

# Agroindústria *para o* MERCOSUL



Edição 2009 do  
Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia

# Agroindústria *para o* MERCOSUL



**Edição 2009 do  
Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia**

Brasília, novembro de 2009

Os autores são responsáveis pela escolha e apresentação dos fatos contidos neste livro, bem como pelas opiniões nele expressas, que não são necessariamente as da UNESCO, nem comprometem a Organização. As indicações de nomes e a apresentação do material ao longo deste livro não implicam a manifestação de qualquer opinião por parte da UNESCO a respeito da condição jurídica de qualquer país, território, cidade, região ou de suas autoridades, nem tampouco a delimitação de suas fronteiras ou limites.

# Agroindústria *para o* MERCOSUL

## Edição 2009 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia



Organização  
das Nações Unidas  
para a Educação,  
a Ciência e a Cultura

Representação  
no Brasil

RECyT



Ministerio de  
Ciencia, Tecnologia  
e Innovación Productiva  
Presidencia de la Nación



Gobierno Bolivariano  
de Venezuela  
Ministerio del Poder Popular  
para Ciencia, Tecnología e  
Industria Innovadora



PATROCÍNIO PATROCINIO



Ministério da  
Ciência e Tecnologia



© 2009 Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO).

*Revisão de português:* Sandra Nui

*Revisão de espanhol:* Ana Luiza Couto e Enrique Elias

*Diagramação, projeto gráfico e capa:* Edson Fogaça

Agroindústria para o MERCOSUL: edição 2009 do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia. – Brasília: UNESCO, MBC, MCT, RECyT/MERCOSUL, CNPq, 2009.

216 p.

ISBN: 978-85-7652-109-9

BR/2009/PI/H/10

1. Agroindústria 2. Desenvolvimento Agrícola 3. Mercosul 4. América Latina I. UNESCO II. Movimento Brasil Competitivo III. Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia IV. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Organização  
das Nações Unidas  
para a Educação,  
a Ciência e a Cultura

**Representação no Brasil**

SAS, Quadra 5, Bloco H, Lote 6,  
Ed. CNPq/IBICT/UNESCO, 9º andar  
70070-914 – Brasília/DF – Brasil

Tel.: (55 61) 2106-3500

Fax: (55 61) 3322-4261

E-mail: grupoeditorial@unesco.org.br

# SUMÁRIO

Agradecimentos .....	7
Abstract .....	9
PRÊMIO MERCOSUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA Chamada 2009 .....	11
TRABALHOS PREMIADOS	
<i>Categoria Iniciação Científica</i>	
Madebag: Obtención y caracterización de un material aglomerado, utilizando el bagazo de la <i>Saccharum officinarum</i> , aglutinado con un pegamento derivado de la fécula .....	15
<i>Categoria Estudante Universitário</i>	
Otimização de protocolos de cultivo em larga escala e obtenção de compostos bioativos de <i>Hypericum polyanthemum</i> nativo do sul do Brasil .....	41
<i>Categoria Jovem Pesquisador</i>	
Concentração de extratos de própolis por nanofiltração .....	69
<i>Categoria Integração</i>	
Aprovechamiento integral de efluentes de quesería para la elaboración y preservación de probióticos .....	91

## TRABALHOS AGRACIADOS COM MENÇÃO HONROSA

### *Categoria Iniciação Científica*

BALINUFIBRA – Una nueva alternativa de  
aprovechamiento del banano en la Agroindustria . . . . .117

### *Categoria Estudante Universitário*

Selección de inóculos para la producción de vinagre de miel . . . . .141

### *Categoria Jovem Pesquisador*

Tecnología sustentable para extracción de aceites a partir de semillas  
oleginosas: aplicación de solventes no contaminantes en condiciones  
de alta eficiencia y no inflamabilidad . . . . .157

### *Categoria Integração*

Efeito de extratos de resíduos de uva (*Vitis labrusca*) na inibição  
da oxidação lipídica em carne de frango cozida armazenada  
sob refrigeração . . . . .175

Nota sobre os autores . . . . .203

Nota sobre os membros da Comissão de Avaliação . . . . .213

# AGRADECIMENTOS

À Comissão de Avaliação dos trabalhos concorrentes ao Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia, constituída por representantes indicados pelas coordenações da Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia – RECyT de cada país-membro do Mercosul, que esteve reunida no escritório da UNESCO, em Brasília, no período de 6 a 9 de outubro de 2009, para analisar e selecionar os trabalhos premiados em quatro categorias.

Ao grupo técnico, constituído por especialistas pertencentes às instituições organizadoras do Prêmio.

Ao Movimento Brasil Competitivo (MBC), parceiro na organização e na execução desse Prêmio, e ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), patrocinadores do Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia de 2009.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse Prêmio.

## **Comissão de Avaliação**

Professor Ary Mergulhão Filho  
*Presidente da Comissão, UNESCO/Brasil*

Professor Héctor Pralong  
*Representante da RECyT/Argentina*

Professora Concepta McManus  
*Representante da RECyT/Brasil*

Professor Francisco Frederico  
Sparenberg Oliveira  
*Representante da RECyT/Brasil*

Professor Manlio Silvestre Fernandes  
*Representante da RECyT/Brasil*

Professora Rosa Oviedo de Cristaldo  
*Representante da RECyT/Paraguai*

Professor Daniel Bayce Muñoz  
*Representante da RECyT/Uruguai*

## **Grupo Técnico da Comissão de Avaliação**

Adriana Anunciatto Depieri  
*MCT/Brasil*

Alessandra Monteiro Porn  
*MBC/Brasil*

Aline de Marco – *UNESCO/Brasil*

Eleni Roberta da Silva  
*UNESCO/Brasil*

Eliana Cardoso Emediato  
de Azambuja – *MCT/Brasil*

Fernanda Magalhães – *MCT/Brasil*

Michele Knop – *UNESCO/Brasil*

Rafaela Marques – *UNESCO/Brasil*

Rita de Cássia da Silva – *CNPq/Brasil*

Tatiana Ribeiro – *MBC/Brasil*



## ABSTRACT

The Mercosur Science and Technology Award was established in 1998 by the Science and Technology Specialised Meeting – RECyT /Mercosur. In its sixth edition, the call for submissions was launched on 31<sup>st</sup> March of 2009, with partnership from UNESCO and MBC (Brazilian Competitive Movement), and sponsorship from MCT (Brazilian Ministry of Science and Technology) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). The goal of the Award is to recognize and award prizes to the best pieces of work from researchers that represent potential contribution to scientific and technological development of Mercosur countries. It also provides incentives for scientific and technological research to be carried out, directed at the regional integration process amongst the countries in the block. In 2009, Agribusiness was chosen as the topic with four categories: *Scientific Initiation* for students of upper secondary education up to 21 years of age, *University Student* for higher education undergraduates with no age limit, *Young Researcher* for graduated scholars of up to 35 years of age and *Integration* for teams that have graduated, with no age limit and involving at least two different countries. This book presents work that won the Award in the four categories and all received Honours in each category.

# PRÊMIO MERCOSUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA – Chamada 2009

O investimento em ciência e tecnologia é um dos pilares para a promoção do desenvolvimento e a promoção da igualdade social. Uma política estável de desenvolvimento científico e tecnológico impulsiona o crescimento econômico, possibilita o desenvolvimento e a inclusão social, além de inserir o país no cenário internacional com equilíbrio, igualdade e capacidade de competir nos mercados internacionais.

O Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia tem o objetivo de fomentar a cooperação técnico-científica entre os países participantes do bloco Mercosul (efetivos e associados) por intermédio do reconhecimento do trabalho de estudantes secundários, estudantes universitários, jovens pesquisadores e equipes de pesquisa que representem contribuição direta ao desenvolvimento científico e tecnológico da região. Deseja-se dar a oportunidade para que pesquisadores e instituições de ensino e pesquisa dos diversos países possam mostrar o seu trabalho e oferecer subsídios para o desenvolvimento da região.

O Prêmio serve como estímulo para o desenvolvimento de pesquisas de interesse dos países do Mercosul, propicia oportunidades de cooperação técnico-científica entre instituições de ensino e pesquisa e direciona a inteligência instalada e os trabalhos para problemas e necessidades específicas vividas pelos integrantes do bloco.

Na edição de 2009, o tema escolhido foi Agroindústria. Entende-se que **Agroindústria** é o ramo de indústrias que processa ou beneficia matéria-prima oriunda da agricultura, pecuária, aquicultura ou silvicultura e a vende como produto para consumo ou matéria-prima para outras indústrias. Foram recebidos 194 trabalhos provenientes de todos os países membros efetivos do bloco Mercosul.

Esperamos que o espírito de cooperação técnica, econômica e cultural seja crescentemente a base de apoio do Mercosul, e que o esforço conjunto empreendido pelas instituições e pelos pesquisadores participantes do Prêmio seja insumo para uma política que propicie a integração e desenvolvimento para a região.

Em 2009, o Prêmio Mercosul de Ciência e Tecnologia foi promovido pela Reunião Especializada de Ciência e Tecnologia para o Mercosul (RECyT) em parceria com a UNESCO e o Movimento Brasil Competitivo (MBC), e patrocinado pelo Ministério de Ciência e Tecnologia do Brasil (MCT), e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

São apresentados, a seguir, os trabalhos premiados nas quatro categorias.

### **1º Lugar – CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

*Trabalho:* Madebag: Obtención y caracterización de un material aglomerado, utilizando el bagazo de la Saccharum officinarum, aglutinado con un pegamento derivado de la fécula

*Autores:* Brian Samir Ginés Bejarano, 17 anos, e Walter Israel Martinez Cantero, 15 anos, alunos do primeiro ano do curso do ensino médio científico do Colégio Iberoamericano

*Professora-orientadora:* Fanny Elizabeth Florentín de Gonzalez, 42 anos

*País:* Paraguai

### **1º Lugar – CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO**

*Trabalho:* Otimização de protocolos de cultivo em larga escala e obtenção de compostos bioativos de Hypericum polyanthemum nativo do sul do Brasil

*Autora:* Jéssica de Matos Nunes, 21 anos, brasileira, aluna do 8º semestre do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Professora-orientadora:* Gilsane Lino von Poser, 50 anos

*País:* Brasil

### **1º Lugar – CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR**

*Trabalho:* Concentração de extratos de própolis por nanofiltração

*Autora:* Beatriz Camargo Barros de Silveira Mello, 26 anos, brasileira, aluna de doutorado em engenharia de alimentos na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

*País:* Brasil

### **1º Lugar – CATEGORIA INTEGRAÇÃO**

*Trabalho:* Aprovechamiento integral de efluentes de quesería para la elaboración y preservación de probióticos

*Autores:* Alejandra Londero, 27 anos, argentina, bióloga; Anália Graciela Abraham, 48 anos, argentina, doutora em ciências bioquímicas; Andrea Gómez-Zavaglia, 40 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências

Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Andrés Illanes Frontaura, 61 anos, chileno, doutor em engenharia bioquímica; Angela Maria León Peláez, 41 anos, colombiana, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Carlos Andrés Serna Cataño, 24 anos, colombiano, engenheiro de alimentos; Edilson Arley Quintero Yepes, 24 anos, colombiano, engenheiro de alimentos; Emiliano Javier Kakisu, 32 anos, argentino, doutorando em ciências biológicas; Emma Elizabeth Tymczyszyn, 33 anos, argentina, doutora da Universidade de Buenos Aires; Graciela Liliana de Antoni, 60 anos, argentina, doutora em ciências bioquímicas; Graciela L. Garrote, 39 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; María de los Angeles Serradell, 35 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Marina Alejandra Golowczyc, 32 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Oscar Esteban Gerbino, 28 anos, argentino, doutorando da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Pablo Mobili, 34 anos, argentino, doutor da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Pablo Fernando Pérez, 48 anos, argentino, doutor em bioquímica; e Paula Carasi, 25 anos, argentina, doutoranda em microbiología.

*Países:* Argentina, Chile e Colômbia

### **Menção Honrosa – CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

*Trabalho:* BALINUFIBRA – Una nueva alternativa de aprovechamiento del Banano en la Agroindustria

*Autoras:* Wilma Pamela Villamayor Gallardo, 15 anos, e Celeste Maria Giselle Cáceres Espínola, 15 anos, alunas do 1º Bachillerato Científico do Colegio Nacional EMD Asunción Escalada

*Professora-orientadora:* Carmen María Jiménez de Céspedes, 45 anos

*País:* Paraguai

### **Menção Honrosa – CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO**

*Trabalho:* Selección de inóculos para la producción de vinagre de miel

*Autora:* Natalia Draper Pastorino, 26 anos, uruguaia, aluna do quinto año do curso de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Química da Universidade da República

*Professora-orientadora:* Silvana Vero Mendez, 46 anos

*País:* Uruguai

### **Menção Honrosa – CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR**

*Trabalho:* Tecnología sustentable para extracción de aceites a partir de semillas oleaginosas: aplicación de solventes no contaminantes en condiciones de alta eficiencia y no inflamabilidad

*Autor:* Pablo Ezequiel Hegel, 30 anos, argentino, doutor em engenharia química pela Universidad Nacional del Sur - CONICET

*País:* Argentina

### **Menção Honrosa – CATEGORIA INTEGRAÇÃO**

*Trabalho:* Efeito de extratos de resíduos de uva (*Vitis labrusca*) na inibição da oxidação lipídica em carne de frango cozida armazenada sob refrigeração

*Autores:* Carmen Josefina Contreras Castillo, 52 anos, peruana, doutora em tecnologia de alimentos; Ligianne Din Shirahigue, 28 anos, brasileira, mestre em ciência e tecnologia de alimentos e Miriam Mabel Selani, 24 anos, brasileira, mestranda em ciência e tecnologia de alimentos;

*Países:* Brasil e Peru

## CATEGORIA

### INICIAÇÃO CIENTÍFICA

---

1º Lugar

**MADEBAG: Obtención y caracterización de un material aglomerado, utilizando el bagazo de la *Saccharum officinarum*, aglutinado con un pegamento derivado de la fécula**

***Autores:***

Brian Samir Ginés Bejarano, 17 anos, e Walter Israel Martinez Cantero, 15 anos, alunos do primeiro ano do curso do ensino médio científico do Colégio Iberoamericano

***Professora-orientadora:***

Fanny Elizabeth Florentín de Gonzalez, 42 anos

***País:*** Paraguai

# MADEBAG: Obtención y caracterización de un material aglomerado, utilizando el bagazo de la *Saccharum officinarum*, aglutinado con un pegamento derivado de la fécula

## RESUMEN

Se procedió a investigar un método efectivo para el reciclaje del bagazo resultante del procesamiento de la azúcar, obtenido de la planta *Saccharum officinarum*, considerando que son exiguos los usos que se le otorgan al citado producto, que constituye un 30% de toda la producción de la caña de azúcar.

Se zanjó obtener un material aglomerado con características semejantes a la madera, ya que actualmente existen innúmeros problemas ambientales por el indiscriminado uso de los árboles; haciendo a la vez más rentable la fabricación de la azúcar.

Para la producción del aglomerado las fibras de la caña de azúcar son entrelazadas por el polímero natural lignina, el cual es reaccionado con hidróxido sódico hidrolizado al 5% por un periodo de 20 minutos, y posteriormente son sometidas a un proceso de ebullición, para disgregar los compuestos albuminoides, las resinas, que acompañan a los polisacáridos que forman la pared de las células del bagazo. La masa resultante es aglutinada empleando un pegamento realizado a partir de la fécula de la mandioca reaccionada con hidróxido sódico, cloruro sódico y ácido bórico, empleando agua como plastificante.

Para lograr la aglutinación se mezcla una cantidad equivalente de 40% de pegamento, con un 60% de masa prima; lo que es comprimido y luego evaporado a 180° C. Posteriormente se realiza un multilaminado, empleando el aglomerado.

El producto resultante es caracterizado con normas de carácter internacional, lo que permite comprobar la hipótesis formulada, es decir, es asequible el aprovechamiento del bagazo para la realización de un aglomerado.

# Parte I

## INTRODUCCIÓN

La *Saccharum officinarum* es una planta cultivada ampliamente en zonas tropicales y subtropicales del planeta, ya que de la misma se extrae uno de los disacáridos más importantes en la dieta humana, que es la sacarosa.

El procesamiento físico-químico de la caña de azúcar involucra el resultante de un 70% de azúcar y un 30% de bagazo, que es considerado como un desperdicio que posee exiguos usos en la industria; si bien la amplia disponibilidad del mismo abre un abanico de posibles aprovechamientos que tengan un efecto positivo tanto a nivel industrial, en lo que concierne al sector industrial, y al sector de contribución social, ya que el hecho de lograr utilizar un residuo se traduce en la posibilidad de obtener cifras considerables de un producto que compense determinadas necesidades.

El bagazo es un residuo leñoso compuesto principalmente por fibras y determinados polímeros como la lignina, el cual presenta una composición estructural interesante para la realización de tableros de partículas, conocidos comúnmente como aglomerados, los cuales logran imitar características propias de la madera.

Para realizar el aglomerado es necesario un vehículo aglutinante, para lo cual es necesario emplear un pegamento que sea derivado de un recurso natural, que posea dos caracteres fundamentales, los cuales son la disponibilidad y el impacto ambiental que cause su uso, por lo cual se tiene como principal referencia a la fécula obtenida a partir de la mandioca.

En lo que atañe a la madera, es saludable subrayar que actualmente, los altos índices de deforestación en el contexto nacional e internacional son preocupantes, convergiendo en un hecho sólido, que es el detrimento a la naturaleza.

Los problemas ambientales y económicos demandan que se puedan aprovechar cabalmente los recursos provenientes de la agricultura, a los efectos de satisfacer necesidades desde la óptica del aprovechamiento responsable.



## JUSTIFICACIÓN

La industria de la azúcar es un exponente importante en las agroindustrias, ya que produce uno de los artículos más necesitados en la dieta común de una persona, por lo que su producción es de cifras muy grandes.

La producción mundial de caña de azúcar en el 2005 fue de 1.267 millones de toneladas, y considerando que el 30% de la producción total termina constituyendo al bagazo, lo cual se traduce en que más de 380 millones de toneladas terminan como desecho. Dicho desecho es empleado como combustible en los ingenios azucareros, debido a su poder calorífico. No obstante, generan gran cantidad de materiales contaminantes, y nocivos para el bienestar ambiental. En este aspecto es saludable subrayar que no toda la biomasa es utilizada, sino que una considerable cuantía es desechada, generando un desequilibrio ambiental.

La elaboración de un material con características semejantes a la madera, permitiría disminuir la dependencia de los árboles, los cuales son componentes cardinales del ecosistema; actuando como consumidores del dióxido de carbono presente en el ambiente, y productores del oxígeno por medio de la fotosíntesis.

El objeto de este proyecto, que es la realización de una madera a partir del bagazo, permitiría la utilización del bagazo para el aprovechamiento social, ya que se lo podría utilizar para efectuar productos de uso cotidiano, como sillas, mesas, pupitres, y otras utilidades, utilizando un material que es considerado como un residuo.

## OBJETIVOS

### *Objetivo general:*

Obtener un material aglomerado empleando el bagazo resultante del procesamiento de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), desarrollando un producto beneficioso para la industria de la madera.

### *Objetivos específicos:*

- Realizar una indagación teórica-referencial sobre el bagazo.
- Obtener el bagazo de un determinado ingenio azucarero de Paraguay.
- Desarrollar un método para el procesamiento del bagazo.
- Desarrollar un aglutinante para las fibras del bagazo, empleando como materia prima una fuente orgánica.

- Realizar un material compacto, con características semejantes a la madera.
- Realizar análisis de caracterización, con asesoramiento de entidades reconocidas.
- Realizar un análisis de aplicabilidad, costos y de impacto ambiental.

*Contexto problemático:*

Las industrias producen desechos, que son resultantes del proceso de fabricación de determinados productos, como la azúcar. El inconveniente se nuclea en el hecho de que se crean cantidades considerables de desechos – considerándolos desde una perspectiva primaria, no obstante aprovechables para la realización de artículos que satisfagan necesidades.

La caña de azúcar es un recurso empleado asiduamente para la realización de la azúcar, el cual a la vez es un componente esencial en la dieta del ser humano. Los procesos físico-químicos involucrados generan el material primordial que es la sacarosa, y un residuo que es el bagazo.

**Problema planteado**

*Considerando las propiedades del bagazo:*

¿Es posible la realización de un producto con características semejantes a la madera, a partir del aglomerado de las fibras del bagazo aglutinadas por medio un pegamento orgánico?

**Hipótesis formulada**

El bagazo resultante del procesamiento del *Saccharum Oofficinarum* para la obtención de azúcar, es un material utilizable para la elaboración de un producto conglomerado sólido, el cual es desarrollado por medio de procesos químicos y físicos que permiten la desestructuración del bagazo en bruto, empleando posteriormente como aglutinantes a un pegamento elaborado a partir de la fécula de mandioca, y a la lignina presente en la constitución estructural natural del bagazo.

**Variables presentes**

Independiente: Determinar un método para la obtención de un material conglomerado con características semejantes a la madera a partir del bagazo resultante del procesamiento de la caña de azúcar.

- Bagazo de la caña de azúcar

Dependiente: Cuando se somete a unos procesos químicos y físicos determinados el bagazo presenta una desestructuración de la celulosa que forma parte de su tejido, lo que posteriormente se aglomera con pegamentos orgánicos, para formar un tablero de partículas.

## Parte II

### ENFOQUE TEÓRICO REFERENCIAL

*La Saccharum officinarum (Caña de azúcar) [A]*



Caña de azúcar en bruto, preparada para ingresar al ingenio

La caña de azúcar es una planta proveniente del sudeste asiático. La expansión musulmana supuso la introducción de la planta en territorios donde hasta entonces no se cultivaba. Así llegó al continente europeo, más en concreto a la zona costera entre las ciudades de Málaga y Motril, siendo esta franja la única zona de Europa donde arraigó. Posteriormente los españoles llevaron la planta, primero a las islas

Canarias, y luego a América. Así este cultivo se desarrolló en países como Brasil, México, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela, que se encuentran entre los mayores productores de azúcar del mundo.

El jugo de su tronco es la principal fuente de azúcar. Después de cosechar la caña, pasa bajo unas cuchillas desmenuzadoras, para luego pasar al trapiche. Este jugo es depurado por una serie de filtros; a continuación, se somete a un tratamiento clarificante y de ahí se coloca en tachos de cocción al vacío, donde se concentra el jugo; por último, se cristaliza la azúcar del jugo. Una vez cristalizada la azúcar, se extrae el agua restante quedando así la azúcar blanca común que se conoce habitualmente.

Diferentes microorganismos asociados a sus raíces pueden fijar el nitrógeno atmosférico, lo que permite su cultivo en muchas zonas sin aporte de abonos nitrogenados.

### *Proceso industrial para la obtención de la caña de azúcar*

La caña llega al ingenio donde se extrae el jugo, éste se clarifica y luego se cristaliza para separar el azúcar. La extracción se hace generalmente en un molino que pasa la caña entre tres o cuatro masas de acero, que exprimen los tallos y sacan todo el jugo. El residuo sólido fibroso se llama bagazo y es empleado como fuente de energía en las calderas de los ingenios azucareros.

#### **EL BAGAZO**



Bagazo en bruto

El bagazo es una fibra que queda después de la extracción de la azúcar. La palabra “Bagazo” proviene del francés *Bagage*, que originariamente significaba “basura” o “desecho”. Aplicado en primer lugar a los residuos del prensado de las aceitunas, las nueces de palma y las uvas. La palabra se utilizó posteriormente en el sentido de los residuos de la planta procesadoras de la caña de azúcar,

el sisal, etc. Actualmente, la palabra se limita al producto final del molido de la caña de azúcar.

En el escenario cambiante y que integra cada vez más el uso de los materiales agrícolas con las disciplinas de punta se abre un importante camino para la explotación de los polímeros naturales contenidos en el bagazo de la caña de azúcar. La celulosa, la lignina y las hemicelulosas constituyentes de la biomasa de esta planta representan aproximadamente el 53, 22 y 25% respectivamente del material. La celulosa y la lignina son los polímeros naturales más abundantes de la tierra y ellos requieren de la mayor atención de nuestro trabajo científico por sus enormes potencialidades para suministrar de forma combinada productos fibrosos y/o excelentes productos químicos y farmacéuticos en bienestar del hombre y su entorno.

La celulosa es similar en todas las plantas. La estructura de la lignina en el caso del bagazo difiere sustancialmente de la presente en las maderas, conformada por unidades fenólicas donde los principales anillos son del tipo p-hidroxicinámico y en menor proporción unidades siringílicas y guaiaicílicas, su composición se relaciona más con las ligninas de las plantas

anuales, y en ese sentido sus hemicelulosas son del tipo xilano todo lo cual será importante para referirnos a potencialidades y usos.

