtener un queso fresco de características homogéneas y consistentes independiente de la producción; además de garantizar los parámetros de calidad, composición y autenticidad del tipo de queso [3,4]. Las propiedades mecánicas de importancia en la textura del queso como los módulos de deformabilidad, esfuerzo de compresión, grado de elasticidad y esfuerzo de fractura del queso pueden ser evaluadas mediante el ensayo de compresión uniaxial, métodos reológicos y fisicoquímicos con el objetivo de caracterizarlos [5,6]. Los datos acerca de las propiedades mecánicas de los quesos permiten obtener información acerca de su estructura y debido a que representan datos reológicos fundamentales [7, 8, 9, 10] y también se han aplicado los modelos al estudio del efecto de mejoradores de textura en queso [11, 12, 13, 14, 15] pueden servir como fuente comparativa entre productos similares. El modelo de Maxwell ha sido uno de los más utilizados para describir el comportamiento viscoelástico de diferentes tipos de queso. Los datos acerca de las propiedades mecánicas y viscoelásticas de los quesos permiten obtener información acerca de su estructura y debido a que representan datos reológicos fundamentales que pueden servir como fuente comparativa entre productos similares. El objetivo del presente trabajo es determinar las principales propiedades mecánicas como los módulos de elasticidad, deformabilidad y viscoelasticidad de quesos frescos elaborados con leche de búfala y vaca.

MÉTODO

Para elaborar los quesos se procedió al filtrado de la leche, aplicación del tratamiento térmico de 65 a 68ºC con enfriamiento hasta 32°C, adición de cloruro de calcio (20 g/L), cuajo y permanencia en reposo. La cuajada estuvo lista cuando al cortarla con un cuchillo se observaron sus bordes lisos y brillantes, el suero drenado fue de color amarillento y casi transparente. La cuajada obtenida se agitó y dejó en reposo durante cinco minutos. Se somete al desuero final separando el suero de la cuajada. Se sal, moldea en cubos 454 g, empaca y almacena en refrigeración. Se obtuvieron muestras de 5 producciones de queso fresco elaborado con leche de búfala y 5 producciones con leche de vaca, tomando 2 kg del producto en cada caso. Se realizaron tres tipos de pruebas de compresión uniaxial en una máquina Instron modelo 1140 para calcular el esfuerzo de compresión (σ_0) (Ec. 1), módulo de deformabilidad (ED) y el grado de elasticidad (E%). Se utilizó un aditamento de compresión de 5,8 cm de diámetro para comprimir el producto. La muestra de ensayo se cortó en forma de cubo de 2 cm de aristas y se comprimió a una velocidad de 20 cm/min hasta el 40% de su altura total a la temperatura de 10ºC con un área de compresión de 4x10-4 m^2. El grado de elasticidad se midió de acuerdo a la deformación recuperable una vez que se revierte el sentido de la compresión.

$$\sigma_o = \frac{F(t)}{A} \qquad \text{(Ec. 1)}$$

Donde F(t) es fuerza aplicada en el tiempo y el A área en el tiempo. Los datos de F vs. t obtenidos fueron además normalizados (Ec. 2) según la expresión:

$$Y(t) = \frac{Fo - F(t)}{Fo} \qquad \text{(Ec. 2)}$$

Donde F_0 son las fuerzas de compresión al inicio, de esta forma se pueden obtener las curvas normalizadas del modelo de Peleg (Ec. 3) del tipo:

$$\frac{t}{Y} = \frac{1}{ab} + \frac{t}{a} \qquad \text{(Ec. 3)}$$

Para obtener los parámetros a (nivel de caída del esfuerzo) y b (Velocidad inicial de relajación) que son características del material.

Para el estudio de relajación y calcular las constantes del modelo de Maxwell (Ec. 4), los cubos de queso se comprimieron hasta el 40% de su altura y se permitió su relajación hasta los 300 s.

$$\sigma\ t = \varepsilon_o \left[E_e + E_1 . \exp\left(-\frac{t}{\lambda_1}\right) + E_2 . \exp\left(-\frac{t}{\lambda_2}\right)\right] \qquad \text{(Ec. 4)}$$

Para determinar el módulo elástico en el equilibrio (E_e), los módulos elásticos parciales (E_1 y E_2), los tiempos de relajación $\lambda 1$ y $\lambda 2$ se procesaron estadísticamente mediante el Programa Statistica (StatSoft, 2007) para ajuste de modelo no lineal.