La disponibilidad de bagazo actualmente se estima en algo más de 200 millones de ton (50% humedad) y su uso más generalizado es como combustible en el propio central azucarero y más recientemente se utiliza de forma creciente para la cogeneración de energía. La operación eficiente y con buenas prácticas del central azucarero permite a su vez en determinadas condiciones generar hasta un 30% de bagazo sobrante del cual se puede disponer para numerosas aplicaciones industriales de gran valor agregado. La mayor disponibilidad corresponde a Asia (40%) seguidos por Sur América (22,9%) y Centro América (18%).

En general se acepta que actualmente solo el 16% del bagazo está industrializado y sus usos han ido evolucionando y las industrias que fueron las mayores consumidoras del bagazo industrializado hoy no experimentan significativos crecimientos pasando por un complejo período de remodelación más que de crecimiento mientras otras, resultado del constante progreso tecnológico comienzan a hacerse sentir, integrándola a los productos biotecnológicos, la salud y la alimentación entre otros.

## Parte III

### ENFOQUE EXPERIMENTAL

#### MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

La metodología empleada se constituye de la siguiente manera: observación en el laboratorio y en los contextos generales de trabajo de campo; deducción e inducción teniendo como referencia al método científico.

#### Planificación de actividades en el marco temporal

PERIODO TEMPORAL	ACTIVIDAD	ESPECIFICACIONES
2/3/09 – 30/3/09	Recolección de datos bibliográficos	La investigación se enfoca en los productos aglomerados, y el bagazo
2/4/09 – 16/4/09	Recolección de datos bibliográficos	Los datos recolectados son referentes a las féculas

PERIODO TEMPORAL	ACTIVIDAD	ESPECIFICACIONES
18/4/09 – 18/5/09	Desarrollo de las fórmulas químicas y aplicación	Las formulas son elaboradas a partir del contexto empírico y literario
20/5/09 – 18/6/09	Obtención cabal del aglomerado	El aglomerado debe estar constituido por materiales orgánicos
22/6/09 – 15/9/09	Caracterización del aglomerado	Se podrá contactar con especialistas de normalización paraguaya
20/7/09 – 25/8/09	Escritura del informe de laboratorio	Se deben conjugar los recursos
28/8/09 – presente	Evaluación general	El informe podrá pasar por modificaciones

### TRABAJO DE GABINETE

Obtención de informaciones, por medios bibliográficos e informáticos, referentes a:

- Proceso de elaboración de la azúcar
- La caña de azúcar
- Productos de madera
- El bagazo
- Definiciones de aglomerado
- Normas internacionales referente a las tablas de fibras

### SELECCIÓN MUESTRA

*Objeto de estudio:*

El bagazo, producto fibroso resultante de la fabricación de la azúcar.

*Provisor:*

El bagazo es suministrado por la fábrica de azúcar AZPA (Azucarera Paraguaya S.A.).

### *Contexto geográfico:*

La Azucarera Paraguaya S.A. se encuentra ubicada en la ciudad de Tebicuary, que es un distrito del departamento de Paraguarí-Paraguay, distante a aproximadamente 149 km de Asunción.

### *Observaciones:*

Es saludable subrayar que el bagazo producido en la Azucarera Paraguaya se encuentra dentro de los parámetros comunes de procesamiento químico y físico, con respecto a la fabricación de la azúcar. Por lo que se puede considerar que no habrán variaciones significativas en cuanto a las características químicas, con relación al bagazo de otros ingenios azucareros.

## TRABAJO DE LABORATORIO

*Obtención del tablero de partículas a partir del bagazo de la caña de azúcar*

### **Disgregación de las fibras del bagazo**

#### *Reactivos:*

- 1- 100 g de bagazo
- 2- 25 g de hidróxido de sodio en gránulos
- 3- 200 ml de agua

#### *Materiales:*

- 1- Vaso de precipitados de 200 cm<sup>3</sup>
- 2- Mezcladora electromecánica
- 3- Balanza electrónica
- 4- Pipeta de 10 cm<sup>3</sup>
- 5- Termómetro de mercurio
- 6- Mechero de bunsen

### *Procedimiento operatorio:*

Primeramente se miden 60 ml. Dde agua natural utilizando la el vaso de precipitados, al que se le agrega la cantidad de 2 g de hidróxido de sodio, previamente pesado con la balanza con sensibilidad al gramo, posteriormente se mezclan manualmente los ingredientes especificados por un periodo de 3 minutos, con un promedio de 50 revoluciones por minuto. La mezcla de hidróxido de sodio con el agua se logra fácilmente, ya que el hidróxido sódico es higroscópico, por lo que aumenta su capacidad de disolverse en un medio acuoso.

A la lejía cáustica se le agrega el bagazo, y se lo somete a un proceso de maceración con calor por 30 minutos, para lo cual se utiliza el mechero de Bunsen como abastecedor de la energía calorífica.

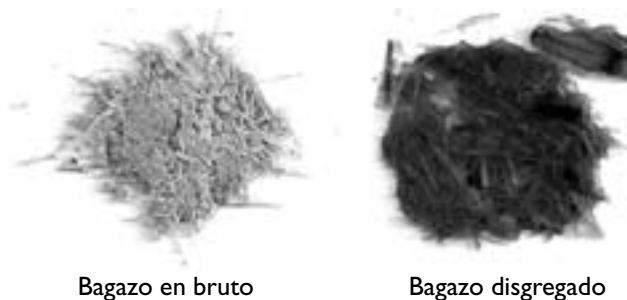
La temperatura promedio debe oscilar entre los 270 °C. respectivamente durante el proceso que tiene una duración total de 20 minutos, teniendo como indicador principal de culminación de la maceración la ebullición a presión atmosférica normal.

#### *Análisis e interpretación del resultado*

La disgregación de las fibras del bagazo permiten disolver algunos compuestos albuminoides, resinas, pectonasas y otros hidratos de carbono que acompañan a los polisacáridos que forman la pared de las células vegetales de la *Saccharum officinarum*, y a la lignina que se encarga de mantener unidas a los filamentos.

La lignina aumenta de manera ostensible en la pared celular de la caña de azúcar con el curso de la maduración, es resistente a la degradación bacteriana, y su contenido en fibra reduce la digestibilidad de los polisacáridos fibrosos, por lo que el hecho de lograr que sea soluble, considerando que es hidrófobo, permite reutilizarlo en condiciones diferentes a las que se presentan en la constitución incipiente, pero provechosas para que actúe como factor de aglutinación de las fibras del bagazo.

En la ilustración se puede observar la constitución en bruto del bagazo, y del bagazo disgregado.



### TRITURACIÓN MECÁNICA DE LA FIBRA

#### *Químico:*

1- 150 cm<sup>3</sup> de bagazo con fibras disgregadas

#### *Materiales:*

1- Mezcladora electromecánica  
2- Filtro de micromalla de metal



### *Procedimiento operatorio:*

El bagazo disgregado se introduce gradualmente a la mezcladora electrónica por 3 minutos.

La mezcladora electromecánica consta de tres aspas, un gancho para agitación circular y velocidad de rotación planetaria con una frecuencia de 50 Hz a 60 Hz.

Las fibras trituradas, según los respectivos procedimientos, son filtradas manualmente empleando el filtro de micromalla.

### *Análisis e interpretación del resultado*

La trituración mecánica permite potenciar la disgregación iniciada con el hidróxido sódico en una solución acuosa sometida a la maceración con calor, ya que permite que las fibras de celulosa puedan mezclarse con las resinas y otros polímeros. Las fuerzas utilizadas en la reducción de tamaño son: la compresión, el cizallamiento, la percusión o impacto y la atricción.

Debido al proceso de disgregación los compuestos aglutinantes pueden penetrar en las regiones amorfas, y como la celulosa es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa; es pues un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido), lo que lo hace rígido e insoluble en agua, por lo que no presenta una disgregación cabal, manteniendo caracteres específicos.



Bagazo procesado

Las fibras son trituradas correctamente por 3 minutos – como consta en la ilustración subsecuente, ya que el tiempo al que fueron sometidas es el suficiente como para que las aspas distribuyan su efecto a toda la pasta prima.

## DESARROLLO DEL PEGAMENTO ORGÁNICO A PARTIR DE LA FÉCULA

### *Reactivos:*

- 1- Agua natural
- 2- Fécula de almidón
- 3- Hidróxido de sodio
- 4- Ácido bórico

### *Materiales:*

- 1- Receptáculo
- 2- Varilla
- 3- Mezcladora electrónica
- 4- Vaso de precipitados

*Fórmula:*

A. Agua.....	1,2 l
Fécula .....	0,8 kg
B. Hidróxido de sodio.....	0,02 kg
Agua .....	0,4 l
C. Cloruro de sodio.....	0,12 kg
Ácido bórico .....	0,005 kg
D. Agua .....	1 l
Ácido muriático .....	0,16 l
E. Formol al 30% .....	0,025 l
Agua .....	0,025 l

*Procedimiento operatorio*

Para obtener el pegamento primeramente se deslíe la fécula en el agua (A), lo que se logra progresivamente. Luego se agrega una solución de hidróxido sódico, vertiéndola en forma de lluvia sobre la lechada de la fécula (B). En pocos minutos se forma un engrudo opaco, muy espeso e irregular, el cual bajo la acción del dispositivo mezclador, se vuelve perfectamente homogéneo, transparente, muy viscoso y muy tenaz.

El ácido bórico, adicionado en las debidas condiciones, tiene la propiedad de aumentar la viscosidad de los almidones. Pero no debe introducirse sino en la segunda fase de la fabricación, es decir, al agregar el agua de la dilución y antes de proceder a la neutralización con ácido. Como el ácido bórico es poco soluble en el agua, se hace hervir un peso de agua igual a diez veces el ácido bórico (C), y se hecha en el agua cuando ésta hierve; se malaxa continuamente, y se agrega cuando el ácido bórico se haya disuelto cabalmente, acompañado por el cloruro de sodio.

Para neutralizar el pegamento, ya que éste queda muy básico, se emplea ácido muriático, el cual se adiciona después de la dilución de la masa (D).

Finalmente, se añade lentamente el formol (E), y se almacena el pegamento en un recipiente con obturador, a los efectos de evitar una prematura evaporización.

*Análisis e interpretación del resultado*

El pegamento obtenido, presenta una viscosidad y un poder de aglutinación interesante, y se encuentra dentro del rango necesario para la realización del aglomerado de las fibras, ya que el mismo entra en interacción con otros

polímeros al ser mezclado con la pasta prima, siendo el principal polímero la lignina.

El pegamento soporta fuertes diluciones gracias a su gran viscosidad, es muy aglutinante y se seca con bastante rapidez, gracias a la presencia de cloruro de sodio, ya que aumenta su densidad.

El agua que es empleada como plastificante, penetrando en las regiones amorfas, inicia un hinchamiento, y es reaccionada con el hidróxido sódico. La cantidad de plastificante reduce las fuerzas intermoleculares, tales como los puentes de hidrógeno haciendo el material más flexible y menos resistente, por lo que la cantidad de agua es reducida.

Una propiedad resaltante de la fécula de mandioca es la semicristalinidad donde la amilopectina es el componente dominante para la cristalización en la mayoría de los almidones. Con relación a lo dicho, las partes amorfas están compuestas por regiones ramificadas de amilopectina y amilosa.

Las propiedades de resistencia mecánica y flexibilidad, dependen de la resistencia y del carácter de la región cristalina, la cual depende de la relación de amilosa y amilopectina, de la distribución del peso molecular, del grado de ramificación y del proceso de conformación de cada componente del pegamento, que se califica como un polímero, teniendo en cuenta que el resultante consiste en unidades estructurales unidas.

## ADHERENCIA DE LAS FIBRAS DEL BAGAZO

### Procedimiento operatorio

#### Químicos

- 1- 100 g de pasta prima
- 2- 40 ml de pegamento orgánico

#### Materiales:

- 1- Vaso de precipitados de 200ml
- 2- Balanza electrónica
- 3- Prensa de doble husillo
- 4- Prensa hidráulica vertical
- 5- Receptáculo de 500 cm<sup>3</sup>

Se pesa la cantidad de 100 g de pasta prima utilizando la balanza electrónica con sensibilidad al gramo; asimismo se registra la cantidad de 40 ml de pegamento orgánico por medio del vaso de precipitados.

Se sitúa la pasta prima en bruto dentro del vaso de precipitados, que contiene el pegamento orgánico, y posteriormente se procede a realizar un

malaxamiento manual por 5 minutos, con el propósito de lograr la penetración del aglutinante en las regiones amorfas, lo cual es apreciable por la disminución en la birrefringencia.

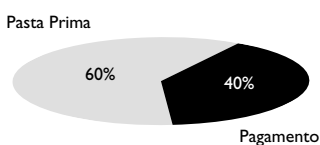
La fuerza aplicada y la solvatación producida por las fuerzas de aglutinación son factores importantes a producirse en el malaxamiento. Posteriormente se somete a la masa resultante a la prensa de doble husillo variadas ocasiones, con el objeto de alcanzar una homogeneidad adecuada.

La fuerza aplicada y la solvatación producida por las fuerzas de aglutinación son factores importantes a producirse en el malaxamiento. Posteriormente se somete a la masa resultante a la prensa de doble husillo variadas ocasiones, con el objeto de alcanzar una homogeneidad adecuada.

La masa aglutinada se deja reposar por 30 minutos, en un receptáculo abierto, con el objeto de que cantidades de agua desalojen las cadenas del almidón, y el producto se presente de manera más compacta, lo que facilitaría el proceso de prensado, ya que el mismo requiere que el material presente una estructura corporal mayormente maleable y elástica. Después es comprimido con la prensa hidráulica vertical por un periodo de 2 minutos, y dispuesta en planchas de un grosor de 3 mm.

#### *Análisis e interpretación del resultado*

La pasta prima empleada se presenta húmeda, lo que permite que fuese más fácil realizar la mezcla del aglutinante, que es el pegamento derivado de la fécula, obtenido con el proceso indicado anteriormente, el cual actúa entrelazando las fibras, de una manera en que los filamentos se adhieran por contacto superficial, teniendo una fijación de carácter mecánico.



La afinidad del adhesivo por el material es consistente, lo que es deducible al observar la homogeneidad estructural de la pasta adicionada.

### **AGLOMERACIÓN DE LA MASA PRIMA**

#### *Químicos:*

- 1- 1 kg de masa prima*
- 2- 0,25 g de pegamento orgánico*

#### *Materiales:*

- 1- Receptáculo*
- 2- Balanza digital*
- 3- Estufa a gas*
- 4- Varilla de metal*
- 5- Prensa hidráulica vertical*

### *Procedimiento operatorio*

Se procede a pesar una cantidad de 1 kg de masa prima, para lo que se emplea la balanza electrónica con sensibilidad al gramo.

Posteriormente se procede a colocar la pasta prima en un recipiente con capacidad de albergar 5 kg. Posteriormente, se le adiciona el pegamento orgánico, el cual se malaxa manualmente con la varilla de metal, por un periodo de 10 minutos.

Empleando la prensa de doble husillo, se malaxa la aglomeración hasta obtener una visible homogeneidad estructural.

Posteriormente, se introduce la aglomeración a la prensa hidráulica vertical, y se exprime, a los efectos de entrelazar las cadenas de fibra. El tamaño requerido es de 3 mm por plancha. Después se diseccionan en planchas de 10 cm x 10 cm. Luego se introdujo las citadas laminas a la estufa a 270 °C por 25 minutos, a los efectos de evaporar los líquidos plastificantes del pegamento.

### *Análisis e interpretación del resultado*

El proceso de aglomeración permite que, al utilizar la prensa, el pegamento, la lignina y los otros polímeros y resinas presentes en el bagazo, ingresen en las regiones amorfas de la celulosa, lo cual es capaz debido a que dichos compuestos están disueltos, por las determinadas acciones físicas y químicas involucradas en los precedentes procesos. El resultado es observable en las siguientes ilustraciones.

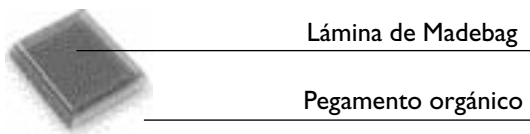
## REALIZACIÓN DEL MULTILAMINADO



### *Procedimiento operatorio*

Las láminas de Madebag de 5 cm x 5 cm x 1 mm son aglutinadas por los lados que se entrelazan, y posteriormente son prensadas con una prensa hidráulica vertical, por un tiempo de 5 minutos, con el objetivo de entrelazar

transversalmente una lámina sobre otra lámina, de acuerdo a la ilustración tridimensional (4).



Estructura tridimensional de la lámina aglutinada

Posteriormente se agrupan de modo a crear un multilaminado, de una cantidad total de 4 capas. El contrachapado resultante es prensado utilizando la prensa hidráulica vertical, por 5 minutos, después son sometidos a una fuerza de 2 kg/cm<sup>2</sup> por 12 horas, a los efectos de alcanzar una adecuada aglutinación y fraguado.

#### *Análisis e interpretación del resultado*

El multilaminado es una técnica que permite mejorar la estabilidad dimensional del tablero, concediendo una estructura mayormente rígida, y con una distribución más uniforme del peso, que tiene resultados en la resistencia.

El pegamento empleado aglutina a las láminas de Madebag, pero a la vez otorga una capa protectora de la humedad, y una superficie acentuada al crearse una capa de pegamento seco.

El pegamento tiene la cualidad de ser impermeable, por lo que transmite dicha cualidad a la estructura del Madebag, sin necesidad de que eso modifique caracteres específicos del producto final.

La repartición del pegamento con respecto a las láminas es observable en la ilustración tridimensional.



#### CLASIFICACIÓN DEL AGLOMERADO SEGÚN NORMA INTERNACIONAL

Utilizando como referencia la norma española UNE 56.707, se define que aglomerado obtenido a partir del bagazo es un tablero de partículas PP-PP/M-LIJADO, considerando lo subsecuente:

**PP:** El proceso de entrelazamiento de filamentos de las fibras es realizado por medio de un prensado plano, para lo que se emplea la prensa hidráulica vertical.

**PP/M:** Con el objeto de obtener un producto con mayor resistencia, se realiza el multilaminado, por lo que corresponde a la clasificación de Tableros de capas múltiples, que en el caso del Madebag es de una cifra de 6 capas de 0,3 cm.

**LIJADO:** Para obtener una superficie lisa, más consistentes en cuanto a la penetración de líquidos y a la humedad en general, se realiza un proceso de lijado a la superficie del multilaminado.

## DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA FLEXIÓN

### *Probetas*

*1- 10 aglomerados de 1,5 cm de grosor, 5 cm de ancho, y 10 cm de largo x 5 cm.*

### *Procedimiento operatorio:*

La norma UNE 56.711 tiene por objeto indicar el modo de realizar el ensayo para determinar la resistencia a la flexión de los tableros de partículas.

Los aparatos necesarios para la realización del ensayo son un aparato provisto de dos apoyos cilíndricos paralelos de más de 50 mm de longitud y de 25 +- 0,5 mm de diámetro, así como de una cabeza de carga, de altura regulable, de forma cilíndrica cuya longitud y diámetro sean iguales a los de los apoyos y que esté situada paralelamente a ellos.

Primeramente se acondicionan las probetas según la norma UNE 56.708.

Posteriormente, se procede a realizar la prueba como indica la norma UNE 56.711.

### *Resultado obtenido:*

Las pruebas demostraron que la resistencia a la tracción, que es una característica físico-mecánica, es de 158 KGH/CM<sup>2</sup>, en un promedio general.

El resultado demuestra que es posible la utilización del aglomerado para la realización de determinados productos de uso cotidiano, como las mesas, sillas, y otros que tengan una necesidad de resistencia semejante.

Si bien, es saludable subrayar que es posible que se agregue al aglomerado una chapa de madera con características ansiotrópicas, a los efectos de lograr una mejor resistencia.



Ensayos al aglomerado

## Capítulo IV

### MARCO APLICATIVO

#### ANÁLISIS DE LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS

##### *Ventajas*

Empleando el aglomerado a partir del bagazo se realiza una contribución a la comunidad, ya que se plantea la posibilidad de realizar productos de amplio uso y necesidad en el contexto social, como pupitres para colegios, mesas, y otros artículos de gran demanda.

Utilizando el Madebag se reduce el impacto ambiental que causa el indiscriminado uso de los árboles, reduciéndose a la vez la dependencia de los troncos leñosos.

El aglomerado es un material estable y de consistencia uniforme.

El tablero de fibras es obtenido utilizando el bagazo, el cual es un desecho de la industria de la azúcar, que posee determinados usos, los cuales son limitados y muy poco asequibles.

El aglomerado presenta un procesamiento simple, donde todos los productos empleados, como el pegamento y el bagazo, son abundantes en el escenario regional.

El tablero de partículas, considerando su procesamiento de manufacturación, permite que se le apliquen características, tanto mecánicas y química, agregando sustancias, que cedan una propiedad específica, como ser el color, la resistencia, aumento del grado de piro-resistencia, y otros caracteres.

El pegamento formulado es bastante interesante, ya que es realizado con un polisacárido de fácil obtención, como lo es el almidón, que es obtenido mayoritariamente a partir del tubérculo de la mandioca.



Se logra una mayor rentabilidad con respecto a la producción de la azúcar, industria en la que países del Mercosur como Argentina y Brasil figuran entre los mayores productores del mundo. En este aspecto es necesario subrayar que el 30% de toda la producción de la caña de azúcar constituye el bagazo.

El material obtenido puede sustituir en variadas aplicaciones a productos de madera, considerando su constitución estructural.

#### *Desventajas*

El bagazo es obtenido después del procesamiento de la caña de azúcar, lo cual se encuentra subordinado a los periodos de zafra, por lo que no es posible contar con el material, en grandes cantidades iguales, en todos los meses del año.<sup>1</sup>

La utilización del hidróxido sódico puede presentar un efecto higroscópico, el cual es mínimo considerando el porcentaje que demandan las formulas correspondientes.

### **ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL**

El Madebag es un producto que se realiza con la utilización de materias primas oriundas de la naturaleza, como lo son el bagazo y el pegamento que se realiza a partir del almidón; por lo que es posible afirmar que el provecho material que se logra se encuentra dentro de la responsabilidad ambiental, y dentro de la responsabilidad social, contribuyendo al acervo comunitario.

Para lograr una determinada ponencia con referencia al impacto ambiental, se procedió a presentar el proyecto a la Secretaria Nacional de Medio Ambiente, para lo que se contactó con el Dr. Alcides Vergara, quien hizo una incipiente evaluación del impacto ambiental.

El Dr. Vergara se refirió al Madebag como una interesante propuesta para la agroindustria comprometida con el medio ambiente, indicando que permite el reciclaje productivo de un producto de poco uso para la realización de un producto con características semejantes a la madera.

Uno de los aspectos que el Dr. Vergara resaltó en el proceso de obtención del aglomerado es la utilización de hidróxido sódico, el cual, según afirmó, se debe encontrar en porcentajes muy bajos para evitar detrimentos a la naturaleza.

1. No obstante, esto es relativo, ya que la cantidad del 30% de una zafra mínima de 1 t es equivalente a 300 kg de bagazo en bruto.

## ANÁLISIS DE APLICABILIDAD Y CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO SOCIAL

El tablero aglomerado de bagazo presenta un procesamiento simple, teniendo en cuenta los reactivos necesarios y el tiempo de desarrollo. Los químicos usados son accesibles de obtener, y las cantidades expresadas por fórmula son las adecuadas, desde la perspectiva ambiental y de aprovechamiento.

La caña de azúcar obtenida, a nivel nacional, es de una cantidad de 3.526.000 t, que es equivalente a 1.057.800 toneladas de bagazo en bruto, que pueden ser empleadas para elaboración de miles de láminas de Madebag, las cuales podrían usarse para la construcción de materiales de uso masivo, como lo son las sillas, mesas, techos para casas, revestimientos, y una plétora más de utensilios.

En lo que atañe a la producción a nivel industrial el producto presenta un procesamiento, en lo que respecta a lo mecánico, semejante al utilizado para la producción normal de los aglomerados, por que el Madebag puede ser producido con la tecnología existente en las fabricas de tableros, sin necesidad de incorporar otro tipo de maquinas.

Lo que es diferente, y permite convertir al bagazo en un producto apto para la elaboración de las láminas de partículas es el hecho de que se han configurado una serie de procesos químicos adecuados para el fin principal que es la obtención de un material con características semejantes a la madera, que pueda sustituir, en determinados aspectos, el uso de maderas provenientes de árboles, que tienen un papel fundamental en el ecosistema.

Otro aspecto importante con relación a la aplicabilidad, se trata del pegamento utilizado como aglutinante el cual es hecho a partir del almidón, recurso que se encuentra a disposición en grandes cifras, ya que es muy simple de fabricarlo, como un derivado de tubérculos como la mandioca o la papa, los cuales a la vez son plantados en grandes cantidades en territorio de América del Sur.

Utilizar los recursos provenientes de la agricultura para poder desarrollar productos que satisfagan las necesidades – las cuales en el ser humano no son simplemente alimentarias –, nos introduce a lo que se considera una agricultura con efectos cabales.

## ANÁLISIS DE RENDIMIENTO Y RENTABILIDAD

Teniendo en cuenta que el 30% del total de la caña cosecha constituye el bagazo, es fácil percatarse de la abundancia del citado recurso fibroso en

el escenario regional, considerando que varios países del Mercosur se encuentran como líderes en la producción del azúcar, que es un hidrato de carbono muy necesario en la dieta humana.

Por hectárea, utilizando como referencia los promedios de producción, se cosechan 40 t de *Saccharum officinarum*, lo que se traduce en 12 t de bagazo, lo que evidencia su abundancia, y por consiguiente demuestra la posibilidad de utilizarlo en grandes porciones.

De esta manera 12.000 kg. de bagazo pueden producir una cantidad equivalente a 16.800 kg de Madebag, cifra que corresponde al bagazo sumado con el pegamento derivado de la fécula.

Para la fabricación de una silla, se necesitaría la cantidad de 8 kg de Madebag, por lo que es posible interpretar que con 16.800 kg. se podrían fabricar una cantidad aproximada de 2.100 sillas por hectárea, de un producto que es reciclado.

A parte de los beneficios que causa el tablero de partículas, en el contexto ambiental, social, es importante subrayar el beneficio que causa en el contexto económico, pues al reciclar el bagazo se está haciendo más rentable la producción de la azúcar, la cual tiene incidencia a nivel de industria de procesamiento, y a nivel de agricultura.

## ANÁLISIS DE COSTOS

Para realizar un análisis adecuado de costos, se ha recurrido a utilizar como referencia los costos del proyecto, lo que significa que los expresados en la tabla subsecuentes pueden ser menores, pues una producción industrial significaría una compra masiva de insumos, lo que podría permitir que los precios sean inferiores a los calculados. Los costos corresponden a una lámina de 10 m de ancho, 10 m de largo, y 2,0 cm de grosor.

Concepto	Unidad	Cantidad	Valor Unit. G.	Total G.	Valor Unit. US\$	Total US\$
I. COSTOS DIRECTOS						
A. Insumos técnicos						
1. Bagazo	Kilogramo	5	200	1000	0,04	0,20
2. Fécula de mandioca	Kilogramo	1	1850	1850	0,37	0,37

Concepto	Unidad	Cantidad	Valor Unit. G.	Total G.	Valor Unit. US\$	Total US\$
3. Agua	Litro	3,5	50	175	0,01	0,03
4. Hidróxido sódico	Gramo	35	8	280	0,0016	0,05
5. Ácido bórico	Gramo	10	16	80	0,0032	0,016
6. Ácido muriático	Gramo	10	0,002	0,020	0,00002	0,0002
7. Cloruro sódico	Gamo	100	2,5	250	0,00002	0,002
8. Formol	Mililitro	25	15	375	0,003	0,075
II. COSTOS INDIRECTOS						
A. Bienes mecánicos						
1. Triturador mecánico	Hz / l kg	5	20	100	0,02	0,1
B. Bienes caloríficos						
1. Estufa	T / l kg	5	30	150	0,006	0,03
TOTAL:				4.260,02		0,8732

## PERSPECTIVAS DE INDUSTRIALIZACIÓN

Todos los procedimientos mecánicos empleados para la realización del aglomerado son los mismos con lo que se realizan otros tipos de aglomerados; lo que hace que pueda ser posible la elaboración del aglomerado no es meramente el procesamiento mecánico, sino que el procesamiento químico, tanto en lo que respecta a la producción del pegamento y a el disgregamiento de las fibras del bagazo.

En el presente proyecto la iniciativa principal es el desarrollo de un conjunto de respectivos procesos que permitan el aprovechamiento del bagazo, para la elaboración de un producto con características semejantes a la madera, específicamente tableros de partículas, sin necesidad de emplear químicos derivados del petróleo para lograr la aglutinación, para lo cual se optó por la fécula de mandioca, considerando la abundancia del mismo.

El proceso químico es lo que varía con respecto a la elaboración de otros tipos de aglomerados, pues es necesario un mecanismo químico que se ajuste al bagazo; y como se pretende que el producto sea saludable con el ambiente, es necesario plantear una forma diferente de adquirir el pegamento.

Sería muy hacedera la industrialización del proceso a razón de que se emplean técnicas sencillas, pero eficientes para elaborar un producto de gran demanda.

## CONCLUSIÓN

El bagazo, que es el residuo resultante del procesamiento de la caña de azúcar, mediante determinados procesos, permite la obtención de un material aglomerado, lo que confirma la hipótesis propuesta.

El procesamiento para conseguir el aglomerado consiste en la disgregación de las fibras del bagazo con hidróxido sódico disuelto en agua en una fórmula de 59% de bagazo, 39% de agua y 2% de hidróxido sódico (2%), lo que se deja en maceración en caliente, para disolver algunos compuestos albuminoides, resinas, pectonasas, y otros hidratos de carbono que acompañan a los polisacáridos que forman la pared de las células vegetales de la *Saccharum officinarum*, y a la lignina que se encarga de mantener unida a la celulosa.

La disgregación permite que los compuestos aglutinantes puedan surtir efecto, si bien como la celulosa es un polisacárido compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa, es un homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido), lo que lo hace rígido e insoluble en agua, por lo que no presenta una disgregación cabal, manteniendo caracteres específicos.

Posteriormente, se somete al bagazo a una trituración electromecánica por 3 minutos a 60 Hz, lo que reduce los filamentos, siendo las acciones involucradas la compresión, el cizallamiento, la percusión o impacto y la atricción.

El pegamento desarrollado con la fécula de mandioca reaccionada con hidróxido sódico, ácido bórico y cloruro sódico, y empleando agua como plastificante, presenta una viscosidad y un poder de aglutinación interesante, y se encuentra dentro del rango necesario para la realización del aglomerado de las fibras, ya que el mismo entra en interacción con otros polímeros al ser mezclado con la pasta prima, siendo el principal polímero

la lignina. La aglomeración consiste en la penetración de pegamento (40%) en las regiones amorfas de las fibras del bagazo (60%), lo que luego es prensado para entrelazar los filamentos. Subsecuentemente, el resultante es sometido a un poder calorífico de 270 °C por 25 minutos, con lo que se consigue la evaporación del plastificante, y la consiguiente culminación del procesamiento para la obtención del aglomerado. Las láminas de 3 mm son posteriormente superpuestas a los efectos de formar un tablero multilaminado de 3 cm.

Los objetivos fueron logrados a cabalidad, considerando los resultados, tanto en lo que atañe a la parte tangible (la madera de bagazo), y en lo que concierne a la indagación teórica.

El aglomerado y el pegamento obtenido forman parte fructífera de la agroindustria, ya que la elaboración de los mismos consiste en el desarrollo de nuevos productos aprovechables desde la óptica de la contribución al desarrollo de procesos ambientalmente amigables.

## BIBLIOGRAFIA

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA (2009). *Bagasse*. Retrieved from Encyclopædia Britannica Online: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/48728/bagasse>> on 23 August 2009.

MOREDA, C.; FERNÁNDEZ, N. *New Generation Products from Bagasse*. II Conferencia anual de la OIA. Islas Mauricio, Mayo 27, 1997.

SYMPOSIUM PAPERS. *Energy from Biomass and Waster VIII*. Lake Buena Vista, Florida, Jan 30, 1984.

TELLOWS, P. *El bagazo*. Tecnología del Procesado de los Alimentos, Principios y Prácticas. Editorial Acribia, S.A., España, 1994.

## CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO

---

1º Lugar

### OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CULTIVO EM LARGA ESCALA E OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM* NATIVO DO SUL DO BRASIL

***Autora:***

Jéssica de Matos Nunes, 21 anos, brasileira, aluna do 8º semestre do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

***Professora-orientadora:***

Gilsane Lino von Poser, 50 anos

***País:*** Brasil

# OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS DE CULTIVO EM LARGA ESCALA E OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM* NATIVO DO SUL DO BRASIL

## RESUMO

O emprego de matéria-prima vegetal como fonte de fármacos é consolidado. Entretanto, técnicas de cultivo *in vitro* e posterior cultivo em larga escala são pouco desenvolvidas para espécies brasileiras. O uso de plantas não cultivadas para a produção industrial de medicamentos pode comprometer a disponibilidade e a qualidade da matéria-prima, contribuindo de forma relevante para o desaparecimento de germoplasma ainda não estudado, levando à perda de componentes químicos que poderiam tornar-se novos fármacos. Como alternativa, a biotecnologia pode proporcionar a preservação vegetal e possibilitar incrementos quantitativos na produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico. O gênero *Hypericum*, destacado pela atividade antidepressiva de *H. perforatum*, possui espécies também utilizadas em outras finalidades. No Brasil, vinte e duas espécies deste gênero concentram-se nas regiões sul e sudeste, entre elas *H. campestre*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*, estudadas por nosso Grupo de Pesquisa quanto à sua composição fitoquímica e atividades biológicas. Entre estas espécies, a *H. polyanthemum* demonstra resultados que ressaltam seu promissor emprego como recurso medicinal natural e originaram um processo de patente (PI0900614-1). Inserido neste contexto, este trabalho teve por objetivo otimizar protocolos de cultivo e produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico de *H. polyanthemum*. A partir de plantas micropropagadas e aclimatizadas, avaliou-se a influência do tempo de cultivo *in vitro* e das variações sazonais no desenvolvimento em campo sob o aspecto da produção dos benzopiranos e compostos fenólicos totais. O impacto da fertilização com solução nutritiva no desenvolvimento e na produção destes metabólitos bioativos, e do derivado do floroglucinol



uliginosina B, foi analisado. Estes resultados foram publicados em dois artigos científicos no ano de 2009 e poderão nortear cultivos em larga escala de plantas medicinais como matéria-prima para pesquisa e indústria farmacêutica, sobretudo para espécies nativas do sul do Brasil.

## I. INTRODUÇÃO

Fontes naturais são capazes de suprir necessidades diversas do homem, desde a vestimenta e a alimentação até os cuidados preventivos e reparadores da saúde, servindo como fonte de medicamentos. O uso de plantas para tratamento e alívio de sintomas é prática comum e crescente na medicina (CANTER et al., 2005), incentivando a pesquisa por compostos naturais bioativos candidatos a fármacos. Entre as principais plantas tradicionalmente empregadas para estes fins, o gênero *Hypericum* é utilizado há séculos para diferentes finalidades terapêuticas, como o tratamento de pequenas queimaduras externas, inflamações de pele e dores nos nervos (GREESON et al., 2001). No entanto, é a ação antidepressiva das preparações à base de *H. perforatum*, planta nativa da Europa, Ásia e África, a responsável pela importância terapêutica do gênero (KASPER, 2001; BILIA et al., 2002). Inicialmente, as naftodiantronas hipericina e pseudohipericina foram consideradas responsáveis por esta atividade (BUTTERWECK et al., 1998). Posteriormente, acumularam-se evidências de que a ação terapêutica depende de mais de um constituinte, entre os quais os derivados de floroglucinol hiperforina e *ad*-hiperforina (CHATTERJEE et al., 1998; KAEHLER et al., 1999), xantonas (WAGNER & BLADT, 1994) e flavonóides (BUTTERWECK et al., 2000). Outras espécies do gênero foram avaliadas quanto ao potencial antidepressivo, demonstrando atividade no modelo animal de depressão em teste de natação forçada (SÁNCHEZ-MATEO et al., 2002).

Na perspectiva de encontrar, em espécies de ocorrência natural no Brasil, propriedades semelhantes às de plantas exóticas do mesmo gênero já utilizadas na terapêutica, estudos têm sido direcionados para espécies nativas. Neste contexto, espécies do gênero *Hypericum* vêm sendo investigadas por nosso Grupo de Pesquisa quanto à composição fitoquímica e atividade biológica de seus extratos, frações e substâncias isoladas. Os resultados obtidos ressaltam a necessidade de atenção para o estabelecimento de protocolos otimizados de cultivo controlado em larga escala, visando o contínuo suprimento de material vegetal de qualidade, bem como

a preservação ambiental e a conservação de germoplasma, estando a biotecnologia entre as principais ferramentas utilizadas para alcançar estes objetivos (DÖRNENBURG e KNORR, 1995; CANTER et al., 2005).

## 2. IMPORTÂNCIA INDUSTRIAL DA IMPLEMENTAÇÃO DO CULTIVO CONTROLADO DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL

Plantas com propriedades medicinais ocupam posição importante e crescente no tratamento de doenças. No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, sendo que o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas, a única fonte de recursos terapêuticos. Essa alternativa é utilizada tanto em um contexto cultural, na medicina popular, quanto em fitoterápicos, com importante parcela de empresas nacionais empregando diretamente matéria-prima vegetal na elaboração de fitomedicamentos (FOGLIO et al., 2006).

A principal fonte de plantas usadas na medicina tradicional e moderna está na flora silvestre de países em desenvolvimento, e somente uma pequena porção da matéria-prima é produzida sob cultivo (ELIZABETSKY e COSTA-CAMPOS, 1996; CANTER et al., 2005). Plantas não-cultivadas possuem desvantagens em relação às cultivadas por possibilitarem, ao longo do seu emprego, a ocorrência de identificação botânica incerta, disponibilidade decrescente de exemplares, fornecimento instável e controle de qualidade falho. Desta maneira, é crescente o interesse na utilização de métodos de cultivo controlado em larga escala, a fim de manter controle mais rígido sobre a qualidade e a idoneidade do produto. Além disso, esta prática permite o avanço da produção, com melhor aproveitamento da variabilidade contida nessas espécies, empregando-se, para tanto, métodos de seleção para a obtenção de excelentes plantas produtoras dos princípios ativos desejados (ROUT et al., 2000).

A composição química de um extrato vegetal pode ser alterada consideravelmente em função da qualidade da planta, da variabilidade genotípica e fenotípica, da diversidade e instabilidade de compostos, além da presença de componentes tóxicos e outros contaminantes (CANTER et al., 2005), o que afeta direta e negativamente a qualidade e o valor agregado dos produtos fitoterápicos. No processo de obtenção de substâncias derivadas de plantas, altos custos do produto e dificuldade na purificação de compostos, envolvendo extensa manipulação química, refletem a falta de

um verdadeiro planejamento agrícola (TURNER, 1992). O desenvolvimento de protocolos de cultivo em larga escala reforça-se, desta forma, como uma alternativa vantajosa para o suprimento de matéria-prima de qualidade para fins industriais.

Muitas técnicas de biotecnologia celular vegetal vêm sendo desenvolvidas para a propagação, regeneração e melhoramento de plantas, destacando-se, entre elas: a micropropagação, a embriogênese somática, a cultura de calos, células em suspensão, ápices caulinares, anteras ou raízes. De fato, a produção de metabólitos secundários *in vitro* fornece evidências no estudo das vias metabólicas dos fitofármacos e permite maximizar a produção destas substâncias pela seleção e/ou transformação de linhagens. A micropropagação fornece oportunidade de reproduzir genótipos superiores selecionados em menor tempo e em grande quantidade. Estas linhas de ação são úteis para plantas que encontram-se em perigo de extinção, como espécies do gênero *Hypericum*, e até mesmo para o caso de plantas com ciclo de desenvolvimento muito longo ou que possuam dificuldade de reprodução. Com esta finalidade, o uso de culturas vegetais *in vitro* tem sido amplamente discutido como uma fonte para obtenção de produtos naturais, estando o cultivo em larga escala entre as alternativas tecnologicamente viáveis para produção comercial de metabólitos secundários de importância para a indústria (VERPOORTE, 2000).

O panorama para a fitoquímica é muito mais importante e decisivo para o Brasil, considerando-se sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo e as possibilidades para o desenvolvimento de novos medicamentos. Torna-se necessária, portanto, a implantação de um programa comprometido, contínuo e eficiente, como o requerido para qualquer conquista de valor na área científico-tecnológica (YUNES et al., 2001).

No entanto, a pesquisa direcionada ao estudo de propagação de espécies de *Hypericum* nativas e de aperfeiçoamento da produção de metabólitos secundários em larga escala demonstra seu potencial de crescimento no país. Apesar do considerável número de trabalhos sobre a avaliação química e farmacológica, entre as espécies brasileiras verificou-se cultivo *in vitro* apenas para *H. brasiliense* (CARDOSO; OLIVEIRA, 1996), planta a partir da qual foram isoladas xantonas com atividade antifúngica e IMAO (ROCHA et al., 1994), e derivados de floroglucinol com atividade antimicrobiana (ROCHA et al., 1995; ROCHA et al., 1996). Para esta mesma espécie foi verificada, ainda, a atividade analgésica de extrato hidroalcoólico,

provavelmente pela ação de flavonóides como a quercetina (MENDES et al., 2002), presentes também nas espécies nativas do sul brasileiro (DALL'AGNOL et al., 2003, BERNARDI et al., 2008a).

### 3. RESULTADOS PRÉVIOS OBTIDOS PELO GRUPO DE PESQUISA

#### 3.1. Composição química das espécies de *Hypericum nativas*

Os representantes do gênero nativos do sul do Brasil estudados por nosso grupo compreendem: *H. campestre* Cham. & Schlecht., *H. carinatum* Griseb., *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. myrianthum* Cham. & Schlecht., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St Hil. A avaliação fitoquímica destas espécies revelou a produção de compostos fenólicos como xantonas (ROCHA et al., 1994), benzofenonas (BERNARDI et al., 2005), floroglucinóis (ROCHA et al., 1995, 1996; FERRAZ et al., 2002a; NÖR et al., 2004; NÖR et al., 2008), flavonóides e taninos (DALL'AGNOL et al., 2003), assim como ausência de hipericina e seus derivados (FERRAZ et al., 2002b), consideradas, juntamente com hiperforina, as substâncias marcadoras químicas de *Hypericum perforatum* (BILIA et al., 2002; LAWVERE & MAHONEY, 2005). Os benzopiranos 6-isobutil-5,7-dimetoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP1), 7-hidroxi-6-isobutil-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e 5-hidroxi-6-isobutil-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3) foram isolados das partes aéreas de *H. polyanthemum* (FERRAZ et al., 2001; 2005a)

#### 3.2. Atividades biológicas das espécies de *Hypericum nativas*

Propriedades biológicas também são descritas em diversos estudos sobre esses exemplares nativos (VON POSER et al., 2006). Extratos e frações apresentaram as atividades antidepressiva (DAUDT et al., 2000; VIANA et al., 2005), antiviral (SCHMITT et al., 2001; FRITZ et al., 2007), analgésica (MENDES et al., 2002; VIANA et al., 2003), antifúngica (FENNER et al., 2005), antiproliferativa (FERRAZ et al., 2005b) e acaricida (RIBEIRO et al., 2007). Para os compostos isolados, destacam-se as atividades demonstradas pelos benzopiranos de *H. polyanthemum*: antiproliferativa (FERRAZ et al., 2005c) e citotóxica frente à células envolvidas no processo de angiogênese (NÖR, 2006), e inibitória da monoamina oxidase (IMAO) (GNERRE et al., 2001). Entre os derivados de floroglucinol isolados, foi descrita atividade antimicrobiana para uliginosina B, hiperbrasilol B e japonicina A (DALL'AGNOL et al., 2005).

Além disso, extratos, frações e compostos isolados apresentaram considerável atividade antioxidante (BERNARDI et al., 2005a; 2007a; 2007c; 2008a).

A rica composição fitoquímica das espécies de *Hypericum* da flora nativa reflete-se nas diferentes aplicabilidades terapêuticas de seus extratos. Entretanto, estudos mais recentes descrevem o efeito antinociceptivo de compostos isolados, atividade mais relevante do ponto de vista farmacológico. Inicialmente, o extrato *n*-hexano apresentou tal efeito mediado pelo sistema opióide (VIANA et al., 2003) e, em um segundo momento, estudos mostraram que o floroglucinol uliginosina B, investigado por esta atividade, não atuava por este mecanismo de ação (HECKLER et al., 2005). Os benzopiranos foram analisados e HP1 demonstrou ser o responsável pela ação mediada pelo sistema opióide (STOLTZ et al., 2008).

### 3.3. Protocolos de cultivo controlado

Direcionados pela carência de estudos para cultivo em larga escala de plantas medicinais no país, em especial das espécies de *Hypericum* nativas, foram estabelecidos protocolos de cultivo *in vitro* para *H. campestre*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*, garantindo a manutenção do germoplasma e a continuidade das investigações (BERNARDI, 2007a).

A demanda crescente pela utilização de plantas na cura ou na prevenção de doenças, assim como o emprego das mesmas visando a obtenção de substâncias de interesse farmacêutico, tem resultado em uma intensa exploração da flora nativa, o que pode levar à redução das populações naturais dessas espécies, colocando-as em risco de extinção. O extrativismo vegetal contribui de forma relevante para o desaparecimento de germoplasma ainda não estudado, o que pode significar a perda de componentes químicos interessantes que poderiam tornar-se novos fármacos (FRANÇA, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de métodos que possibilitem tanto a propagação de plantas em larga escala como seu simultâneo melhoramento, além de sua conservação, é fundamental. O estabelecimento de protocolos de cultivo otimizado que possibilitem a produção de biomassa vegetal das espécies nativas é uma opção para a obtenção de matéria-prima de interesse para a indústria farmacêutica, de forma sustentável, contribuindo para a redução do extrativismo predatório.

O destacado potencial terapêutico demonstrado por extratos apolares e substâncias isoladas de *H. polyanthemum* levou ao desenvolvimento de protocolos

de cultivo otimizados para a espécie. A micropropagação foi realizada a partir de plantas coletadas em Caçapava do Sul (RS), e seu posterior cultivo a campo conduzido com sucesso. Além disso, a quantificação dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), assim como a de compostos fenólicos, demonstrou que plantas cultivadas desta forma mantiveram a capacidade de biossíntese destes compostos (BERNARDI et al., 2007b; BERNARDI et al., 2008b). Os relevantes resultados farmacológicos obtidos em experimentos com estes metabólitos bioativos e com o derivado do floroglucinol uliginosina B, produzidos por *H. polyanthemum*, destacaram o promissor emprego da planta como um recurso medicinal natural, resultando em um processo de patente (PI0900614-1).

#### 4. OBJETIVOS DO TRABALHO

A partir dos protocolos de propagação *in vitro* (BERNARDI et al., 2007b) e *ex vitro* (BERNARDI et al., 2008b) elaborados para *H. polyanthemum*, dois experimentos foram realizados objetivando o incremento na produção de compostos fenólicos por plantas aclimatizadas. A influência do tempo de cultivo *in vitro* e das variações sazonais na aclimatização a campo, assim como o impacto da fertilização com solução nutritiva sobre o crescimento destas plantas aclimatizadas, foram avaliados, verificando-se o ganho de biomassa com capacidade biossintética dos principais metabólitos secundários com atividades farmacológicas produzidos pela espécie: os benzopiranos HP1, HP2 e HP3, o derivado do floroglucinol uliginosina B e compostos fenólicos totais.

#### 5. METODOLOGIA

As plantas utilizadas para cultivo foram coletadas na cidade de Caçapava do Sul, no Estado brasileiro do Rio Grande do Sul, no verão de 2003, e identificadas pelo botânico Sérgio Bordignon, do Departamento de Botânica da Universidade Luterana do Brasil. Uma exsicata do material foi reservada para registro e depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A metodologia de cultivo e análise das plantas foi realizada de acordo com técnicas estabelecidas nos próprios laboratórios e são descritas nos itens subsequentes.

### 5.1. Cultivo *in vitro*

Para a análise da influência do tempo de cultivo *in vitro* e da sazonalidade na produção de metabólitos secundários, assim como para a avaliação dos efeitos provocados pela fertilização continuada no crescimento de plantas aclimatizadas, plântulas de *H. polyanthemum* foram propagadas *in vitro* conforme protocolo previamente estabelecido a partir de um germoplasma selecionado (BERNARDI et al., 2007b). O crescimento das plântulas ocorreu em sala climatizada sob condições controladas ( $25 \pm 1$  °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de  $45\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  fornecido por lâmpadas brancas fluorescentes) em formulação modificada do meio semi-sólido de Murashige e Skoog (MAURMANN et al., 2008), contendo  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $6 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (extra puro, Merck) e pH ajustado em 5,8. As subculturas foram realizadas a partir de explantes obtidos das extremidades dos brotos (1 cm) de plântulas cultivadas por 6 semanas.