RESULTADOS

Módulo de deformabilidad (E_D)

Para la compresión uniaxial del queso fabricado con leche de búfala, el valor promedio de la fuerza máxima de compresión fue de $F_0 = 16{,}0 \pm 3$ N y su módulo de deformabilidad de 100,0 kPa. Para el queso elaborado con leche de vaca se obtuvo $F_0 = 12{,}0 \pm 2$ N y $E_D = 75$ kPa. Estos resultados son muy superiores a los obtenidos en queso fresco acidificado por un cultivo estárter [16] y en queso Murcia al vino [8]. En cuanto a las diferencias que se presentan entre ambos quesos frescos puede decirse que el elaborado con leche de búfala tiene mayor esfuerzo de compresión por lo que resulta más duro, lo cual puede deberse a las características propias de la leche empleada que presenta mayor contenido en proteínas. La relación entre el contenido de proteínas y la textura del queso ha sido ampliamente discutida y a pesar de que no se puede generalizar [4], los quesos con bajo contenido de humedad y alto en proteínas muestran alta resistencia a la ruptura; además, de las variaciones en la tecnología aplicada por los manufactureros [8]. En general altos valores de esfuerzo indican una mayor dureza, una matriz resistente y menos quebrantable. Los resultados de los quesos elaborados con leche de búfala y vaca indican un menor deformabilidad que los obtenidos en quesos tipo Minas Frescal [4, 16, 17].

Modelo de Peleg

El modelo normalizado de Peleg mostró un ajuste significativo ($p<0{,}001$) a la regresión lineal para determinar sus parámetros a y b (Cuadro 1). De acuerdo con los valores de *a* se establece que ambos quesos son de naturaleza viscoelástica, dada su proximidad a uno; mientras que el parámetro b cuando es próximo a cero el esfuerzo no se relaja totalmente y estamos en presencia del sólido elástico ideal [2]. El valor de b relativamente bajo indica que el componente elástico es de mayor influencia y este parece ser el caso que se presenta en este estudio comparado con los reportados en queso Minas Frescal [4] con valores de *b* del orden de 0,4 a 0,3 s^{-1} (*a* de 0,5 a 0,9) con humedad media mayor a 55 g/100 g y valores de *b* del orden de 0,5 a 0,3 s^{-1} (*a* de 0,05 a 0,1) [16] y humedad media mayor a 60 g/100 g, indicando una tendencia a ser más viscosos que elásticos.

El grado de elasticidad o recuperación elástica se llevó a cabo obteniendo un $72{,}5 \pm 9{,}5\%$ en queso de búfala y $68{,}0 \pm 8{,}2\%$ en queso de leche de vaca. Valores que son superiores a los obtenidos en queso edam [2] en su primer día de maduración, lo cual indica que el queso fresco es mucho más húmedo y la cuajada, que no ha sufrido cambios apreciables de estructura, es más esponjosa y tiene propiedades elásticas más acentuadas que los quesos madurados. Los valores elevados del grado de recuperación elástica que se obtuvieron indican que la textura de estos tipos de quesos es muy elástica. Las diferencias entre ambos tipos de quesos frescos para los parámetros a y b no son apreciables y todo lo cual indica que no son muy diferentes desde el punto de vista estructural; sin embargo, los quesos a partir de leche de búfala con su mayor contenido de proteína produce estructuras menos porosas o más densas comparadas con el queso de leche de vaca [18].

Modelo de Maxwell

El modelo de Maxwell se ajustó satisfactoriamente ($p < 0{,}001$) para los quesos frescos de búfala ($R^2=0{,}99$) y vaca ($R^2=0{,}99$) indicando que es adecuado para evaluar su comportamiento reológico (Cuadro 2). Los módulos elásticos E_e son ligeramente inferiores a lo presentado en quesos Port Salut (8,0 kPa), Tybo (10,0 kPa) [19] y en Minas Frescal (8,89 kPa) [17,20] que a su vez son de pasta blanda y semiduro respectivamente**.** Este parámetro es mucho menor si se compara con el queso Reggianito (85,0 kPa) [19] que se cataloga como queso duro, compacto y frágil con baja humedad (35%).

Cuadro 1. Parámetros modelo de Peleg.

Parámetro	Búfala	Vaca
Humedad (%)	52±1%	48±1%
a	0,85	0,86
b (s-1)	0,15	0,17
R2	0,99	0,99

Cuadro 2. Parámetros modelo de Maxwell.

Queso	Ee (kPa)	E1 (kPa)	E2 (kPa)	λ1 (s)	λ2 (s)
Búfala	6,1	95,4	122,4	29,7	1,19
Vaca	5,2	82,0	105,0	35,0	2,42

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial
Vol 15 No. 1 (138-143) Enero _ Junio 2017

CONCLUSIONES

Los quesos frescos elaborados a partir de leche de búfala y vaca presentaron similares propiedades mecánicas asociadas a su viscoelasticidad. Los modelos de Peleg y Maxwell pueden ser utilizados para explicar este comportamiento. Los quesos son mucho más elásticos y de menor dureza.

REFERENCIAS

[1] CHROMIK, C., PARTSCHEFELD, C., JAROS, D., HENLE, T. and ROHM, H. Adjustment of vat milk treatment to optimize whey protein transfer into semi-hard cheese: a case study. Journal of Food Engineering, 100(3), 2010, p. 496-503.