### 5.2. Aclimatização

O período de aclimatização das plantas propagadas *in vitro* compreendeu duas etapas: a adaptação *ex vitro* e o cultivo a campo. Para condicionarem-se às condições de crescimento *ex vitro*, plântulas micropropagadas durante 6, 8, 12 e 14 semanas foram transferidas para potes plásticos contendo vermiculita e solo não fertilizado na proporção de 2:1 (v:v), cobertas com plástico PVC e mantidas por 30 dias em sala climatizada, sob as mesmas condições anteriormente descritas, e intensidade luminosa de  $45\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . As plantas receberam água destilada três vezes por semana.

Para o cultivo a campo, cada indivíduo foi transferido para vasos com terra de jardim e levado para crescimento, em campo aberto, na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A intensidade luminosa foi de  $2000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  medida ao meio dia de dias ensolarados e sem nuvens, com sensor Quantum Li-cor. Os dados de temperaturas mínimas e máximas, bem como da quantidade de chuva durante o período de crescimento foram também registrados para cada um dos experimentos.

### 5.3. Otimização dos protocolos de cultivo com vistas ao aumento na produção de metabólitos secundários

#### 5.3.1. Avaliação da influência do tempo de crescimento *in vitro* na produção de compostos fenólicos em plantas aclimatizadas de *Hypericum polyanthemum*

Para avaliação do reflexo do período de micropropagação e do posterior tempo de aclimatização sobre o crescimento e a produção de metabólitos secundários em *H. polyanthemum*, plântulas cultivadas *in vitro* por 6, 8, 12 e 14 semanas foram analisadas quanto à produção de biomassa, benzopiranos (HP1, HP2 e HP3) e compostos fenólicos totais.

Plantas cultivadas durante 6, 8, 12 e 14 semanas foram também aclimatizadas para análise da influência do tempo de cultivo *in vitro* e das variações sazonais no desenvolvimento a campo, durante dois anos. A primeira amostragem ocorreu com a coleta de 12 indivíduos em uma primavera, e a segunda, com a coleta de igual número de indivíduos intactos na primavera seguinte. O mesmo delineamento experimental foi adotado para as populações aclimatizadas por 18 semanas nas primaveras de 2006 e 2007 (final de cada experimento nas primaveras de 2007 e 2008, respectivamente).

#### 5.3.2. Quantificação de compostos fenólicos totais

A dosagem da produção de compostos fenólicos totais (TPCs) nas plantas foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado (IVANOVA et al., 2005). O extrato para a quantificação foi obtido a partir de 0,1 g de material vegetal liofilizado, extraído 5 vezes com alíquota de 5 mL de metanol em banho de ultrassom, durante 20 minutos. O extrato foi levado à secura em evaporador rotatório a pressão reduzida e re-suspendido em metanol à uma concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>.

Alíquotas adequadas das soluções metanólicas foram oxidadas com 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,2 N (2N diluído 10 vezes) e, transcorridos 5 minutos, esta reação foi neutralizada com volume suficiente de carbonato de sódio 7,5 g L<sup>-1</sup> para completar o volume final da reação em 10 mL. Os resultados foram calculados por meio de uma curva padrão de quercetina com concentrações entre 50 e 500 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.999) e o teor de compostos fenólicos totais expressos como equivalente de miligramas de quercetina por grama de massa de planta seca (EQ gMS<sup>-1</sup>).



### 5.3.3. Quantificação de uliginosina B e benzopiranos

O derivado do floroglucinol uliginosina B e os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 foram quantificados por CLAE. O extrato para estas quantificações foi obtido a partir de 0,05 g de material vegetal liofilizado, extraído 15 vezes com uma alíquota de 5 mL de *n*-hexano em banho de ultrassom, durante 20 minutos. O extrato foi levado à secura em evaporador rotatório à pressão reduzida e ressuspendido em 2 mL de metanol grau CLAE.

As eluições cromatográficas foram realizadas por sistema quaternário de bombas Waters 600, detector com comprimento de onda duplo Waters 2487 e coluna Waters Nova Pack C18 acoplada à pré-coluna Waters Nova Pack C18 60A. Uliginosina B foi analisada sob sistema isocrático CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (95:5; v:v + 0,01% TFA) em condições de fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> e detecção em 220 nm. O teor do metabólito nas soluções extrativas foi calculado por uma curva padrão com excelente linearidade na faixa de concentrações de 2 a 800 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.999) e referido como grama de uliginosina B por 100 g de massa de planta seca (g% MS) (Nunes et al., 2009). Para a determinação do teor dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 utilizou-se método previamente validado (Bernardi et al., 2007a) com eluição isocrática CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (60:40; v:v) sob fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> e detecção a 270 nm. A concentração de cada benzopirano foi expressa por uma curva de calibração a partir de padrões isolados das partes aéreas de *H. polyanthemum*, e este teor expresso em gramas de benzopirano por 100 g de massa de planta seca (g% MS).

### 5.3.4. Efeitos promovidos pela fertilização continuada durante a aclimatização no crescimento de plantas de *Hypericum polyanthemum* derivadas de cultura de tecidos

Plantas aclimatizadas após 8 semanas de crescimento *in vitro* foram irrigadas semanalmente com 20 mL de solução nutritiva de Murashige e Skoog, sem sacarose, na sua formulação completa (MS), diluída a metade (MS 50) ou a um quarto (MS 25). Após 18 semanas de crescimento em campo aberto, as plantas foram coletadas e suas partes vegetativas e reprodutivas tiveram o valor de massa fresca, de produção dos benzopiranos, uliginosina B e compostos fenólicos totais determinados, separadamente, pelos métodos descritos em 5.3.3 e 5.3.4. A aclimatização ocorreu durante a primavera de 2008 sob um acúmulo total de chuvas de 272,6 mm e temperaturas mínimas e máximas de 25,7 ± 4,3 e 16,5 ± 3,4, respectivamente.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Cultivo *in vitro* e aclimatização

Seguindo os protocolos elaborados, os cultivos *in vitro* e *ex vitro* ao longo dos experimentos processaram-se com excelentes desenvolvimentos e taxa de sobrevivência das plantas. Com 18 semanas de cultivo sob cada um dos tratamentos, as plantas foram coletadas e analisadas.

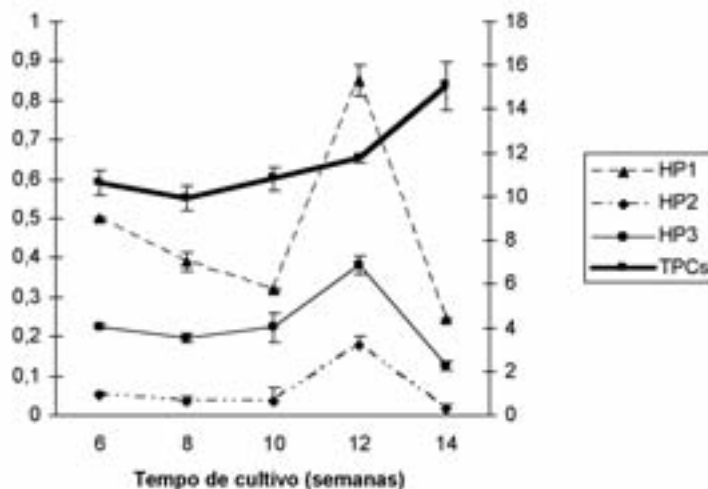
### 6.2. Influência do tempo de crescimento *in vitro* na produção de compostos fenólicos em plantas aclimatizadas de *Hypericum polyanthemum*

A influência do tempo de cultivo no crescimento, idade da planta e produção de compostos fenólicos foi investigada em plântulas micropropagadas e, posteriormente, nas aclimatizadas. As informações sequencialmente apresentadas servem para futuramente orientar o período de coleta das plantas, com obtenção maximizada de cada metabólito bioativo de *H. polyanthemum*.

#### 6.2.1. Crescimento *in vitro* e produção de metabólitos secundários

O estudo da cinética de crescimento *in vitro* e do acúmulo de benzopiranos iniciou após 6 semanas de cultivo, revelando que a produção de biomassa é crescente até 12 semanas, quando é verificada a maior massa fresca das plântulas (seis vezes maior do que no início do acompanhamento), decrescendo posteriormente. Simultaneamente ao aumento de biomassa foi verificada maior produção dos benzopiranos. A quantificação de compostos fenólicos, que inclui HP2 e HP3, derivados do floriglucinol e flavonóides, demonstrou que o aumento da produção destes metabólitos acompanha o transcorrer do tempo de cultivo (Figura 1). Isto pode ocorrer em resposta ao estresse imposto pela deficiência de nutrientes do meio, que promove a biossíntese de antocianinas e causa severos efeitos no crescimento das plântulas. Briskin e Gawienowski (2000) demonstraram que o estresse causado pela deficiência de nitrogênio no solo, por um curto espaço de tempo, também foi capaz de aumentar a produção de compostos bioativos em *H. perforatum*, sendo uma maneira interessante de promover o aumento de metabólitos secundários em espécies de *Hypericum* nativas.

**Figura 1.** Influência do tempo de cultivo na produção dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 e de compostos fenólicos totais (TPCs) em plântulas de *H. polyanthemum* micropropagadas em meio MS modificado\*



\*Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de três diferentes experimentos.

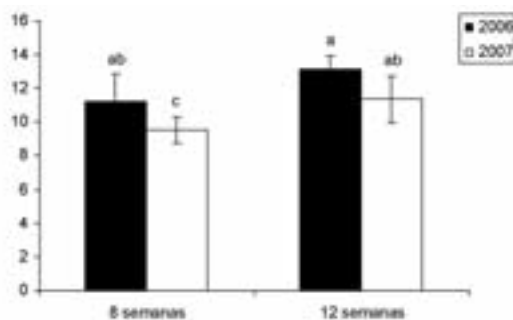
### 6.2.2. Produção de biomassa e compostos bioativos durante a aclimatização

Durante o período de aclimatização das plantas foram observados dois diferentes estágios de desenvolvimento. Inicialmente, houve lenta formação de brotos e raízes, sendo posteriormente verificado o rápido crescimento destas mesmas partes. Plântulas micropropagadas por 6, 8 e 12 semanas apresentaram 100% de sobrevivência quando aclimatizadas, ao passo que as mantidas *in vitro* por 14 semanas tornaram-se fracas e morreram, provavelmente pela depleção de nutrientes do meio, prejudicando o crescimento da planta. A alta irradiação luminosa, acompanhada de baixa umidade do ar durante o crescimento em campo aberto, pode ter contribuído com fatores desfavoráveis às plantas (WALTERS, 2005).

Plantas com 18 semanas de aclimatização subsequentes a um período de 8 ou 12 semanas de cultivo *in vitro* mostraram diferenças significativas na produção de biomassa entre os dois anos de experimento, com maior valor verificado para aquelas micropropagadas por 12 semanas (Figura 2). Além disso, tanto para plantas cultivadas *in vitro* por 8 quanto para as cultivadas por 12 semanas, a aclimatização forneceu maior biomassa no primeiro ano de experimento. Nas primaveras de 2006 e 2007, a quantidade de chuva registrada foi de 328,3 e 494,5 mm, respectivamente, para plantas

cultivadas *in vitro* por 8 e 12 semanas, enquanto as temperaturas mínimas e máximas foram de  $24 \pm 5$  e  $14 \pm 4$  °C e de  $28 \pm 4$  e  $18 \pm 4$  °C para cada um dos períodos de micropropagação, respectivamente. Para as plantas aclimatizadas durante as primaveras de 2007 e 2008, a quantidade de chuva registrada foi de 315,5 mm com temperaturas mínimas e máximas de  $27 \pm 5$  a  $17 \pm 3,5$  °C para as plantas provenientes dos dois tempos de cultivo. O decréscimo do rendimento de biomassa de plantas micropropagadas por 8 semanas pode ser devido ao aumento das temperaturas durante o tempo de cultivo. Embora a aclimatização de plantas cultivadas *in vitro* por 12 semanas tenha ocorrido sob temperaturas muito semelhantes, no primeiro experimento a quantidade de chuva foi maior.

**Figura 2.** Massa fresca de plantas de *H. polyanthemum* após 18 semanas de cultivo a campo, durante dois anos consecutivos\*



\*Barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão de 12 plantas, e letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para  $p < 0,05$  (ANOVA seguida de teste Tukey).

Em relação à proporção da massa fresca das diferentes partes, os cultivos *in vitro* pelos períodos de 8 e 12 semanas forneceram respectivamente  $23 \pm 3,37\%$  e  $9,83 \pm 1,47\%$  de massa fresca de partes reprodutivas após 18 semanas de aclimatização. Como nenhuma planta foi perdida durante o inverno nos dois experimentos, foram possíveis coletas nas primaveras subsequentes. No entanto, as plantas não apresentaram aumento do rendimento de biomassa, permanecendo a proporção de partes reprodutivas praticamente a mesma, com folhas representando 7% da massa fresca.

Os níveis de benzopiranos não variaram em plantas aclimatizadas quando comparados os tempos de cultivo *in vitro*, exceto para HP3, que se acumulou em maior quantidade nas plantas cultivadas por 12 semanas, nos dois anos analisados (Tabela 1). Estas mudanças nos níveis de HP3 podem estar relacionadas ao estágio de desenvolvimento da planta, que varia com o tempo de cultivo *in vitro*. Tais alterações também podem ocorrer devido

à alta concentração do composto verificada nas flores senescentes. Este estágio ontogênico floral correspondeu a  $58 \pm 4,89\%$  do peso das partes reprodutivas de plantas aclimatizadas após 12 semanas de cultivo *in vitro*, enquanto apenas  $35,76 \pm 5,26\%$  de flores senescentes foram produzidas por plantas aclimatizadas após um período de 8 semanas de micropropagação. A proporção de diferentes tecidos também alterou a concentração de metabólitos bioativos em plantas de *H. perforatum* crescidas em campo aberto (TEKEL'OVÁ et al., 2000) e em sistemas hidropônicos em casa de vegetação (MURCH et al., 2002).

A variação de HP3 refletiu-se também na concentração de compostos fenólicos totais, que foi maior para plantas cultivadas *in vitro* por 12 semanas, seguida dos valores apresentados pelas partes reprodutivas de plantas micropropagadas por 8 semanas. As partes vegetativas, por sua vez, apresentaram teores similares de compostos independente do período de cultivo *in vitro* ou do ano de coleta (Tabela 1).

**Tabela 1.** Benzopiranos (g% MS) e compostos fenólicos totais (TPC) (EQ gMS<sup>-1</sup>) em plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* analisadas após 18 semanas de cultivo, durante 2 anos consecutivos.

Período de cultivo <i>in vitro</i>	Época da coleta	Parte da planta analisada	HP1	HP2	HP3	TPCs
8 semanas	18 semanas de cultivo – 2006	Partes vegetativas	1,44 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,3 ± 0,004 <sup>c</sup>	34,47 ± 2,61 <sup>cd</sup>
		Partes reprodutivas	1,40 ± 0,1	0,15 ± 0,02	0,96 ± 0,04 <sup>b</sup>	36,47 ± 0,47 <sup>c</sup>
12 semanas	18 semanas de cultivo – 2006	Partes vegetativas	1,25 ± 0,03	0,16 ± 0,08	0,29 ± 0,01 <sup>c</sup>	32,25 ± 0,74 <sup>d</sup>
		Partes reprodutivas	1,43 ± 0,03	0,18 ± 0,03	1,135 ± 0,01 <sup>a</sup>	41,57 ± 1,12 <sup>b</sup>
8 semanas	18 semanas de cultivo – 2007	Partes vegetativas	1,56 ± 0,09	0,20 ± 0,014	0,26 ± 0,016 <sup>c</sup>	35,27 ± 0,29 <sup>cd</sup>
		Partes reprodutivas	1,38 ± 0,04	0,14 ± 0,03	0,92 ± 0,04 <sup>b</sup>	41,52 ± 0,86 <sup>b</sup>
12 semanas	18 semanas de cultivo – 2007	Partes vegetativas	1,35 ± 0,03	0,17 ± 0,02	0,25 ± 0,03 <sup>c</sup>	32,99 ± 0,53 <sup>d</sup>
		Partes reprodutivas	1,45 ± 0,03	0,19 ± 0,03	1,09 ± 0,03 <sup>ab</sup>	48,14 ± 0,27 <sup>a</sup>
8 semanas	Primavera – 2007	Partes vegetativas novas	0,545 ± 0,035 <sup>e</sup>	0,0375 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>b</sup>	11,76 ± 0,45 <sup>e</sup>
		Partes vegetativas velhas	1,33 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,031 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,04 <sup>b</sup>	31,41 ± 1,79 <sup>d</sup>
		Flores abertas	0,86 ± 0,04 <sup>cd</sup>	0,08 ± 0,016 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,036 <sup>a</sup>	32,72 ± 1,53 <sup>d</sup>
12 semanas	Primavera - 2007	Partes vegetativas novas	0,79 ± 0,03 <sup>cd</sup>	0,08 ± 0,025 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,025 <sup>b</sup>	9,80 ± 0,54 <sup>e</sup>
		Partes vegetativas velhas	1,47 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,030 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,01 <sup>b</sup>	35,52 ± 1,99 <sup>cd</sup>
		Flores abertas	0,93 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,08 ± 0,015 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	35,83 ± 0,79 <sup>bcd</sup>
8 semanas	Primavera – 2008	Partes vegetativas novas	0,534 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,04 ± 0,033 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,04 <sup>b</sup>	14,87 ± 0,57 <sup>e</sup>
		Partes vegetativas velhas	1,30 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,17 ± 0,025 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,031 <sup>b</sup>	36,87 ± 0,23 <sup>bcd</sup>
		Flores abertas	0,86 ± 0,2 <sup>cde</sup>	0,08 ± 0,015 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,027 <sup>a</sup>	40,01 ± 3,98 <sup>b</sup>
12 semanas	Primavera – 2008	Partes vegetativas novas	0,77 ± 0,03 <sup>cd</sup>	0,08 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,023 <sup>b</sup>	11,05 ± 0,65 <sup>e</sup>
		Partes vegetativas velhas	1,45 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,036 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,025 <sup>b</sup>	45,32 ± 0,83 <sup>a</sup>
		Flores abertas	0,92 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,07 ± 0,0025 <sup>b</sup>	0,57 ± 0,03 <sup>a</sup>	48,42 ± 0,92 <sup>a</sup>

Os valores representam a média de 12 plantas ± desvio padrão. Diferentes letras indicam diferença estatística entre os tratamentos para  $p < 0,05$  (ANOVA seguida de teste Tukey).

Comparando-se os níveis de compostos fenólicos totais entre os dois anos, verificou-se que as mudanças de temperatura também podem causar alterações no perfil de acúmulo destes metabólitos. Southwell e Bourke (2001) acompanharam as variações na concentração total de hipericinas de *H. perforatum* em cada estação durante dois ciclos de um ano. Os autores descreveram que no ciclo do segundo ano, quando ocorreram menores temperaturas mínimas e máximas, as plantas produziram maior concentração de hipericinas. Resultados similares foram observados em outro estudo (COUCEIRO et al., 2006), no qual a produção dos compostos majoritários de *H. perforatum* foi incrementada em 20% com uma variação de apenas 5 °C para plantas cultivadas a 25 e 30 °C.

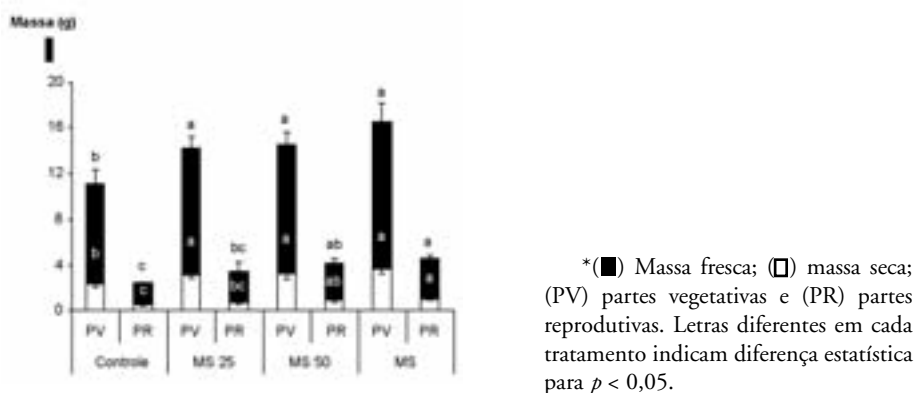
Na coleta realizada no segundo ano de experimento, todas as partes analisadas da planta acumularam menor quantidade de benzopiranos comparadas às plantas coletadas no primeiro experimento, com exceção de HP1 e HP2 nas partes vegetativas novas, que permaneceram praticamente as mesmas (Tabela 1). A concentração de compostos fenólicos totais, detectada em menor quantidade nas partes vegetativas velhas nos dois tratamentos, não foi alterada nas outras partes da planta. Estes resultados estão de acordo com estudos relacionando a influência da época de coleta, da variação sazonal e de aspectos ambientais sobre a concentração de metabólitos secundários em espécies de *Hypericum* (BÜTER et al., 1998; SOUTHWELL e BOURKE, 2001; ABREU et al., 2004; ÇIRAC et al., 2006). SOUTHWELL e BOURKE (2001) verificaram que a variação sazonal influenciou significativamente a concentração de hipericinas totais produzidas por *H. perforatum* durante dois anos consecutivos. Os autores relatam que os níveis destes metabólitos estiveram próximos de zero no segundo inverno, aumentando rapidamente com o desenvolvimento das flores na primavera.

Os dados apresentados pela investigação da influência exercida pelo tempo de cultivo *in vitro* e pelas variações sazonais na performance do desenvolvimento a campo de *H. polyanthemum* estabelecem um protocolo que pode ser facilmente reproduzido para fornecer matéria-prima uniforme e com alta concentração de substâncias com atividades biológicas, de relevante potencial para o uso terapêutico.

### 6.3. Efeitos promovidos pela fertilização continuada durante a aclimatização no crescimento de plantas de *Hypericum polyanthemum* derivadas de cultura de tecidos

A fertilização continuada promoveu aumento significativo na produção de biomassa das partes vegetativas e reprodutivas de *H. polyanthemum* aclimatizado por 18 semanas. A produção máxima de biomassa foi alcançada com a irrigação com solução MS, promovendo 50% e 85% de aumento na massa fresca e 57% e 111% de aumento da massa seca das partes vegetativas e reprodutivas, respectivamente, quando comparado com plantas não fertilizadas (Figura 3).

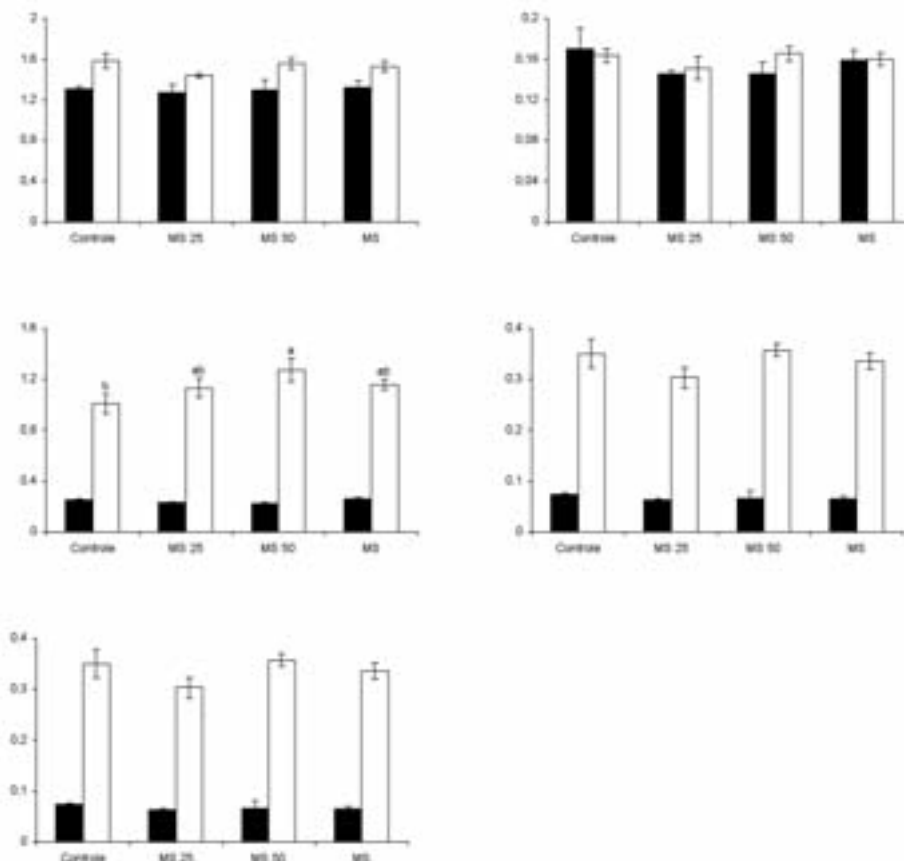
**Figura 3.** Resposta do crescimento a campo de *H. polyanthemum* frente à fertilização continuada com soluções MS após 18 semanas de cultivo\*



#### 6.3.1. Produção de metabólitos secundários

O tratamento com as três soluções nutritivas durante o período de crescimento das plantas aclimatizadas promoveu aumento significativo no rendimento de compostos fenólicos totais acumulados, sem diferença entre as distintas formulações utilizadas. Em relação aos benzopiranos, as plantas demonstraram comportamento produtivo similar ao longo dos tratamentos, exceto para HP3, que teve sua concentração aumentada em resposta à fertilização com solução MS 25, MS 50 e MS, demonstrando valores 13%, 27% e 16% maiores, respectivamente, do que as plantas não fertilizadas (Figura 4). É importante destacar que todos os tratamentos com fertilização resultaram no aumento da concentração de HP3 e biomassa das partes reprodutivas, órgão da planta que apresentou maior acúmulo deste metabólito (BERNARDI et al., 2008).

**Figura 4.** Efeito da fertilização continuada na produção de metabólitos secundários de plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* nas partes (■) vegetativas e (□) reprodutivas\*



\*Letras diferentes em cada tratamento indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Diversos fatores influenciam as características químicas de plantas medicinais, desde o estabelecimento do cultivo ao tratamento da matéria-prima. A produção de compostos naturais é ditada principalmente pela combinação de influências genéticas e ambientais (HAMILTON et al., 2001). A competição de polinizadores, a exposição a insetos herbívoros e microorganismos são fatores bióticos que alteram a produção do metabolismo secundário das plantas (ORMEÑO et al., 2008). Os metabólitos vegetais podem, ainda, ser sensíveis a fatores abióticos como: radiação ultravioleta (ALBERT et al., 2008), estresse hídrico (ZOBAYED et al., 2007), altas temperaturas (COUCEIRO et al., 2006) e intensidade luminosa (BRISKIN e GAWIENOWSKI, 2001; MOSALEEYANON et



al., 2005). Adicionalmente, para vários metabólitos sintetizados a partir de estruturas básicas de carbono, diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar variações fenotípicas e de perfis ontogênicos na distribuição dos metabólitos secundários (HEYWORTH et al., 1998). Como exemplo, há o conceito de “metabolismo excedente” (“*overflow metabolism*”), que traduz o desvio do excesso de carbono produzido pela planta, associado ao seu crescimento, para a biossíntese de metabólitos secundários (MATSUKI, 1996). O conhecimento destes fatores contribui com o objetivo de produção de plantas de alta qualidade (POUTARAUD e GIRARDIN, 2005).

A partir dos presentes dados obtidos, pode-se concluir que a fertilização continuada de plantas de *H. polyanthemum* com soluções MS 25, MS 50 e MS foi capaz de promover o aumento de biomassa, associada ao aumento na quantidade de metabólitos secundários bioativos obtidos, com destaque para os níveis de HP3 promovidos pelas três soluções nutritivas, nas flores. O sistema descrito propõe uma nova abordagem para pesquisas com plantas medicinais, destacando as condições otimizadas para o incremento da produção de biomassa e composição fitoquímica de tecidos de plantas, selecionadas a partir de um germoplasma superior, bem como a descrição de todo o processo para o cultivo destas plantas.

## 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os protocolos de micropropagação e cultivo a campo, estabelecidos para *H. polyanthemum*, mostraram-se adequados para o manejo da espécie ao garantir o fornecimento em larga escala de biomassa com capacidade biossintética de importantes metabólitos bioativos, entre eles benzopiranos, uliginosina B e outros compostos fenólicos. Durante dois anos consecutivos, plantas provenientes de diferentes tempos de cultivo *in vitro* mantiveram-se viáveis ao longo do desenvolvimento em campo aberto, obtendo-se significativamente maior biomassa das plantas completas, assim como maior produção do benzopirano HP3 pelas flores, a partir de plantas aclimatizadas após micropropagação por um período de 12 semanas. Adicionalmente, o aumento da produção de biomassa e metabólitos secundários bioativos também foi alcançado com a aplicação do modelo experimental de fertilização com diferentes concentrações de solução nutritiva MS.

A discussão sobre o emprego de plantas medicinais pela indústria farmacêutica exige tanto a preocupação com a qualidade da matéria-prima – e consequentemente do produto – quanto a utilização racional de recursos naturais, o que pode ser alcançado com o uso da biotecnologia agrícola

aplicada ao melhoramento destas plantas. Os resultados aqui apresentados atendem perfeitamente a estas prerrogativas, e poderão nortear cultivos em larga escala de plantas medicinais como matéria-prima para pesquisa e indústria farmacêutica nacional. Além disso, a diversidade da riqueza vegetal do país direciona a continuidade dos estudos para constante aperfeiçoamento das técnicas produtivas aplicadas, também, a outras espécies nativas já estudadas por nosso Grupo de Pesquisa.

Estes resultados foram publicados, no ano de 2009, em dois artigos científicos, intitulados **“Promotive effects of long-term fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization”**, pela revista “Industrial Crops and Products”, ELSEVIER, e **“Roles of *in vitro* plantlet age and growing period in the phenolic constituent yields of acclimatized *Hypericum polyanthemum*”**, pela revista “Environmental and Experimental Botany”, ELSEVIER. Se adequadamente explorados, estes dados poderão gerar avanços por meio da criação de novas possibilidades industriais, da promoção de empregos, de impulso nas exportações brasileiras frente ao mercado internacional e de conquistas de relevante valor científico-tecnológico.

## BIBLIOGRAFIA

ABREU, I.N.; PORTO, A.L.M.; MARSAIOLI, A.J.; Mazzafera, P. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, v. 167, p. 949–954, 2004.

ALBERT, K.R.; MIKKELSEN, T.N.; RO-POULSEN, H. Ambient UV-B radiation decreases photosynthesis in high arctic *Vaccinium uliginosum*. *Physiology Plant*, v. 133, p. 199–210. 2008.

BERNARDI, A.P.M. et al. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 5, p. 784-786, 2005.

BERNARDI, A.P.M. *Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas in vitro de espécies de Hypericum nativas do Rio Grande do Sul*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. (2007a)

BERNARDI, A.P.M.; MAURMANN, N.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 29, p. 165-170. (2007b)

BERNARDI, A.P.M.; LÓPEZ-ALARCÓN, C.; ASPÉE, A.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L.; BRIDI, R.; LISSI, E.C. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 52, p. 1126-1129. (2007c)

BERNARDI, A.P.M.; LÓPEZ-ALARCÓN, C.; ASPÉE, A.; VON POSER, G.L.; BRIDI, R.; DUTRA FILHO C. S.; LISSI, E.C. Antioxidant activity in Southern Brazilian *Hypericum* species. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v. 53, p. 1658-1662. (2008a)

BERNARDI, A.P.M.; NUNES, J.M.; MARCHIORO, M.K.; ROSA, L.M.G.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. Phenolic compounds profiles during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 46, p. 694-700. (2008b)

BILIA, A. R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability – an update. *Life sciences*, n. 70, p. 3077-3096, 2002.

BRISKIN, D.P., GAWIENOWSKI, M.C. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 39, p. 1075–1081, 2000.

BÜTER, B., ORLACCHIO, C., SOLDATI, A., BERGER, K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, v. 64, p. 431–437, 1998.

BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Solubilized hypericin and pseudo-hypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica*, v. 64, p. 291-294, 1998.

CANTER, P.H.; THOMAS, H.; ERNST, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. – Review. *Trends in Biotechnology*, v. 23, p. 180-185, 2005.

CARDOSO, M. A.; DE OLIVEIRA, D. E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: Shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 44, p. 91-94, 1996.

ÇIRAC, C., SA AM, B., AYAN, A.K., KEVSERO LU, K. Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. *Biochemical Systematical and Ecology*, v. 33, p. 1–13, 2006.

- COUCEIRO, M.A., AFREEN, F., ZOBAYED, S.M.A., KOZAI, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John'swort: effects of harvesting time, temperature and germoplasm. *Plant Science*, v. 170, p. 128–134, 2006.
- CHATTERJEE, S., NÖLDNER, M., KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, v. 31, s.1, p. 7- 15, 1998.
- DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 10, p. 511-516, 2003.
- DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Bioassay guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 291-293, 2005.
- DAUDT, R.; VON POSER, G. L.; STAATS, C.; NEVES, G.; RATES, S. M. K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 344-346, 2000.
- DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell culture, v. 17, p. 674-684, 1995.
- ELIZABETSKY, E., COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plants genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p.111-120, 1996.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. M. K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E. E. S., ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. *Phytomedicine*, v. 12, p. 236-240, 2005.
- FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). *Pharmaceutical Biology*, v. 40, n.4, p.294-297. (2002b)
- FERRAZ, A.B.F., BORDIGNON, S.A.L., STAATS, C., SCHRIPEMA, J., VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry*, v. 57, p. 1227-1230, 2001.

FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J.; POHLMANN, A.R.; VON POSER, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochemical systematics and ecology*, v.30, p. 989-991. (2002a)

FERRAZ, A. B. F.; LIMBERGER, R. P.; BORDIGNON, S. A. L.; VON POSER, G. L.; HENRIQUES, A. T. Essential oil in composition of six *Hypericum* species from Southern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 20, p. 335-339. (2005a)

FERRAZ, A.; FARIA, D.H.; BENNETI, M.N., DA ROCHA, A.B; SCHWARTSMANN, G., HENRIQUES, A., VON POSER, G. Screening for the antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine*, v. 12, p. 112-115. (2005b)

FERRAZ, A.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G.L.; HENRIQUES, A.T.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA; A.B Antiproliferative activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthum*. *Fitoterapia*, v. 76, n. 2, p. 210-215. (2005c)

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. *Construindo a história dos produtos naturais*, nº 7, outubro de 2006.

FRANÇA, S. C. “Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas”. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, c. 7, p. 123-146, 2003.

FRITZ, D.; VENTURI, C.R.; CARGNIN, S.; SCHRIPSEMA, J.; ROEHE, P.M.; MONTANHA, J.A.; VON POSER, G.L. Herpes Virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat mouth wound. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 517-529, 2007.

GNERRE, C.; VON POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, V.; TESTA, B.; RATES, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GREESON, J.M.; SANFORD, B.; MONTI, D.A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, v. 153, p. 401-414, 2001.

HAMILTON, J.G., ZANGERL, A.R., DELUCIA, E.H., BERENBAUM, M.R. The carbon:nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecology Letters*, v. 4, p. 86–95, 2001.

HECKLER, A.P.M.; VIANA, A.F.; FENNER, R.; NÖR, C.; KLIEMANN, M.; DO REGO, J.C.; COSTENTIN, J.; VON POSER, G.L, RATES, S.M.K. Atividade antinociceptiva de uliginosina isolada de *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). *20ª Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental*. Águas de Lindóia, Brasil, 2005.

HEYWORTH, C.J., IASON, G.R., TEMPERTON, V., JARVIS, P.G., DUNCAN, A.J. The effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration and nutrient supply on carbon based plant secondary metabolites in *Pinus sylvestris* L. *Oecologia*, v. 115, p. 344–350, 1998.

IVANOVA, D., GEROVA, D., CHERVENKOV, T., YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 145–150, 2005.

KAEHLER, S. T.; SINNER, C.; CHATTERJEE, S. S.; PHILIPPU, A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in rat locus coeruleus. *Neurosciences Letters*, v. 262, p. 199-202, 1999.

KASPER, S. *Hypericum perforatum* – a Review of Clinical Studies. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, n. 1, p. S51-S55, 2001.

LAWVERE, S.; MAHONEY, M. C. ST. JOHN'S WORT. *American Family Physician*, v. 72, n. 11, 2005.

MATSUKI, M. Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution. *Australian Journal of Botany*, v. 44, p. 613–634, 1996.

MAURMANN, N., RECH, S.B., FETT-NETO, A.G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, v. 44, p. 209–215, 2008.

MENDES F.R., MATTEI, R., CARLINI, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*, v. 73, p. 462–471, 2002.

MOSALEEYANON, K., ZOBAYED, S.M.A., AFREEN, F., KOZAI, T. Relationships between net photosynthetic rate and secondary metabolite contents in St. John's wort. *Plant Science*, v. 169, p. 523–531, 2005.

MURCH, S.P., RUPASINGHE, H.P.V., SAXENA, P.K. An *in vitro* and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv New Stem). *Planta Medica*, v. 68, p. 1108–1112, 2002

ORMEÑO, E., BALDY, V., BALLINI, C., FERNANDEZ, C. Production and diversity of volatile terpenes from plants on calcareous and siliceous soils: effect of soil nutrients. *Journal of Chemical Ecology*, v. 34, p. 1219–1229, 2008.

NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPISEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, D.; VON POSER, G.L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 517–519, 2004.

NÖR, C. *Análise química e taxonômica de espécies de Hypericum e avaliação da atividade antiangiogênica*. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NÖR, C.; BERNARDI, A.P.M.; HAAS, J.S.; SCHRIPISEMA, J.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. *Natural Products Communications*, v.3, p.237-240, 2008.

NUNES, J.M.; PINHATTI, A.V.; VON POSER, G.L.; RECH, S.B. ST. Promotive effects of long term fertilization on grown of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. *Industrial Crops and Products*, v. 30, p. 329–332, 2009.

POUTARAUD, A., GIRARDIN, P. Improvement of medicinal plant quality: a *Hypericum perforatum* literature review as an example. *Plant Genneral Research*. V. 3, p. 178–189, 2005.

ROUT, G.R.; SAMANTARY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances*, v. 18, p. 91–120, 2000.

RIBEIRO, V.L.S.; TOIGO, E.; BORDIGNON, S.A.L.; GONCALVES, K.; VON POSER, G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 147, p. 199–203, 2007.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *PHYTOCHEMISTRY*, v. 36, n. 6, p. 1381–1385, 1994.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1447-1452, 1995.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; HOSTETTMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 1, p. 185-188, 1996.

SANCHEZ-MATEO, C. C.; PRADO, B.; RABANAL, R. M. Antidepressant effects of the methanol extracts of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 119-127, 2002.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, n. 77, p. 239-245, 2001.

SOUTHWELL, I.A., BOURKE, C.A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). *Phytochemistry*, v. 56, p.437-441, 2001.

Stolz, E.D.; Haas, J.S.; Grazziotin, L.; Wild, L.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. Uliginosina, um floroglucinol isolado de *Hypericum polyanthemum*, apresenta efeito antinociceptivo mediado pela neurotransmissão dopaminérgica. *V Oficina de neurociências – Fronteiras da Investigação*. Garibaldi, Brasil, 2008.

TEKEL'OVÁ, D.; REP ÁK, M.; ZEMKOVÁ, E. Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica*, v. 66, p. 778-780, 2000.

TURNER, M.K. Pharmaceuticals from agriculture: manufacture or discovery? *Industrial Crops and Products*, v.1, p. 125-131, 1992.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 52, p. 253-262, 2000.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) Antinociceptive activity of *Hypericum* spp. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 36, p. 631-634, 2003.



- VIANA, A.; DO REGO, J. -C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A. P.; COSTENTIN, J.; RATES, S. M. K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*, v. 49, p. 1042-1052, 2005.
- VON POSER, G. L.; RECH, S. B.; RATES, S. M. K. Chemical and Pharmacological Aspects of Southern Brazilian *Hypericum* Species. In: Teixeira da Silva, J. A. (Ed.). *Floriculture and Ornamental Plant Biotechnology. Advances and Tropical Issues*, London: Global Science Book, 2006.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, s.1, p. S65-S68, 1994.
- WALTERS, R.G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 411-435, 2005.
- YUNES, R.A., FILHO V.C. Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental: In: Yunes R.A., Calixto J.B., *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó-SC, 523 p. , 2001.
- ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Phytochemical and physiological changes in the leaves of St. John's wort plants under a water stress condition. *Environmental and Experimental Botany*, v. 59, p. 109-116, 2007.

## CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR

---

1º Lugar

### CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS POR NANOFILTRAÇÃO

***Autora:***

Beatriz Camargo Barros de Silveira Mello, 26 anos, brasileira, aluna de doutorado em engenharia de alimentos na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

***País:*** Brasil

# CONCENTRAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS POR NANOFILTRAÇÃO

## RESUMO

A própolis é um produto natural rico em flavonóides e ácidos fenólicos, além de outros grupos químicos, incluindo minerais e vitaminas (provitaminas A e todas as vitaminas do complexo B). Seu extrato é comercialmente encontrado em solução alcoólica. O uso do álcool como solvente gera alguns entraves, tanto para o consumo direto quanto para o uso na indústria, como o alto sabor residual e algumas reações adversas. O uso da água como possível solvente extrator tem sido pesquisado como alternativa de processo, embora ainda não seja utilizado comercialmente. Os produtos apícolas são de grande importância para o MERCOSUL, visto que o setor apresenta grandes potencialidades de exportação, sua implantação é de baixo custo e ainda são pouco explorados pela maioria dos países do cone. A remoção do solvente do extrato de própolis agrega grande valor ao produto e aumenta a sua potencialidade de utilização como ingrediente. Neste trabalho, a nanofiltração foi empregada para a concentração do extrato proveniente da própolis verde, partindo-se de extratos alcoólico e aquoso. Foi utilizada uma membrana em módulo espiral, de massa molar de corte média entre 150 e 300 g/mol. Avaliou-se a influência da variação de pressão, temperatura e velocidade tangencial no fluxo de permeado, além da qualidade dos produtos obtidos por meio da análise de flavonóides e compostos fenólicos. Obteve-se fluxo médio de permeado de 12,0 L/h.m<sup>2</sup> para a solução alcoólica e de 25,0 L/h.m<sup>2</sup> para a aquosa. As taxas de retenção de flavonóides e compostos fenólicos foi de aproximadamente 99% para a solução aquosa e 90% para a solução alcoólica e de compostos fenólicos de cerca de 80% e 24% para soluções aquosa e alcoólica, respectivamente.

**Palavras-chave:** Própolis, nanofiltração, flavonóides, membranas.

## INTRODUÇÃO

Observa-se, cada vez mais, a procura por hábitos de vida e alimentares mais saudáveis, bem como o consumo de alimentos com propriedades funcionais. Neste contexto, os produtos apícolas vêm despertando interesse, tanto nos consumidores quanto nos pesquisadores, graças à sua composição química. A própolis, em especial, destaca-se quanto às suas propriedades terapêuticas (antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante e anestésica), que podem ser utilizadas nas indústrias farmacêutica e de alimentos.

Os compostos fenólicos correspondem a aproximadamente 50% dos constituintes da própolis (KRELL, 1996), mas pode ocorrer uma variação deste percentual de acordo com a região de coleta do produto. Os seus efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos presentes, principalmente os flavonóides (PARK et al., 1998).

A própolis bruta contém diversas substâncias químicas, com diferentes polaridades das moléculas, por isso, é difícil a utilização de um solvente que extraia todos os seus compostos. Entretanto, entre os solventes normalmente utilizados, o álcool etílico possui a maior capacidade de extração, tanto de compostos polares quanto apolares da própolis, sendo o método de extração de própolis atualmente mais utilizado. No entanto, o extrato alcoólico possui vários inconvenientes, como o sabor residual, além de causar reações adversas e contraindicações, decorrentes do uso do álcool como solvente, que pode provocar também a restrição do comércio deste extrato em alguns países (KONISHI et al., 2004).

Conseqüentemente, é muito grande o interesse dos pesquisadores em produzir um extrato de própolis com as mesmas qualidades do extrato alcoólico, mas sem as desvantagens do mesmo. Acredita-se que a concentração do extrato aquoso de própolis possa resultar em um produto com melhores características funcionais, semelhantes às do extrato alcoólico em relação à quantidade de substâncias fenólicas por volume de extrato. Em estudo realizado (PARK et al., 1998), foram analisados extratos de própolis preparados apenas com água como solvente e extratos preparados com uma mistura de água e álcool. Neste estudo, verificaram que a água era o solvente que extraía menos compostos da própolis e o álcool 80% era o melhor solvente para se realizar a extração. Além disso, outros solventes foram testados, como o propileno glicol e a glicerina, mas ainda sem obtenção de resultados tão bons como com o álcool etílico (KRELL, 1996).

Independente do solvente usado em sua preparação, o extrato de própolis muitas vezes precisa ser concentrado antes de ser utilizado industrialmente. O solvente pode acarretar reações químicas com outros componentes das formulações industriais e, além disso, verifica-se uma preocupação quanto à possível interferência indesejável do solvente sobre as características dos compostos de interesse presentes no extrato da própolis (KRELL, 1996). Dessa forma, o estudo de processos de concentração que não utilizam altas temperaturas, como os que empregam membranas, constituem alternativa frente aos processos utilizados tradicionalmente, como a evaporação, a liofilização e a destilação, que necessitam de alta demanda energética.

A apicultura não exige grandes investimentos quando comparada a outras atividades rurais, como a agricultura e pecuária. Em 2006, com um investimento inicial em torno de R\$ 15 mil, era possível montar um apiário completo com 30 colmeias, incluindo todos os materiais e equipamentos necessários para as instalações. O retorno financeiro ocorre em curto prazo – cerca de dois anos –, e com ótima lucratividade, sendo que ao se trabalhar com manejo adequado e florada abundante, cada colmeia pode produzir anualmente 20 quilos de mel, 1,2 quilo de própolis e 4 quilos de cera. Além disso, o apicultor pode investir ainda na apitoxina, o veneno da abelha (CEPA, 2009; GRUPO COLMÉIAS, 2009; LIMA et al., 2006).

O setor apícola vem crescendo nos países do MERCOSUL, com o Brasil e a Argentina como principais produtores. O principal produto do setor é o mel, mas a própolis, um dos outros produtos das colmeias, tem alto valor para exportação, principalmente para o Japão. Como a própolis é considerada um subproduto das colmeias, os seus dados de produção e comercialização são escassos. No entanto, analisando-se o volume de mel produzido pode-se obter uma estimativa da possibilidade de produção de própolis. Em 2003, a Argentina era o maior exportador mundial de mel e o Brasil estava entre os oito primeiros, enquanto os outros países do cone tiveram altas possibilidades de crescimento no setor, devida ao clima e à flora favoráveis (PEREZ; RESENDE; FREITAS, 2005). A tabela 1 mostra a produção de mel dos países partícipes do MERCOSUL em 2007. Além de grandes produtores apícolas, já existem diversas cooperativas montadas - como a cooperativa de Goya, que produziu 18.000 kg de mel na safra 2008-2009 (Noticias Apícolas, 2009) -, que podem facilmente adotar um novo processo de transformação dos subprodutos apícolas. O desenvolvimento

de um produto com alto valor agregado, com grande potencial de utilização e exportação, por meio da aplicação de um processamento de fácil implantação e de baixo custo, pode ser uma boa forma de impulsionar o setor nos países do MERCOSUL, aumentando-se substancialmente a renda destes produtores.

#### **Produção de mel nos países do MERCOSUL (2007)**

<b>Pais</b>	<b>Produção (ton)</b>
Argentina	81.000
Brasil	34.000
Paraguai	1.720
Uruguai	13.200
Venezuela	250

Fonte: FAOSTAT (2009)

O processo de concentração por membranas vem crescendo nos últimos anos, graças às vantagens de se utilizar baixas temperaturas, sem mudança do estado físico do solvente e, conseqüentemente, com menor consumo energético (MATTA; MORETTI; CABRAL, 2004). Este processo é baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas de soluto em membranas semipermeáveis, poliméricas ou inorgânicas, utilizando como força motriz, para a transferência de massa através da membrana, a pressão mecânica (MAROULIS; SARAVACOS, 2003). A nanofiltração é uma operação unitária de separação por membrana que vem tendo importantes aplicações, tais como: a recuperação de solventes resultantes da filtração de óleos, a separação e reuso de catalisadores na indústria farmacêutica, a troca de solventes na indústria química (GEENS et al., 2006) e a concentração de vinhos (BANVOLGYI et al., 2006) e sucos (VINCZE et al., 2006).