[2] BUNKA, F., PACHLOVÁ, V., LPERNICKÁ, L., IVA BUREŠOVÁ, I., KRÁCMAR, S. and LOŠÁK, T. The dependence of Peleg's coefficients on selected conditions of a relaxation test in model samples of edam cheese. Journal of Texture Studies, 44, 2013, p. 187–195.

[3] HICKEY, C.D., AUTY, M.A.E., WILKINSON, M.G. and SHEEHAN, J.J. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localization and their interactions during ripening: a review. Trends Food Science Technology, 41(2), 2015, p. 135-148.

[4] MAGENIS, R.B., PRUDÊNCIO, E.S., FRITZEN-FREIRE, C.B., STEPHAN, M.P., SILVIO DO EGITO, A. and DAGUER, H. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. Food Control, 45, 2014, p. 22–28.

[5] HOLLAND, B., YAZDI, S.R., TITAPICCOLO, G.I. and CORREDIG, M. Separation and quantification of caseins and casein macropeptide using ion-exchange chromatography. Journal of Dairy Science, 93(3), 2010, p. 893-900.

[6] TUNICK, M. and VAN HEKKEN, D. Rheology and texture of commercial queso fresco cheeses made from raw and pasteurized milk. Journal of Food Quality, 33, 2010, p. 204-215.

[7] CHEN, L. and OPARA, U.L. Texture measurement approaches in fresh and processed foods d a review. Food Research International, 51, 2013, p. 823-835.

[8] PASCUA, Y., KOC, H. and FOEGEDING, E. A. Food structure: roles of mechanical properties and oral processing in determining sensory texture of soft materials. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 18, 2013, p. 324-333.

[9] FRANCO, I., BARGIELA, V., CARBALLO, J. and TOVAR, C. Relationship between viscoelastic and physicochemical parameters in cebreiro cheese (PDO). Journal of Food Research, 2(3), 2013, p. 1-10.

[10] KOC, H., VINYARD, C.J., ESSICK, G.K. and FOEGEDING, E.A. Food oral processing: conversion of food structure to textural perception. Annual Review of Food Science and Technology, 4, 2013, p. 237-266.

[11] ALBENZIO, M., SANTILLO, A., CAROPRESE, M., BRAGHIERI, A., SEVI, A. and NAPOLITANO, F. Composition and sensory profiling of probiotic *Scamorza* ewe milk cheese. Journal of Dairy Sciene, 96(5), 2013, p. 2792–2800.

[12] STIEGER, M. and VAN DE VELDE, F. Microstructure, texture and oral processing: new ways to reduce sugar and salt in foods. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 18, 2013, p. 334-348.

[13] COOKE, D., KHOSROWSHAHI, A. and MCSWEENEY, P. Effect of gum tragacanth on the rheological and functional properties of full-fat and half-fat Cheddar cheese. Dairy Science and Technology, 93, 2013, p. 45–62.

[14] SKEIE, S., ALSETH, G.M., ØSTLIE, H., ABRAHAMSEN, R.K., JOHANSEN, A.G. and ØYAAS, J. Improvement of the quality of low-fat cheese using a two-step strategy. International Dairy Journal, 33(2), 2013, p. 153-162.

[15] CASTRO, A.C., NOVOA, C.F., ALGECIRA, N. y BUITRAGO, G. Reología y textura de quesos bajos en grasa. Revista de Ciencia y Tecnología, 22, 2014, p. 58-66.

[16] FRITZEN-FREIRE, C.B., MÜLLER, C.M.O., LAURINDO, J.B., and PRUDÊNCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of minas frescal cheese. Journal of Food Engineering, 96(4), 2010, p. 621-627.

[17] VERRUCK, S., SCHWINDEN, E., OLIVERA, C., FRITZEN-FREIRE, C. and CASTANHO-AMBONI, R. Influence of Bifidobacterium Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. Journal of Food Engineering, 151, 2015, p. 34-42.

[18] ONG, L., DAGASTINE, R.R., KENTISH, S.E. and GRAS, S.L. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. LWT – Food Science and Technology, 44, 2011, p. 1291–1302.

[19] BERTOLA, N., BEVILACQUA, A., CALIFANO, A. and ZARITZKY, N. Propiedades mecánicas y viscoelásticas de quesos argentinos. La Habana (Cuba): Memorias I Coloquio Internacional de Propiedades Físicas de Alimentos, Proyecto 11.5 del Programa CYTED, p. 4-10.
[20] SAINT-EVE, A., PANOUILLÉ, M., CAPITAINE, CH., DÉLÉRIS, I. and SOUCHON, I. Dynamic aspects of texture perception during cheese consumption and relationship with bolus properties. Food Hydrocolloids, 46, 2015, p. 144-152.