Durante o processamento por membranas, alguns compostos presentes na solução de alimentação tendem a se acumular na superfície da membrana, formando uma camada que oferece resistência adicional ao fluxo de solvente, apenas eliminada durante os procedimentos de limpeza, acarretando em diminuição do fluxo de permeado durante o processamento. Esta camada, conhecida como *camada gel*, ocorre devido ao aumento na concentração dos solutos retidos próximo à superfície da membrana, formando um gradiente de concentração entre a superfície da membrana e a zona da corrente de alimentação. Além da *camada gel*, ocorre durante a filtração o *fouling*, que se traduz na penetração de solutos, presentes na solução, nos poros da membrana. A intensidade desse

fenômeno durante o processo depende da interação entre as moléculas constituintes da membrana e as moléculas presentes em solução, das condições operacionais e do tempo de operação (PETRUS, 1997; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Portanto, a viabilidade do processo de concentração por membranas depende, em grande parte, das condições envolvidas no processo, como as propriedades da membrana, a afinidade membrana-soluto, a temperatura da solução e a pressão transmembrana. O controle destas variáveis pode amenizar os efeitos indesejáveis, tais como a formação de camada de gel ou de polarização, *fouling*, histerese, que de certa forma mede a elasticidade da membrana, evitando-se uma redução drástica do fluxo de permeado. Portanto, devem-se avaliar corretamente os principais parâmetros operacionais, pois ao se aumentar a pressão, a velocidade de circulação e a temperatura, pode-se aumentar o rendimento do processo, mas também pode levar a um maior consumo de energia (PILIPOVIC; RIVEROL, 2005). Assim, se justifica o estudo e o estabelecimento de parâmetros operacionais adequados durante o processamento com membranas (USHIKUBO; WATANABE; VIOTTO, 2006).

Este trabalho teve como objetivo o uso da nanofiltração na concentração de extratos aquoso e etanólico de própolis, obtendo-se um produto rico em flavonóides e compostos fenólicos, de alto valor agregado e com ampla aplicação industrial, já que não apresenta as desvantagens da alta concentração de solvente. Foram avaliados os principais parâmetros do processo e feita a comparação com base no teor de flavonóides e compostos fenólicos na solução de alimentação, no concentrado e no permeado, para analisar a retenção dos principais componentes e a qualidade funcional do produto final obtido. A introdução de tecnologias inovadoras na indústria apícola sem dúvida contribuirá para a economia regional do setor, combinadas com o crescimento de mercados urbanos, a importância dos produtos funcionais e com o aumento na exportação de produtos com maior valor agregado.

## RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O projeto relatado neste trabalho envolve o estudo de um novo processo para a concentração de extratos de própolis, produto com importantes propriedades funcionais. Esse novo processo se caracteriza por uma

concentração a frio e representa um grande avanço tecnológico, preservando os componentes de importância nutricional na própolis. Este processo apresenta grande utilidade industrial, comercial e científica, uma vez que a própolis possui importantes características que agregam valor a fármacos e aos alimentos, como os efeitos antibacteriano, antioxidante, antifúngico e anticariogênico. A remoção parcial ou total do solvente usado para a sua extração possibilita maior aplicação da própolis em diversas áreas, principalmente nos setores alimentício e farmacêutico, nos quais um produto natural com características funcionais é altamente desejado para introdução em novos produtos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Própolis*

A própolis bruta foi obtida no Estado de São Paulo, proveniente de colmeias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. Todas as amostras foram retiradas de um mesmo lote, para que não houvesse diferença em relação aos constituintes do produto devido às variabilidades quanto ao clima e à flora. Todo o lote foi mantido sob refrigeração a 4 °C e, posteriormente, usado na preparação dos extratos.

O extrato etanólico foi preparado a partir da própolis bruta triturada em liquidificador convencional, adicionada de álcool etílico 80%. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por sete dias, sob agitação periódica. Após esse período, a solução foi centrifugada (centrífuga Beckman - Allegra 25-R, Beckman Coulter, Alemanha) a 8.800g, mantendo-se a temperatura a 20 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e colocado sob refrigeração a 4 °C. Após 3 horas, o líquido foi novamente filtrado para a remoção de ceras. Finalmente, o líquido foi armazenado sob temperatura ambiente, ao abrigo da luz.

O extrato aquoso foi obtido da mesma forma que o extrato etanólico, utilizando-se água deionizada. Ambos os extratos foram preparados na proporção de 20% de própolis para 80% de solvente. Os extratos foram avaliados de acordo com o seu teor de flavonóides e compostos fenólicos para efeito de comparação com os produtos concentrados. O diagrama de fluxo do processamento está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Diagrama de fluxo do processo de obtenção do extrato de própolis e concentração por nanofiltração



## DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS

A metodologia utilizada está descrita no Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição (1994) e por Park et al. (1995), ambos citados por Moura (2000). Em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato de própolis, previamente diluídos na proporção de 1:10, foram adicionados 0,1 mL de nitrato de alumínio 10%, 0,1 mL de acetato de potássio 1mol/L e 4,3 mL de álcool etílico 80%. As amostras foram homogeneizadas e, após 40 minutos de repouso, fêz-se a leitura espectrofotométrica a 415 nm. A curva padrão foi preparada utilizando-se solução de quercetina em concentrações de 5 a 110 µg/mL.

## DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS TOTAIS

A determinação de polifenóis no extrato de própolis foi feita pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (KUMAZAWA et al., 2004). Em tubos de ensaio foram homogeneizados 0,5 mL da solução de própolis diluída em 1:10 com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10%. As amostras foram homogeneizadas e mantidas em temperatura ambiente, sob o abrigo da luz por 1 hora para posterior leitura espectrofotométrica a 760 nm. Para elaboração da curva padrão, utilizou-se solução de ácido gálico dissolvido em água destilada na concentração de 5 a 200 µg/mL. Os compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg/g).

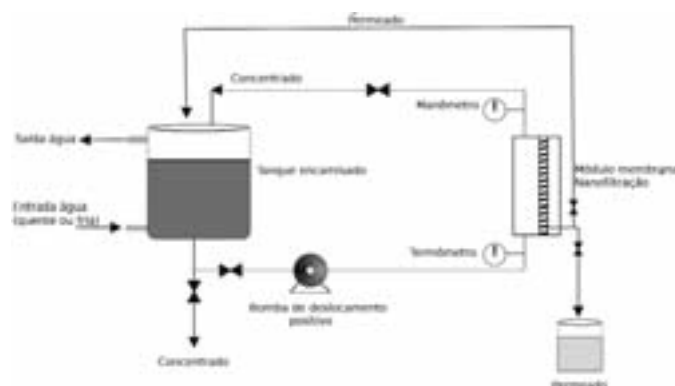
## CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As análises por HPLC foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar (2002) e Park et al. (1998). Pequenos volumes dos extratos a serem analisados foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 260 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B, passou a 60% em 45 minutos, 75% em 85 minutos, 90% em 95 minutos, voltando a 30% em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C e os cromatogramas foram processados utilizando-se software computacional Chromatography Workstation (Shimadzu Corporation, Japão). As amostras dos extratos inicial e concentrado foram diluídas em 1,5 mL de água e as amostras do permeado foram injetadas sem diluição. Foram examinados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonóides (Extrasynthese, Genay, França): ácido -cumárico, ácido ferulico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, campferol, canferide, apigenina, isorramnetina, ramnetina, sacuranetina, isosacuranetina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, rutina e artepelin C, já que estes padrões representam os compostos normalmente mais encontrados em própolis.

## CONCENTRAÇÃO POR MEMBRANA

O processo de concentração foi conduzido em sistema de filtração tangencial em escala piloto, como ilustrado na figura 2. Neste sistema, pode-se trabalhar de forma “fechada”, onde todo o produto permeado retorna ao sistema, e de forma “aberta” onde o permeado é retirado, resultando na concentração da solução de alimentação. Neste experimento, utilizou-se o sistema fechado. Foi utilizada uma membrana de nanofiltração na configuração espiral, fabricada pela Osmonics (Minnetonka, EUA), com área filtrante útil de 0,6m<sup>2</sup>. Esta membrana, segundo informações do fabricante, apresenta rejeição de 98% ao MgSO<sub>4</sub>, à pressão de 6,9 bar e temperatura de 25 °C. Durante a nanofiltração, variaram-se a pressão transmembrana, temperatura e velocidade tangencial do extrato, para que fossem avaliados os efeitos dessas variáveis sobre o fluxo de permeado.

**Figura 2.** Diagrama esquemático da unidade de nanofiltração



A avaliação do fluxo de permeado, para ambos os extratos, foi realizado em sistema fechado à pressão de 6,0 bar e à temperatura de 20 °C. O tempo de operação foi de 50 minutos para a solução aquosa e de 30 minutos para a solução alcoólica. Nos testes efetuados para análise do efeito da pressão no processo, também utilizou-se sistema fechado, a temperatura foi mantida em 20 ± 2 °C, enquanto variou-se a pressão de 1,0 a 5,0 bar, com a finalidade de avaliar o efeito da pressão no fluxo de permeado e a ocorrência de *fouling*. A análise da taxa de *fouling*, que indica o entupimento dos poros da membrana por solutos presentes na solução de alimentação, foi feita comparando-se o fluxo de permeado obtido pela concentração do extrato aquoso de própolis com o fluxo obtido pelo processamento de água destilada pura.

O efeito da temperatura no processo foi analisado em duplicata por meio do aumento gradual de 20 °C a 45 °C e pressão fixada em 6,0 bar em sistema fechado. Baixas temperaturas foram usadas para se evitar a degradação de compostos de importância nutricional presentes na solução e reduzir o consumo energético. A temperatura de degradação dos flavonóides depende de sua estrutura química e da interação entre eles. Em emulsões de extratos de plantas, ocorreu a degradação de flavonóides a partir de 40 °C (BABY et al., 2007). A preparação de alimentos contendo flavonóides, incluindo lavagem, descascamento e cozimento a temperaturas próximas de 100 °C, acarreta uma perda média destes compostos de até 53% (PETERSON; DWYER, 1998). Além disso, Cvek et al. (2007) estudaram o processo de extração da própolis em temperatura ambiente, 50 °C, 70 °C e ebulição. Analisando-se os compostos fenólicos e flavonóides, concluíram que a temperatura ambiente é a que melhor preserva os compostos de interesse.

O produto concentrado foi obtido operando-se o equipamento em sistema aberto sob temperatura de 20 °C e pressão de 6,0 bar até a obtenção de um fator de concentração, calculado conforme a equação 2, igual a 4,0. O produto concentrado e o produto permeado foram analisados em relação ao teor de flavonóides e compostos fenólicos e comparados com os extratos iniciais.

O fluxo de permeado (J), para todas as análises, foi calculado de acordo com a equação 1:

$$J = \frac{V_p}{t.A_m} \quad \text{em que: } V_p = \text{Volume do permeado}$$

$$t = \text{Tempo}$$

$$A_m = \text{Área da membrana}$$

O fator de concentração (F) indica a relação entre a quantidade de solução concentrada obtida em relação à solução inicial de alimentação, e foi determinado utilizando-se a equação 2:

$$F = \frac{V_a}{V_r} \quad \text{em que: } V_a = \text{Volume da solução de alimentação}$$

$$V_r = \text{Volume do retentado}$$

O índice de Retenção (R) fornece a capacidade da membrana em reter um determinado componente, sob condições de operação pré-estabelecidas. É definido pela equação 3:

(3)

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_r}$$

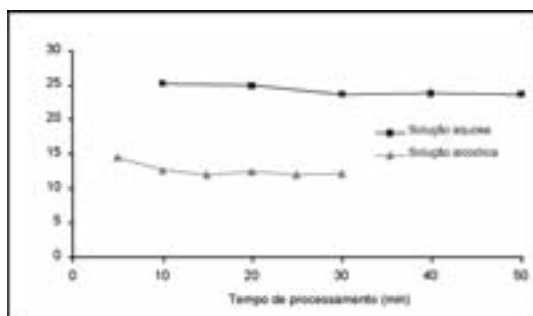
em que:  $C_p$  = concentração do componente no permeado

$C_r$  = concentração do componente no retentado

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fluxo médio de permeado durante a nanofiltração dos extratos de própolis foi de 24,43L/h.m<sup>2</sup> para a solução aquosa e 12,11 L/h.m<sup>2</sup> para a solução alcoólica. Esta diferença nos valores de fluxo entre os extratos pode ser decorrência da maior ou da menor interação dos solventes – água e álcool, com a membrana. Acredita-se, também, que os diferentes compostos de baixo peso molecular extraídos da própolis pelo álcool podem formar uma espécie de cera, promovendo alteração na viscosidade da solução inicial. Estes compostos apresentam característica de adesividade, podendo se fixar à membrana e ocasionar plasticização, maior *fouling* e aumento da camada de gel formada na membrana, resultando na redução do fluxo de permeado. Os dados do fluxo de permeado em relação ao tempo de processamento para as soluções aquosa e alcoólica são mostrados na figura 3:

**Figura 3.** Fluxo de permeado dos extratos aquoso e alcoólico de própolis em função do tempo de processamento, a 20 °C e 6,0 bar



Durante o processamento em sistema aberto, foi possível concentrar a solução aquosa para 25% do seu volume inicial e a solução alcoólica para 33%. Não foi possível obter maior concentração, devido às limitações do equipamento. A partir de fatores de concentrações mais elevados do que aqueles utilizados neste trabalho, certamente poderão ser obtidos extratos com concentrações ainda mais altas de flavonóides e compostos fenólicos a partir dos extratos de própolis. A tabela 2 apresenta as características do extrato de própolis nas diferentes etapas do processo (solução inicial e permeado), em relação aos teores de flavonóides e compostos fenólicos:

**Tabela 2.** Teor de flavonóides e fenólicos após concentração dos extratos alcoólico e aquoso

	Solução	Teor flavonóides (mg/g) <sup>a</sup>	Teor fenólicos (mg/g) <sup>b</sup>
Extrato Alcoólico	Inicial	69,35 ± 0,38	96,74 ± 0,96
	Concentrado	71,93 ± 0,21	105,08 ± 1,5
	Permeado	6,95 ± 2,49	75,07 ± 2,1
Extrato Aquoso	Inicial	23,67 ± 2,14	36,57 ± 0,35
	Concentrado	96,76 ± 2,35	104,74 ± 1,41
	Permeado	0,003 ± 0,003	7,51 ± 1,61

Valores representam média ± desvio padrão (n=3)

<sup>a</sup> equivalentes de quercetina

<sup>b</sup> equivalentes de ácido gálico

Analisando-se os dados obtidos para a solução aquosa concentrada, percebe-se que o teor de compostos fenólicos passou de 3,65% (m/m) no extrato inicial para 10,47% na solução concentrada. Houve uma retenção de cerca de 99% dos flavonóides na solução aquosa e de quase 80% de compostos fenólicos, resultando numa solução concentrada com quatro vezes mais flavonóides e três vezes mais compostos fenólicos que a solução inicial.

A Figura 4 mostra a variação entre o extrato inicial, o permeado e o retentado do processo de concentração do extrato aquoso da própolis:

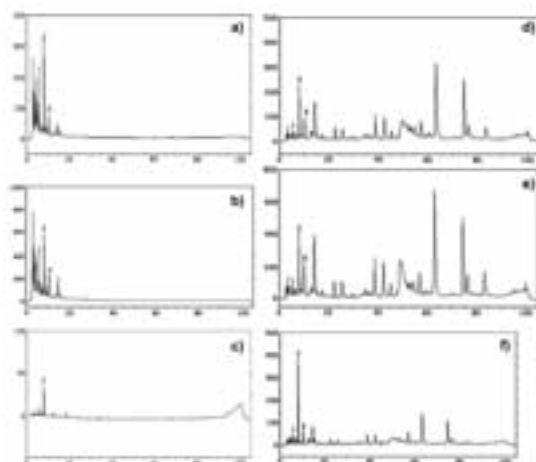
**Figura 4.** Solução aquosa nas diferentes etapas do processamento



Tsui et al. (2007) estudaram a purificação do extrato de milho em solução alcoólica para a produção de xantofila, utilizando-se a nanofiltração. Esses autores obtiveram fluxo de permeado da ordem de 10,0 L/h.m<sup>2</sup>, à pressão de 27 bar e 50 °C. Hossain (2003) estudou o processo de concentração de antocianina por ultrafiltração obtida a partir de resíduos resultantes do processamento de cassis. Foram utilizadas diferentes membranas, onde os autores obtiveram valores de fluxo permeado máximo de 17,3 L/h.m<sup>2</sup> a 1,4 bar e 18 °C. Banvolgyi et al. (2006) estudaram o processo de concentração de vinho tinto (rico em polifenóis, álcool e açúcares) por nanofiltração, em diferentes temperaturas de processamento e pressão de 20 bar e obtiveram valores de fluxo de permeado de 10,0, 15,0 e 20,0 L/h.m<sup>2</sup> para 30, 40 e 50 °C, respectivamente. O processo de concentração do vinho tinto pode ser considerado como o mais próximo da solução alcoólica de própolis, já que possuem compostos comuns em solução e utilizam o álcool como solvente.

Os produtos obtidos também foram comparados por meio de análise por HPLC para identificação dos compostos que estavam sendo preservados e quais estavam sendo perdidos. A Figura 5 mostra esses resultados.

**Figura 5.** Cromatogramas dos produtos obtidos. (a) Cromatograma do extrato aquoso inicial de própolis; (b) Cromatograma da solução aquosa concentrada de própolis; (c) Cromatograma da solução aquosa permeada de própolis; (d) Cromatograma do extrato alcoólico inicial de própolis; (e) Cromatograma da solução alcoólica concentrada de própolis; (f) Cromatograma da solução aquosa permeada de própolis. Os compostos identificados foram: 1: Ácido caféico (MM=180,16 g/mol); 2: Ácido cumárico (MM=164,16 g/mol); 3: Ácido ferúlico (MM=194,18 g/mol).



O índice de retenção avalia o percentual de perda de compostos de interesse para o permeado, ou seja, a quantidade de compostos perdida no processo, calculado de acordo com a equação 3. O ácido cumárico foi o composto que apresentou menor retenção tanto no extrato aquoso quanto no alcoólico, de 56% e 71% respectivamente, enquanto o ácido ferúlico apresentou maior retenção entre os compostos, de 100% para o concentrado aquoso e de 88% para o concentrado alcoólico. A tabela 3 indica esse índice para cada um dos compostos identificados nos cromatogramas:

#### Índice de retenção dos compostos identificados

Composto	Solução aquosa	Solução alcoólica
Ácido caféico	0,89	0,75
Ácido cumárico	0,56	0,71
Ácido ferúlico	1,00	0,88

Para os extratos de própolis foram utilizadas pressões relativamente baixas (6,0 bar) quando comparadas a outros processos estudados na literatura. Entretanto, foram obtidos fluxos de permeado semelhantes, evidenciando a viabilidade da nanofiltração a baixas pressões, resultando em menor consumo energético.

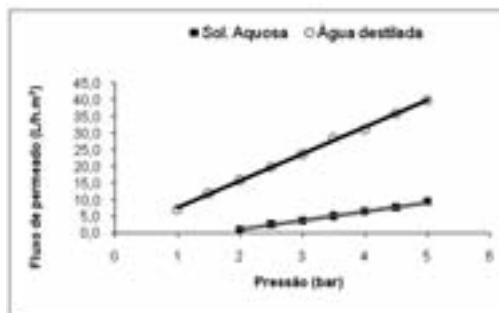
A avaliação do efeito da pressão, da temperatura e da velocidade tangencial no fluxo de permeado, foi realizada utilizando-se apenas a solução aquosa devido à sua maior facilidade de manuseio e de limpeza da membrana, além de menores riscos de inflamabilidade.

Desconsiderando-se os efeitos de compactação da membrana, formação da *camada gel* e *fouling*, a variação de pressão seria diretamente proporcional ao fluxo de permeado dentro de certos limites. Entretanto, o uso de pressões mais elevadas pode levar a uma maior compactação da membrana, resultando na formação de uma *camada gel* mais intensa. O *fouling* resultante da filtração do extrato fica evidente quando se compara o seu fluxo permeado àquele da água destilada, sob as mesmas condições operacionais. O aumento na diferença do fluxo de permeado com o aumento da pressão evidencia o aumento da ocorrência de *fouling*. A pressão foi acrescida gradativamente de 2,0 a 5,0 bar, proporcionando



variação diretamente proporcional no fluxo de permeado e também no *fouling*, chegando a 32% em 5,0 bar. Este fenômeno pode ser observado na Figura 6.

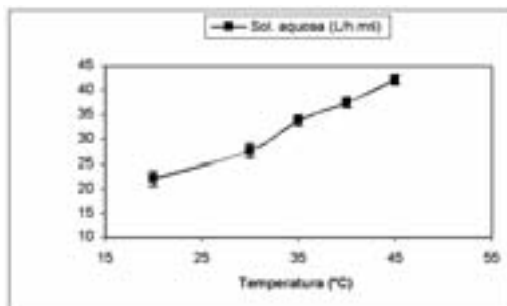
**Figura 6.** Efeito da pressão sobre os fluxos de permeado do extrato aquoso de própolis e de água destilada em função da pressão a 20 °C



Miranda (2005), ao estudar a concentração do suco de melancia utilizando tecnologia de membranas, observou que o efeito de *fouling* é amenizado com a redução da pressão utilizada, mas não foi influenciado pela temperatura. Assim, mesmo para soluções com diferentes composições, o efeito do *fouling* geralmente é menos acentuado quando se trabalha a menores pressões. Entretanto, a redução do fluxo de permeado, provocada pela diminuição da pressão, pode tornar o processo economicamente inviável devido à baixa produtividade do sistema.

É sabido que o aumento de temperatura reduz a viscosidade de uma solução e aumenta a sua difusividade através da *camada gel* e da própria membrana. O efeito da temperatura no processamento do extrato de própolis aquoso é mostrado na Figura 7.

**Figura 7.** Fluxo de permeado em função da temperatura à pressão de 6,0 bar



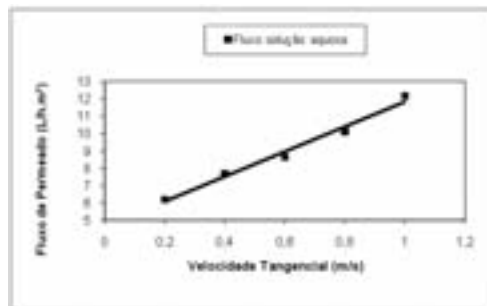
O aumento de temperatura leva ao aumento no fluxo de permeado, graças à redução da viscosidade da solução. Entretanto, temperaturas muito altas podem elevar o grau de compactação da membrana ou mesmo alterar suas propriedades, podendo ocorrer aumento aparente do tamanho dos poros e alteração da interação entre membrana e solução, interferindo no processo de concentração (PETRUS, 1997).

Pela Figura 7, observa-se que houve um acréscimo no fluxo permeado, diretamente proporcional ao aumento de temperatura. O aumento de 25 °C na solução inicial resultou num aumento de aproximadamente 100% no fluxo permeado. No entanto, o uso de temperaturas elevadas deve ser investigado, para se evitar ou amenizar possíveis alterações térmicas na estrutura dos compostos de interesse. Estas alterações podem, inclusive, resultar em perda das atividades biológica e nutricional destes compostos.

Trabalho visando a concentração de outro produto, por meio da nanofiltração, como o vinho tinto (BANVOLGYI et al., 2006), mostrou que um aumento de 20 °C na temperatura de processo também resultou em aumento no fluxo de permeado da ordem de 100%.

A turbulência junto à superfície filtrante, seja em filtração perpendicular ou tangencial, controla de maneira importante a formação da zona de polarização e a espessura da *camada gel*. Esse efeito de turbulência é mais pronunciado na filtração tangencial, onde a solução escoia a alta velocidade junto à membrana. Desta forma, a velocidade de circulação da solução, durante a concentração, tem fundamental importância sobre o fluxo de permeado. O aumento da velocidade tangencial gera um aumento na turbulência da solução junto à membrana, diminuindo os efeitos adversos da zona de polarização. Neste trabalho, verificou-se que o fluxo permeado foi proporcional ao aumento da velocidade tangencial, conforme mostrado na Figura 8:

**Figura 8.** Efeito da velocidade tangencial sobre o fluxo de permeado a 20 °C e 6,0 bar



## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que é possível a obtenção de um extrato de própolis concentrado, com alto teor de compostos funcionais e com poucas perdas destes compostos durante o processo para o permeado, em especial ao se processar o extrato aquoso de própolis. O extrato aquoso inicial possuía 23,67 mg/g de flavonóides e após a concentração passou a ter concentração de 96,76 mg/g. Avaliando-se todos os resultados do processo, pode-se afirmar que o produto obtido é de grande qualidade e possui alto valor agregado. O processo não apresenta altos custos de implantação e não requer mão-de-obra altamente especializada para a sua operação.

Devido ao clima e flora favoráveis à produção de própolis com alta qualidade, o MERCOSUL pode se favorecer com a implantação do processo para obtenção do concentrado de própolis, por meio do aumento do valor das exportações desse produto, uma vez que esse já seria pré-processado antes da exportação. Ou seja, a própolis será um produto de valor ainda maior para os seus produtores e comerciantes.

## BIBLIOGRAFIA

- BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, nº 3, p. 405-412, 2007.
- BANVOLGYI, S.; KISS, I.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. Concentration of red wine by nanofiltration. *Desalination*, v.198, p. 8-15, 2006.
- CEPA – Centro de Socioeconomia e planejamento agrícola. *Custo de produção – mel*. Disponível em <[http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/custos/custo08/ago08/Mel\\_implantacao.xls](http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/custos/custo08/ago08/Mel_implantacao.xls)>. Acesso em 12 ago. 2009.
- CVEK, J.; MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIC, S.; VITALI, D. MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIC, I.; TOMIC, S. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, v. 18, p. 451-459, 2007.
- CVEK, J.; MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIC, S.; VITALI, D. MORNAR, FAOSTAT. *FAO Statistical Database*, Natural Honey, 2009. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>. Acesso em 18/06/2009.

GEENS, J.; BOUSSU, K.; VANDECASTEELE, C.; VAN DER BRUGGEN, B. Modelling of solute transport in non-aqueous nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 281, p. 139-148, 2006.

GRUPO COLMÉIAS. *Estimativas de faturamento*. Disponível em [http://www.colmeias.org.br/arquivos/artigos/artigos\\_arquivos/altaprodutividade.rtf](http://www.colmeias.org.br/arquivos/artigos/artigos_arquivos/altaprodutividade.rtf). Acesso em 12/08/2009.

HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. *Processos de Separação por Membranas*. Ed. e-papers, Rio de Janeiro, 180p., 2006.

HOSSAIN, M. M. Concentration of anthocyanin pigments in blackcurrant pomace by ultrafiltration. *Food Australia*, v. 55, p. 263-266, 2003.

KONISHI, S.; SAWAYA, A.; CUSTÓDIO, A. R.; CUNHA, I.; SHIMIZU M. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Mensagem Doce*, v. 75, p. 22-25, 2004.

KRELL, R. *Value-added products from beekeeping*. FAO agricultural services bulletin no. 124, 1996. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>>. Acesso em 29 jan. 2008.

KUMAZAWA, S.; HAMASAK, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, v. 84, p. 329 – 339, 2004.

LIMA, C.A.; OLIVEIRA, J.; PEDREIRA, A.J.L.A.; CASTIGLIONI, S.A.C. Estudo da viabilidade financeira da implantação de um apiário para a produção de própolis e mel. *XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural*, 2006. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/5/869.pdf>>. Acesso em 24 ago. 2009.

MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. *Food Process Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003. Cap. 10.

MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 477-482, 2004.

MELLO, B.C.B.S. *Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas*. 2008. 110p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- MIRANDA, K. F. *Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (Citrullus vulgaris Schard)*. 2005. 149 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MOURA, F. F. *Contribuição das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Própolis Produzida por Apis mellifera na Região Nordeste do Brasil*. 2000. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Noticias Apícolas. *La Cooperativa Apícola de Goya crece y exporta*. Disponível em: <<http://www.noticiasapicolas.com/goya.htm>>. Acesso em 05 ago. 2009.
- PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. D. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, p. 313-318, 1998.
- PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. Mel: exportações fazem produção aumentar de Norte a Sul. *IEA-Instituto de economia agrícola*. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2078>>. Acesso em 05 ago. 2009.
- PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, v. 18, no. 12, p.1995-2018, 1998.
- PETRUS, J. C. C. *Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas*. 1997. 139 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p.437-441, 2005.
- TSUI, E. M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. *Journal of Food Engineering*, v. 83, p. 590-595, 2007.
- USHIKUBO, F.Y.; WATANABE, A.P.; VIOTTO, L.A. Effects of operating conditions and enzyme treatment on fouling and polarized layer formation during umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice microfiltration. *Desalination*, v.200, p. 546-548, 2006.
- VINCZE I.; STEFANOVITS-BÁNYAIB E.; VATAI G. Using nanofiltration and reverse osmosis for the concentration of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice. *Desalination*, v. 200, p. 528-530, 2006.

# CATEGORIA INTEGRAÇÃO

1º Lugar

## APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE EFLUENTES DE QUESERÍA PARA LA ELABORACIÓN Y PRESERVACIÓN DE PROBIÓTICOS

***Autores:***

Alejandra Londero, 27 anos, argentina, bióloga; Anália Graciela Abraham, 48 anos, argentina, doutora em ciências bioquímicas; Andrea Gómez-Zavaglia, 40 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Andrés Illanes Frontaura, 61 anos, chileno, doutor em engenharia bioquímica; Angela Maria León Peláez, 41 anos, colombiana, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Carlos Andrés Serna Cataño, 24 anos, colombiano, engenheiro de alimentos; Edilson Arley Quintero Yepes, 24 anos, colombiano, engenheiro de alimentos; Emiliano Javier Kakisu, 32 anos, argentino, doutorando em ciências biológicas; Emma Elizabeth Tymczyszyn, 33 anos, argentina, doutora da Universidade de Buenos Aires; Graciela Liliana de Antoni, 60 anos, argentina, doutora em ciências bioquímicas; Graciela L. Garrote, 39 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; María de los Angeles Serradell, 35 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Marina Alejandra Golowczyc, 32 anos, argentina, doutora da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Oscar Esteban Gerbino, 28 anos, argentino, doutorando da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Pablo Mobili, 34 anos, argentino, doutor da Faculdade de Ciências Exatas da Universidade Nacional de La Plata; Pablo Fernando Pérez, 48 anos, argentino, doutor em bioquímica; e Paula Carasi, 25 anos, argentina, doutoranda em microbiología

***País:*** Argentina, Chile e Colômbia

# APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE EFLUENTES DE QUESERÍA PARA LA ELABORACIÓN Y PRESERVACIÓN DE PROBIÓTICOS

## RESUMEN

Este trabajo propone estrategias no convencionales para optimizar la preservación de microorganismos probióticos aislados de kefir crecidos en suero de quesería.

El trabajo conjuga la experiencia de investigadores argentinos en el estudio de propiedades probióticas de bacterias lácticas y en la utilización de compuestos polihidroxilados para su preservación, la experiencia del grupo chileno en las aplicaciones biotecnológicas de los prebióticos y la experiencia del grupo colombiano en aspectos sociales de la investigación en alimentos. Todos los grupos forman parte de una Red Iberoamericana financiada por el Programa Cyted.

La propuesta plantea un desarrollo tecnológico para el aprovechamiento del suero de quesería en la elaboración de un producto fermentado (y posteriormente deshidratado) utilizando microorganismos probióticos aislados de kefir de la colección del CIDCA. El producto obtenido podrá ser utilizado en la alimentación humana y animal.

Este desarrollo permitirá la transformación del suero de quesería en un producto de mayor valor agregado con posibilidad de ser comercializado. Asimismo, se propone por primera vez la utilización de galactooligosacáridos (obtenidos a partir del permeado de suero) como protectores durante la deshidratación del producto. Por su acción prebiótica, los GOS podrían además, generar un efecto sinérgico al ser administrados junto con el probiótico producido. Así, la utilización de lactosuero como sustrato de fermentación y de GOS como protectores de la deshidratación permitirá el aprovechamiento integral de un efluente altamente contaminante como es el lactosuero.

De acuerdo a lo expuesto, es de esperar que el producto tenga un impacto positivo en el desarrollo económico y social de Sudamérica tanto por sus propiedades probióticas como por su valor comercial.

## INTRODUCCIÓN

Las investigaciones sobre probióticos se han incrementado significativamente en los últimos años, principalmente aquellas orientadas a la aplicación en seres humanos. En este sentido, el mayor consumo de probióticos por el hombre es en la forma de productos lácteos que contienen lactobacilos y/o bifidobacterias, y en segundo lugar se encuentran las formas farmacéuticas (polvos y tabletas). Los beneficios potenciales que derivan del consumo de probióticos incluyen: una mayor resistencia a infecciones, en particular infecciones intestinales; disminución de la duración de las diarreas; reducción de la concentración de colesterol sérico; reducción de la concentración de sustancias tóxicas y mutagénicas a nivel intestinal; aumento de la concentración de enzimas digestivas; modulación de la respuesta inmune. Las bacterias ácido lácticas y bifidobacterias probióticas son los microorganismos más frecuentemente aplicados en preparaciones farmacéuticas, aditivos alimentarios y alimentos funcionales.

El kefir es una leche fermentada originaria del Cáucaso euroasiático, consumida actualmente en países del este europeo y obtenida inoculando leche con gránulos de kefir (asociación simbiótica de bacterias y levaduras, incluidas en una matriz de proteína y polisacárido). El kefir está descrito en el Código Alimentario Argentino (art. 553 res. 1276, 19/7/88), Reglamento Técnico Mercosur de Identidad y Calidad de Leches fermentadas (Res. 47/97 -2.1.2.1.3-; XXVIII GMC-Montevideo) y en el *Internacional Dairy Bulletin*. Se ha observado que el consumo de kefir causa beneficios para la salud (FARNWORTH, 2005). Así, en Europa del este, el kefir ha sido administrado empíricamente para el tratamiento de personas con desórdenes metabólicos, arterosclerosis, enfermedades alérgicas y tuberculosis. Asimismo, ha sido demostrada la participación del kefir en la estimulación del sistema inmune y la actividad antibacteriana y antifúngica (THOREUX y SCHMUCKER, 2001; VINDEROLA et al., 2005 y 2006; LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Estas características probióticas pueden ser atribuidas a la compleja asociación de microorganismos que constituyen los gránulos de kefir. La microflora compleja está constituida por bacterias



lácticas, bacterias acéticas y levaduras que se desarrollan en asociación simbiótica (GARROTE et al., 2001; WITTHUHN et al., 2004; BOSCH et al., 2006). Entre los productos del metabolismo microbiano se encuentran los ácidos láctico y acético, dióxido de carbono, productos de proteólisis, polisacáridos, bacteriocinas, etanol.

Las diarreas infecciosas están dentro de las patologías más comunes asociadas al consumo de agua y alimentos contaminados con microorganismos patógenos u oportunistas. Dentro de estos microorganismos se cuentan la *Shigella* spp, *Campylobacter* spp, *Salmonella* spp y *Escherichia coli* enteropatógenicas.

El número mundial de casos de shigellosis está estimado en unos 164 millones, de los cuales el 99 % corresponde a países en vías de desarrollo. El 69 % de esos casos corresponde a niños menores de cinco años (KOTLOFF et al. 1999).

Por su parte, *Campylobacter* resulta ser el agente causal de un número de casos similares, siendo entre el 1 y 1.1 % de la población de EE.UU y del Reino Unido afectada anualmente por esta bacteria (SNELLING et al., 2005). De acuerdo a datos obtenidos de los Boletines Anuales del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Sinave), dependiente de la Dirección Nacional de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación (<[www.direpi.vigia.gov.ar](http://www.direpi.vigia.gov.ar)>), en Argentina han sido informados en 2003 y 2004, un total de 477 mil y 478 mil casos respectivamente en niños menores de cinco años y 414 mil y 453 mil casos respectivamente en niños mayores de cinco años.

Por otra parte, han sido reportados alrededor de 200 casos al año casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) provocados por *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) en los años 2003 y 2004.

Los Hospitales Públicos Pediátricos que realizan relevamientos anuales han informado que *Shigella*, *Campylobacter* y *E. coli* enteropatógena son los agentes causales más frecuentes en diarreas infecciosas bacterianas. Desde un punto de vista epidemiológico, la *Shigella* es importante por estar asociada a brotes epidémicos de diarreas infecciosas. Las especies prevalentes de *Shigella* en Argentina y Chile son *S. flexneri* y *S. sonnei* (FERNÁNDEZ. et al., 2004; HAMILTON-WEST et al., 2007). Por otro lado, *Campylobacter* además de estar asociado a diarreas infecciosas como agente causal, se lo relaciona con secuelas posteriores graves como es el síndrome

de Guillen-Barré, una patología del sistema nervioso central. En el caso de *Campylobacter*, *C. jejuni* y *C. coli* son las especies de *Campylobacter* más frecuentemente informadas (SNELLING et al., 2005). La *E. coli* ECEH se identifica como el agente causal del SUH, siendo Argentina el país que más casos por año presenta de esta patología a nivel mundial en niños menores de cinco años (CALETTI et al., 2006). Cabe remarcar que el SUH tiene una elevada tasa de mortalidad si se lo compara con los casos de diarreas infecciosas bacterianas, en cuyo caso la tasa de morbilidad es elevada (CALETTI et al., 2006).

La contaminación de alimentos por hongos filamentosos y levaduras no sólo es causa de grandes pérdidas económicas en todo el mundo, sino que además conlleva la producción de esporas alergénicas y la liberación de micotoxinas (PITT y HOCKING, 1999). Las micotoxinas presentes con más frecuencia en alimentos son las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1 (PITT, 2000). Las aflatoxinas, producidas en la naturaleza por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, representan un problema de salud pública ya que son tóxicas para los animales y el hombre, causando daño en el hígado, cirrosis, inducción de tumores y efectos teratogénicos (STOLOFF y DALRYMPLE, 1977). El Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH) aceptó que la aflatoxina M1, producida por los rumiantes que consumen los piensos contaminados y secretada en la leche, es un carcinógeno genotóxico cuya potencia es unas diez veces menor que la de la aflatoxina B1. Teniendo en cuenta que la ingesta de leche y productos lácteos es especialmente importante entre lactantes y niños pequeños, es necesario valorar cuidadosamente los riesgos derivados de la exposición a las aflatoxinas (CCAH, apartado 4 de CX/FAC 97/16).

Además de los ácidos láctico y acético producidos por bacterias lácticas, existen otras sustancias de tipo bacteriocinas con actividad antifúngica (MAGNUSSON y SCHNÜRER, 2001; NIKU-PAAVOLA et al., 1999; STRÖM et al., 2002). En este sentido, ha sido determinada la capacidad antifúngica del ácido feniláctico y 4-hidroxifeniláctico producidos por una cepa de *L. plantarum* aislada de masa ácida (LAVERMICOCCA et al., 2000). Teniendo en cuenta lo expuesto, resulta de interés la búsqueda de compuestos con capacidad antifúngica y la interpretación de los mecanismos involucrados en la inhibición del desarrollo de hongos toxigénicos y la producción de micotoxinas.

El suero de leche (lactosuero) es un efluente de la industria quesera rico en lactosa (aproximadamente 80 % en base seca) y proteínas (10 % en base seca), representadas principalmente por la  $\beta$ -lactoglobulina (58 %) y la  $\alpha$ -lactoglobulina (13 %). Su procesamiento como residuo es muy caro debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno ((DBO) (35.000 mg/l)). La comparación de este valor con la DBO de aguas cloacales, por ejemplo (120 a 300 mg/l) refleja la magnitud del problema que representan estos efluentes. Otra comparación interesante es considerar el poder contaminante de un individuo (70 000 mg/día de DBO) con el del suero de quesería (35.000 mg/l DBO). Con un volumen de 1.000.000 litros diarios de suero, el grado de contaminación de una fábrica equivaldría al de una población de 500.000 habitantes, dando así una idea clara de la magnitud de la contaminación ambiental que puede producir una sola fábrica si no se utiliza ese efluente (CANALE, R.,1971).

El suero seco es un producto valioso, aunque su mercado es muy inestable. No obstante, el alto costo de evaporación (el suero líquido contiene menos de 10 % de sólidos) hace en muchos casos inviable su procesamiento, sobre todo en queserías de tamaño medio o pequeño. El suero de quesería es generalmente utilizado para alimentación de porcinos y terneros pero la tendencia actual es hacia el desarrollo de una plataforma tecnológica que permita convertir el suero en productos con un alto valor agregado. Así, para resolver el problema de la contaminación ambiental derivada de efluentes de quesería y teniendo en cuenta la composición química del lactosuero, han sido desarrolladas diferentes estrategias para su utilización. Debido a su elevado valor nutricional, las proteínas del lactosuero han sido usadas como sustrato para la obtención de aislados y concentrados proteicos para la preparación de yogures y otros productos lácteos, productos de confitería, fórmulas infantiles, etc. La utilización de las proteínas de suero deja un nuevo efluente que es el permeado de suero, con alto contenido de lactosa, que puede ser empleado para producir jarabes edulcorantes mediante hidrólisis e isomerización enzimáticas y también como materia prima para la producción de galacto-oligosacáridos (GOS) de comprobada acción prebiótica (BOUHNİK et al., 1997; FANARO et al., 2009; FARNWOTH, 2005; SEARLE et al., 2009). Así, teniendo en cuenta que las proteínas de lactosuero son normalmente utilizadas en mayor o menor medida dependiendo de cada país, el permeado de suero se transforma en un efluente relevante. Su utilización para la producción de jarabes mediante hidrólisis o transgalactosilación de la lactosa permitiría un mayor

aprovechamiento del lactosuero, reduciendo el problema de contaminación ambiental y permitiendio valorar los excedentes de suero que económicamente no son factibles de secar.

Los gránulos de kefir son capaces de crecer en leche y lactosuero. Sin embargo, a la hora de elaborar un producto comercial es difícil mantener una calidad constante debido a la complejidad microbiana de los gránulos. Por esta razón, la elaboración de un producto probiótico de calidad constante a partir del kefir sería posible si se seleccionaran determinadas cepas presentes en los gránulos y se las utilizara para la fermentación de leche o lactosuero en condiciones estandarizadas. En este trabajo se describirán propiedades probióticas de cepas aisladas de kefir y se propondrá su utilización como *starters* para la elaboración de un producto fermentado a partir de suero de quesería. Asimismo se discutirá acerca del método más adecuado para su preservación.

#### PRESERVACIÓN DE *STARTERS*

En la elaboración de un producto fermentado, su conservación es fundamental para asegurar la viabilidad de los microorganismos a mediano y largo plazo. Un método de conservación ideal debería permitir la obtención de concentrados bacterianos viables con propiedades semejantes a las de las bacterias antes de ser sometidas al tratamiento. La liofilización y la congelación son los dos tratamientos generalmente utilizados para la preservación de cepas. Sin embargo, producen daños que ocasionan la pérdida de viabilidad y de ahí que su efectividad no sea la deseada (ABEE y WONTERS, 1999).

Para mejorarla, se utilizan agentes crioprotectores (trehalosa, lactosa, sacarosa, manitol, glicerol, sorbitol, entre otros), que evitan la formación de cristales de hielo intra e intercelulares permitiendo así incrementar la supervivencia de los microorganismos. Durante la congelación o liofilización se produce además una disminución de la actividad del agua que lleva a la alteración estructural de la membrana celular y de las proteínas (BILLI et al., 2000). Los crioprotectores mencionados tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las distintas estructuras celulares manteniendo así su conformación y funcionalidad, y en última instancia, protegiendo a las células (DE ANTONI et al. ,1989; POTTS, 1994; CROWE et al., 1998; Leslie et al., 1995; Oldenhof et al., 2005).

Si bien la eficiencia de la congelación y liofilización se ve favorecida por el empleo de crioprotectores, los costos de producción y almacenamiento asociados a estos métodos de preservación son elevados. Por esta razón, en los últimos años se ha difundido como método alternativo la conservación de *starters* bacterianos mediante el secado por atomización (spray) (KIM y BHOWMIK, 1990). Este proceso consiste en una brusca deshidratación con una corta exposición de las bacterias a temperaturas entre 60-70 °C (TEIXEIRA et al., 1995 y 1997). El uso de *starters* secados en spray ofrece importantes ventajas económicas con respecto a la congelación y liofilización debido principalmente a la facilidad de uso en grandes cantidades y a los bajos costos de almacenamiento. No obstante, en este proceso las bacterias se ven expuestas a estrés hídrico y térmico, que puede reducir su viabilidad (TEIXEIRA et al., 1995 y 1997; JORGENSEN et al., 1994). Asimismo, han sido publicados numerosos trabajos referentes al secado en spray de suero y concentrados de bacterias lácticas. Ha sido demostrado que el proceso realizado en condiciones controladas (pH, temperaturas, concentración de sólidos y humedad relativa final, tipo y concentración de termoprotectores, concentración inicial de producto fluido y caudal de alimentación) permite obtener un polvo fácil de reconstituir y sin alteraciones químicas ni microbiológicas (SILVA et al., 2005). De acuerdo con estos datos, la deshidratación de suero fermentado permitiría obtener un producto con las mismas características químicas y microbiológicas que el suero fermentado fresco.

## UTILIZACIÓN DE GOS

Los *prebióticos* han sido definidos como “ingredientes alimenticios que favorecen el crecimiento y/o actividad de una bacteria específica o de un número de especies bacterianas que tienen efecto benéfico en la salud” (GIBSON y ROBERFROID, 1995). Idealmente, un prebiótico no debería ser hidrolizado ni absorbido en la parte superior del tracto digestivo, debería estimular selectivamente el desarrollo y metabolismo de la flora bacteriana benéfica del colon e inducir efectos sistémicos favorables a la salud intestinal. La acción prebiótica de los GOS ha sido extensamente descrita en la bibliografía (ALANDER et al., 2001) y no nos referiremos a ella en este trabajo.

Teniendo en cuenta la naturaleza polihidroxilada de los GOS, estrechamente relacionada con la estructura de los azúcares, es razonable

pensar que si azúcares como trehalosa y/o sacarosa son eficientes termoprotectores de bacterias lácticas (GÓMEZ-ZAVAGLIA et al., 2003; TYMCZYSZYN et al., 2005, 2007 a y b, 2008), los GOS también podrían serlo. Esta hipótesis está sustentada en el hecho de que compuestos químicamente relacionados con los GOS, los fructo-oligosacáridos (FOS), cuya acción prebiótica también ha sido descripta, son capaces de actuar como crioprotectores en la congelación de liposomas (LIVINGSTON et al., 2009; SCHWAB et al., 2007).

Específicamente, el rol protector de los GOS no ha sido referido de manera directa (WIENEKE et al., 2007) y esto alienta su utilización como protectores en procesos de preservación de *starters* industriales.

La eficiencia de los GOS como termoprotectores está siendo evaluada sobre una cepa especialmente sensible a todos los procesos de preservación (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 331) (DE ANTONI et al., 1989; GÓMEZ-ZAVAGLIA et al., 2003; TYMCZYSZYN et al., 2005, 2007 a y b, 2008). La eficiencia de los GOS en la preservación de esta cepa resultará un soporte fundamental para la utilización de estos oligosacáridos en la preservación de *starters* obtenidos a partir de cepas aisladas de kefir.

El estudio de los GOS como termoprotectores reviste sumo interés tanto desde el punto de vista básico como aplicado. Desde el punto de vista básico, el análisis del comportamiento termodinámico de GOS (determinación de temperaturas de transición vítrea, por ejemplo) permitirá determinar el mecanismo de acción protectora de estos compuestos. Además, la determinación de los daños producidos en las bacterias luego de la utilización de GOS como termoprotectores permitirá dilucidar los mecanismos involucrados en la protección mediada por GOS. Desde un punto de vista aplicado, relacionado con la agroindustria, la utilización de GOS como termoprotectores permitirá el aprovechamiento del lactosuero, contribuyendo a reducir el problema de contaminación ambiental que su disposición acarrea. Se abren así interesantes perspectivas relacionadas con nuevas aplicaciones de los GOS.

## RESULTADOS PREVIOS OBTENIDOS POR LOS GRUPOS

### GRÁNULOS DE KEFIR Y LECHE FERMENTADA

En el grupo argentino han sido estudiados 10 gránulos de kefir de distintas procedencias, los cuales resultaron diferentes desde el punto de vista tecnológico, microbiológico y probiótico (no todos los gránulos aumentan su biomasa con igual velocidad, ni presentan las mismas capacidades inhibitorias y son diferentes desde el punto de vista organoléptico) (GARROTE, 2001). Los gránulos AGK1 presentan las mejores propiedades probióticas *in vitro*, mientras que los AGK10 son tecnológicamente más adecuados, estos últimos poseen mayor velocidad de reproducción y mejores propiedades organolépticas.

Ha sido estudiado el efecto de la conservación de los gránulos mediante refrigeración, congelación a diferentes temperaturas y en distintos medios sobre la actividad de los gránulos y las características de la leche fermentada. Se estudiaron diferentes variables de proceso tales como distintas relaciones gránulo de kefir/leche, temperatura de fermentación y procedencia de los gránulos, encontrándose diferencias significativas en lo referente a pH final, concentración de bacterias y levaduras, concentración de exopolisacárido, de dióxido de carbono y composición de ácidos orgánicos en las leches fermentadas (GARROTE et al., 1997 y 1998; GARROTE, 2001).

Estos estudios indican que el kefir es una leche potencialmente probiótica ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre diferentes patógenos Gram positivos y Gram negativos. La acción inhibitoria se debe principalmente a la presencia de ácido láctico y ácido acético producidos por los microorganismos presentes en el gránulo. El efecto bacteriostático o bactericida depende la concentración de ácidos excretados por los microorganismos del gránulo (GARROTE, 2001; GARROTE et al., 2000).

Por otra parte, tanto la leche fermentada con gránulos de kefir como el sobrenadante de cultivos de algunos lactobacilos aislados del mismo poseen efecto bactericida sobre cepas de *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enterohemorrágica de origen humano (Golowcycz, 2008; Kakisu, 2004; Kakisu et al., 2007).

## FERMENTACIÓN DE SUERO CON GRÁNULOS DE KEFIR

Los gránulos de kefir son capaces de acidificar suero de leche, de quesería líquido y en polvo reconstituido, aumentando su tamaño con los repiques sucesivos. La compleja microflora asociada a la matriz del gránulo se reproduce y parte de ella es liberada al suero. Durante la fermentación de suero con kefir a 20 °C ocurre un descenso del pH, una disminución del contenido de lactosa y se produce polisacárido (RIMADA y ABRAHAM, 2001, 2003 y 2006). Además, en el suero fermentado la microflora de kefir permanece viable y además, este producto posee propiedades inhibitorias *in vitro* contra bacterias Gram negativas.

## ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES PROBIÓTICAS DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE KEFIR

Los aislados de distintos gránulos fueron identificados a nivel de género y especie por métodos microscópicos, bioquímicos y moleculares y forman parte de la colección de cepas del CIDCA (GARROTE, 2001).

Actualmente se cuenta con 20 cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 *Leuconostoc* sp, 20 *Lactobacillus kefir*, 2 *L. parakefir*, 22 *L. plantarum* (Tablas 1, 2 y 3).

- La colección de lactobacilos ha sido estudiada en cuanto a sus características probióticas pudiendo determinarse cuáles de dichos aislados son resistentes a bajos pH, toleran la bilis, poseen la capacidad de autoagregar y coagregar con otros microorganismos, se adhieren a enterocitos en cultivo, inhiben la acción de toxinas o microorganismos patógenos (HUGO et al., 2008).
- Ha sido comprobado que la proteína de capa-S<sup>1</sup> de *L. kefir* aislada y la excretada naturalmente al medio de crecimiento se deposita sobre la superficie de *Salmonella* y disminuye su capacidad invasiva (GOLOWCZYC et al., 2007).
- Por otra parte, ha sido determinado que las paredes de algunas cepas de *L. plantarum* poseen la capacidad de inhibir la acción citotóxica de la toxina Shiga de EHEC frente a células Vero (HUGO et al., 2006).

1. La capa S constituye la capa más externa que envuelve la pared celular bacteriana. Esta capa está formada por el ensamblaje regular de subunidades idénticas de proteínas o glicoproteínas, y representa la proteína celular más abundante. Estas subunidades, generalmente dispuestas en forma de redes simétricas, con cavidades oblicuas, cuadradas o hexagonales, muestran una tendencia intrínseca a reensamblarse en arreglos bidimensionales luego de ser removidas y disgregadas durante el proceso de extracción con agentes caotrópicos como el LiCl o el cloruro de guanidinio.



- Asimismo ha sido observado que sobrenadantes de algunas cepas de kefir (*L. plantarum* CIDCA 83114, *L. kefir* 8348, *Lactococcus lactis* CIDCA 8221, CIDCA 8212, CIDCA 8232 y CIDCA 8226) disminuyen la expresión del promotor del gen *flaA* de *Campylobacter* en *E. coli* utilizando como reportero un sistema acoplado a los genes *luxBCADE* (FERNÁNDEZ et al., 2004)

**Tabla I.** Propiedades superficiales y probióticas de lactobacilos de la colección CIDCA

Cepa CIDCA	Gránulo de kefir	H%	AC <sub>t</sub>	CC <sub>t</sub>	H <sub>t</sub>	Capa-S (kDa)	Resistencia la bilis	% Adh	Inhibición E.coli
L. kefir 8310	AGK1	88.5±1.5	0	0	-	71±1	++	ND	-
L. kefir 8314	"	93.5±0.5	0	0	-	71±1	++	+	-
L. kefir 8315	"	66.0±6.0	0	0	+	71±1	++	+	-
L. kefir 8317	"	88.0±4.0	0	0	-	71±1	++	-	-
L. kefir 8319	"	79.0±2.0	0	0	-	71±1	-	ND	-
L. kefir 83110	"	92.5±1.5	0	0	-	71±1	-	ND	-
L. kefir 83111	"	80.5±2.5	0	0	-	69±1	++	ND	-
L. kefir 83113	"	78.0±2.0	0	3.0±0.5	-	66±1	+++	2.6±0.7	-
L. kefir 83115	"	67.0±0.0	51.0±6.0	13.7±4.8	-	66±1	++	1.0±0.3	+
L. kefir 83116	"	93.0±1.0	0	0	-	71±1	+	ND	-
L. kefir 8321	AGK2	88.0±0.0	52.0±5.4	19.7±8.7	+	66±1	++	3.0±1.3	-
L. kefir 8325	"	79.0±0.0	57.6±5.5	6.0±1.2	+	66±1	++	1.5±0.6	-
L. kefir 8332	AGK3	92.5±2.5	0	0	+	71±1	+	+	+
L. kefir 8335	"	85.5±0.5	0	0	-	66±1	+++	ND	-
L. kefir 8343	AGK4	82.0±1.0	0	0	-	71±1	++	ND	-
L. kefir 8344	"	85.0±0.0	0	0	-	71±1	+++	5.3±0.4	+
L. kefir 8345	"	89.5±2.5	58.5±5.4	16.8±2.5	+	66±1	+++	0.1±0.0	+
L. kefir 8347	"	83.0±2.0	29.0±1.0	5.4±1.2	+	66±1	++	2.0±0.4	-
L. kefir 8348	"	83.0±1.0	40.0±5.0	23.1±9.8	+	66±1	+++	4.5±1.3	+
L. kefir JCM5818	-	80.0±5.0	0	0	-	69±1	ND	ND	ND

H% = Hidrofobicidad porcentual determinado por partición en hexadecano (PÉREZ et al., 1998).

AC<sub>t</sub> = Coeficiente de autoagregación.  $AC_t = [1 - (OD_t / OD_i)] \times 100$  (GOLOWCZYC et al., 2007).

CC<sub>t</sub> = Coeficiente de congregación de *L. kefir* con *Salmonella* sp.  $CC_t = [1 - (OD_t / OD_i)] \times 100 - AC_t$  donde OD<sub>i</sub> = densidad óptica de la suspensión bacteriana a 550 nm a tiempo = 0 min y OD<sub>t</sub> = densidad óptica a tiempo = 60 min.

H<sub>t</sub> = Capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos (GARROTE et al. 2004).

% Adhesión = Porcentaje de adhesión a células Caco-2/TC-7 calculado como: (lactobacilos adheridos / lactobacilos adicionados a la fosa) × 100 (GOLOWCZYC, et al., 2008).

Inhibición de *E. coli* determinada mediante método de difusión en agar (GARROTE et al., 2000; GOLOWCZYC et al., 2008).

**Tabla 2.** Propiedades probióticas de lactobacilos homofermentativos de la colección CIDCA

Cepa CIDCA	Gránulo de kefir	H%	H <sub>t</sub>	R. bilis	% R pH ácido	% Adh	Inhibición de patógenos	Inhibición CCL20
L. plantarum 8312	AGK1	2.0±0.3	-	+	56.3±5.2	1.0±0.0	S.typh / S.gall	ND
L. plantarum 8313	"	0.3±0.1	-	++	61.4±1.2	1.2±0.4	S.typh / E.coli	+
L. plantarum 83114	"	3.5±0.7	-	+++	53.5±1.3	3.5±0.6	S.typh/ S.ent/ E.coli	+
L. plantarum 8323	AGK2	1.0±0.3	-	++	41.1±2.5	1.4±0.7	S.typh/S.ent/ S.son/E.coli	+
L. plantarum 8324	"	ND	-	+++	ND	ND	ND	ND
L. plantarum 8327	"	3.3±0.5	-	++	42.8±2.1	1.8±0.5	S.typh/S.ent/ S.gall/ S.son/ E.coli	+
L. plantarum 8329	"	ND	-	+++	ND	ND	ND	ND
L. plantarum 83210	"	0.4±0.1	-	+++	67.4±2.3	1.3±0.2	S.typh/ S.gall E.coli	+
L. plantarum 8331	AGK3	4.1±0.3	-	+	67.4±1.2	1.3±0.2	S.typh/S.ent/ S.gall/ E.coli	+
L. plantarum 8334	"	2.3±0.5	-	+	42.3±0.8	2.7±0.1	S.typh/S.ent/ S.gall/S.son/ E.coli	+
L. plantarum 8336	"	2.5±0.2	+	+++	51.0±1.8	2.7±0.3	S.typh/ S.ent/ E.coli	+
L. plantarum 8337	"	5.8±0.9	+	++	55.5±2.2	10.5±0.1	S.typh/ E.coli	+
L. plantarum 8338	"	2.3±0.4	-	++	65.2±1.0	1.5±0.2	S.typh/ S.ent/ E.coli	+

H% = Hidrofobicidad porcentual determinado por partición en hexadecano (GOLOWCZYC, et al., 2008). H<sub>t</sub> = Capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos (GARROTE et al., 2004). R bilis = Resistencia al 1% de bilis de buey en el medio de cultivo. Método ecométrico (KOCIUBINSKI et al., 1999). % R pH = Porcentaje de Resistencia a pH 2,5 durante 3 horas de incubación (GOLOWCZYC, et al., 2008). % Adh = Porcentaje de adhesión a células Caco-2/TC-7 calculado como: (lactobacilos adheridos / lactobacilos adicionados a la fosa) × 100 (GOLOWCZYC, et al., 2008). Inhibición de enteropatógenos determinada mediante método de difusión en agar (GOLOWCZYC, et al 2008). Inhibición de la expresión de la quimoquina CCL20 en células CACO-luc estimuladas con flagelina (ROMANIN, 2007). ND= No determinado.

**Tabla 3.** Propiedades probióticas de levaduras pertenecientes a la colección CIDCA

Cepa CIDCA	Gránulo de kefir	R. bilis	% R pH ácido	Inhibición de patógenos	Inhibición CCL20
<i>S.cerevisiae</i> 8111	AGK1	+++	89.47	-	-
<i>S.cerevisiae</i> 8112	"	++	60.27	-	+
<i>K marxianus</i> 8113	"	+++	41.18	-	-
<i>K marxianus</i> 8116	"	+++	44.91	<i>E.coli</i>	+
<i>K marxianus</i> 8118	"	++	67.93	-	+
<i>S. unisporus</i> 8152	AGK5	+++	45.83	<i>B.cereus</i>	-
<i>K marxianus</i> 8153	"	++	13.83	-	+
<i>K marxianus</i> 8154	"	+++	60.63	<i>B.cereus</i> / <i>E.coli</i> / <i>S.ent</i> / <i>Staph</i>	+
<i>S.cerevisiae</i> 8175	AGK7	+++	99.00	<i>B.cereus</i>	-
<i>S.cerevisiae</i> 81102	AGK10	++	35.08	-	-
<i>S.cerevisiae</i> 81103	"	+++	93.33	<i>B.cereus</i> / <i>E.coli</i>	+
<i>K marxianus</i> 81104	"	+++	47.62	<i>B.cereus</i> / <i>E.coli</i> / <i>Staph</i>	+
<i>K marxianus</i> 81105	"	++	45.45	-	+
<i>S.cerevisiae</i> 81106	"	+++	99.00	-	-
<i>S unisporus</i> 81107	"	+++	86.67	-	-
<i>S.cerevisiae</i> 81108	"	+	99.00	-	+
<i>K marxianus</i> 81111	"	+++	66.47	-	+
<i>Issatchenkia</i> 9111	SK1	+++	45.00	<i>B.cereus</i> / <i>S. enter</i>	ND
<i>K marxianus</i> 9121	SK2	ND	17.33	-	+
<i>S. cerevisiae</i> 9123	"	+++	45.45	<i>B.cereus</i>	+
<i>S.cerevisiae</i> 9124	"	ND	18.00	-	+
<i>Issatchenkia</i> 9125	"	+++	91.84	-	+
<i>S. cerevisiae</i> 9127	"	+++	99.00	-	+
<i>S. cerevisiae</i> 9128	"	+	81.13	-	+
<i>Issatchenkia</i> 91210	"	+	85.04	-	ND
<i>Issatchenkia</i> 9131	SK3	+	99.00	-	-
<i>S unisporus</i> 9132	"	+++	76.67	-	+
<i>S unisporus</i> 9133	"	+++	99.00	-	+
<i>S unisporus</i> 9136	"	+	99.00	-	+
<i>S.boulardii</i>	--	+++	53.33	-	+

R bilis = Resistencia al 1% de bilis de buey en el medio de cultivo. Método ecométrico (KOCIUBINSKI et al., 1999).

% R pH = Porcentaje de Resistencia a pH 2,5 durante 3 horas de incubación (GOLOWCZYC et al., 2008). Inhibición de enteropatógenos determinada mediante método de difusión en agar (GARROTE, et al., 2000). Inhibición de la expresión de la quimoquina CCL20 en células caco-luc estimuladas con flagelina (ROMANIN, D., 2007).

Cepas sombreadas en gris (*L. kefir* 8348; *L. plantarum* 83114 y *S. cerevisiae* 8112): cepas que por sus propiedades probióticas fueron escogidas como candidatas a ser utilizadas en cultivos mixtos.

## DESHIDRATACIÓN DE FERMENTOS MIXTOS

La liofilización de las cepas *L. kefir* CIDCA 8348, *L. plantarum* CIDCA 83114 y *S. cerevisiae* CIDCA 8112 ha sido llevada a cabo en presencia de diferentes crioprotectores (leche, leche + sacarosa y leche + trehalosa), resultando la leche el crioprotector más apropiado. En estas condiciones se observó una disminución de bacterias viables en 2 a 3 logaritmos después de 6 meses de almacenamiento (GOLOWCZYC, 2008).

Por su parte, la deshidratación por secado *spray* de estas tres cepas puede realizarse sin pérdidas importantes de viabilidad a temperaturas inferiores a 80 °C de los tres microorganismos, *L. plantarum* es el más resistente (GOLOWCZYC, 2008).

## UTILIZACIÓN DE GOS COMO TERMOPROTECTORES

En estudios previos ha sido evaluada la preservación de una cepa especialmente sensible a los procesos de deshidratación (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA 333). Ha sido estudiado el efecto protector de trehalosa y sacarosa sobre su recuperación y sobre la capacidad para proteger la integridad de la membrana (TYMCZYSZYN et al., 2007 a, b y 2008). Si bien la utilización de trehalosa y sacarosa durante la deshidratación no evita el daño en la membrana, dichos azúcares actúan como protectores a otros niveles permitiendo que la bacteria deshidratada sea capaz de reparar los daños y volver a crecer (TYMCZYSZYN et al., 2007 a, b y 2008).

La efectividad de trehalosa y sacarosa como termoprotectores en el secado se incrementa cuando las células son crecidas bajo estrés osmótico (en medio de cultivo suplementado con azúcares). Esta combinación de estrategias permite obtener un mayor rendimiento en la conservación de *L. bulgaricus* cuando se utilizan métodos que involucran deshidratación por calor. A pesar de ello, la recuperación de *L. bulgaricus* luego de la deshidratación es de 3 logaritmos por debajo de la concentración bacteriana inicial en las condiciones más favorables (TYMCZYSZYN et al., 2007 a, b y 2008).

Por esta razón, el hallazgo de nuevos termoprotectores representa siempre un nuevo desafío. Resultados recientes obtenidos en trabajos conjuntos realizados por los grupos chileno y argentino indican que los GOS son capaces de actuar como termoprotectores de *L. bulgaricus*, permitiendo una recuperación bacteriana de 0,5-1 logaritmo por debajo de

la concentración bacteriana inicial. El efecto protector de los GOS ha sido observado en concentraciones mayores de 10% p/p, obteniéndose una capacidad protectora máxima a partir de concentraciones de 50% p/p. La presencia de GOS durante el proceso de deshidratación no sólo ejerce un rol protector sino que también incrementa la concentración de sólidos necesarios cuando se pretende secar en *spray* a nivel industrial. Es importante destacar que el efecto protector de GOS sobre *L. bulgaricus* ha sido observado no solamente cuando los cultivos bacterianos son tratados con soluciones de GOS, sino también cuando éstos son tratados con GOS en estado sólido en una proporción aproximada 1:2 masa bacteriana/masa GOS. Estos resultados tienen relevancia porque sustentarían la utilización de GOS como protectores en el secado en lecho fluidizado (método alternativo de preservación en el que se requiere que el producto esté en estado sólido) (DENNIS, 2003).

Los resultados presentados son sumamente alentadores teniendo en cuenta que debido a que los GOS son obtenidos a partir de permeado de suero, su utilización es económicamente más redituable que el empleo de azúcares como trehalosa. La selección de estrategias para la preservación de *starters* por secado continúa siendo un gran desafío y ésta será posible en la medida que se conozcan las propiedades de los protectores a utilizar y del sistema biológico a deshidratar. Así, la implementación de GOS como termoprotectores necesita un minucioso análisis estructural y termodinámico de los mismos, con el fin de conocer los mecanismos involucrados en su efecto protector, lo cual contribuirá a optimizar sus condiciones de uso a nivel industrial.

Finalmente, la utilización de GOS como termoprotectores constituye un novedoso aporte en el campo de aplicaciones de estos compuestos. Su permanencia en el producto probiótico podría generar un efecto sinérgico sobre la acción aquel (LAMOUREUX et al., 2002).

#### CAPACIDAD SECUESTRANTE DE AFLATOXINAS POR PARTE DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE KEFIR

Ensayos desarrollados por el grupo colombiano han demostrado que los microorganismos aislados del kefir de la colección CIDCA poseen capacidad de secuestrar aflatoxina B1, siendo las cepas *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818, las que presentaron una mayor eficacia (entre el

70 y el 90% de captura de la concentración inicial de aflatoxina). Entre los *L. plantarum*, las cepas CIDCA 83114, 8329, 83116, 8346 y 83210 demostraron la mayor capacidad secuestrante, siendo máxima para *L. plantarum* CIDCA 83114 (55 %). Entre las levaduras, aquellas cuya hidrofobicidad en presencia de hexadecano es superior al 20%, son las que han presentado capacidad de secuestrar aflatoxinas (~45%). La capacidad secuestrante de aflatoxinas puede deberse a la presencia de superficies hidrofóbicas en los microorganismos estudiados, lo cual favorece la captura de las moléculas de aflatoxinas.

Ha sido publicado que la actividad proteolítica de ciertas bacterias lácticas es utilizada como un parámetro funcional de evaluación de la eficacia de los procesos de preservación (TYMCZYSZYN et al., 2007a). De la misma manera, la capacidad de microorganismos de kefir previamente sometidos a deshidratación para secuestrar aflatoxinas una vez rehidratados, será considerada como un parámetro funcional en la evaluación de la eficiencia de GOS como protectores.

#### **BENEFICIOS DERIVADOS DEL DESARROLLO DE ESTE PRODUCTO EN LA POBLACIÓN LATINOAMERICANA**

El desarrollo de nuevos recursos alimentarios debería atender a las necesidades actuales sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras. Por esta razón, es necesario desarrollar y aplicar estrategias orientadas al manejo responsable de los efluentes de la industria alimentaria tanto a nivel regional latinoamericano como local (en cada país).

Teniendo en cuenta que el suero contiene en su composición proteínas de elevado valor biológico y que los microorganismos aislados de kefir poseen propiedades altamente inhibitorias de patógenos (GARROTE et al., 2000), un producto elaborado a partir de suero de la industria quesera fermentado con estos microorganismos cumple con un doble objetivo: por un lado se contribuye al aprovechamiento de efluentes industriales de una manera inocua para la salud humana y animal y el medio ambiente. Por otro lado, contribuye de manera eficiente a la prevención de deficiencias nutricionales, diarreas y enfermedades asociadas a la acumulación de micotoxinas en humanos (cáncer de hígado y riñón), así como a evitar problemas de producción y reproducción en granja de animales que consuman alimentos contaminados con hongos y aflatoxinas.

Las características de este producto lo convierten en un desarrollo relevante por el avance que implica tanto en el tratamiento de efluentes como en la elaboración de nuevos probióticos. Por esta razón, es fácil prever que tendrá un impacto directo en la inclusión de comunidades marginadas y en el desarrollo económico del Mercosur y Latinoamérica.

## IMPACTO SOBRE EL SECTOR SOCIO-ECONÓMICO Y/O SECTOR PRODUCTIVO

### *A) Valorización de un efluente*

Debido a la gran disponibilidad de excedentes de lactosuero proveniente de diferentes industrias queseras de la región, se pretende aprovechar este efluente altamente contaminante. Entre los resultados esperados puede mencionarse:

- a) Contribución al aprovechamiento de efluentes industriales de manera inocua para la salud humana y animal. Se transformará un producto que muchas veces es un desecho industrial, en un producto probiótico de alto valor agregado. Esto representa un impacto ambiental positivo porque la utilización del lactosuero contribuirá a reducir la magnitud del efluente industrial y su carga contaminante.
- b) El producto obtenido tendrá un elevado valor nutricional y probiótico e inclusive podrá ser utilizado para alimentación animal.
- c) Por tratarse de un producto deshidratado, será posible un almacenamiento a temperatura ambiente, un aumento de la vida útil y una mayor facilidad para su transporte. Así, las poblaciones campesinas e indígenas, generalmente impedidas para el uso de estos productos, se verán especialmente beneficiadas.
- d) La comercialización de un producto obtenido a partir de la fermentación de un efluente constituye un impacto positivo en Latinoamérica por diferentes razones: **I)** los réditos económicos derivados de su comercialización y del ahorro de dinero debido a la prevención de diarreas producidas por los enteropatógenos que el producto es capaz de inhibir; **II)** la utilización de efluentes constituirá una ganancia adicional porque se transformará un efluente industrial subutilizado en un producto de alto valor agregado; **III)** la administración de suero fermentado a animales permitirá el engorde

mediante la administración de un producto nutritivo y probiótico que evita los trastornos en producción debidos a la ingesta de aflatoxinas, que regulariza la función intestinal y previene diarreas, disminuyendo o eliminando así la administración de antibióticos, cuyo uso se tiende a minimizar o eliminar.

### *B) Beneficios para la salud humana*

Las propiedades probióticas de las cepas utilizadas redundarán en un impacto positivo para el desarrollo social de Latinoamérica. Este impacto estará dado fundamentalmente por: I) la prevención de diarreas producidas por enteropatógenos; II) evitar la acumulación de metabolitos cancerígenos; III) su capacidad de tratar carencias nutricionales; IV) tratarse de un producto con cantidades mínimas de lípidos, lo cual permitiría su utilización como alimento reducido en calorías; V) su potencial interés comercial.

### *C) Aspectos sociales: Inclusión de sectores urbanos y rurales carenciados económicamente*

- Teniendo en cuenta que se trata de un producto deshidratado, su transporte y almacenamiento se verá facilitado. Este hecho hará que el producto sea más accesible para las comunidades rurales e indígenas, aisladas geográficamente y que carecen de servicios básicos como la energía y portanto la refrigeración.
- Es importante destacar que estas comunidades es la mujer quien lidera generalmente la incorporación de nuevos productos a la alimentación familiar y al cuidado de los animales. Es ella la encargada del cuidado de la familia, la huerta y los animales de cría mientras el hombre sale a vender su mano de obra en la construcción, plantaciones y fincas ganaderas.
- Imposible olvidar la realidad del desplazamiento forzado de los campos por la violencia y guerras internas. Grupos indígenas y campesinos en Colombia han tenido que migrar a las grandes ciudades. En los barrios de periferia, implantan en pequeños lotes o hasta en macetas, los animales de cría y cultivos que poseían en su lugar de origen para el alimento de su familia. En este contexto, la mujer es la “encargada de la alimentación” y consecuentemente, un



agente innovador y multiplicador que introduce nuevos productos de manera creativa en la dieta familiar, lo difunde entre los amigos, familiares y vecinos divulgando las ventajas (comprobadas previamente por observación directa) sobre la salud.

Los grupos argentino et alombiano están ejecutando desde hace cinco años un proyecto de extensión que tiene como objetivo la distribución de gránulos de kefir en comedores y centros comunitarios. En este ámbito es importante difundir (a través de la mujer) la incorporación de este probiótico deshidratado con el objetivo de prevenir y/o tratar infecciones causadas por patógenos intestinales, que atacan con mayor facilidad a sectores sin agua potable y cloacas.

La incorporación de este probiótico en sectores desfavorecidos constituye un avance en la elaboración de productos probióticos para la prevención de la colonización y/o infección por patógenos intestinales de importancia en el Mercosur y Latinoamérica.

## PERSPECTIVAS

La diarrea es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuente tanto en animales de cría como en humanos. *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *E. coli* enteropatógenas, son las bacterias más frecuentemente asociadas con esta patología. Los probióticos han sido utilizados con frecuencia para prevenir y tratar diarreas, existiendo en el mercado comercial productos para consumo humano y animal.

La mayoría de los probióticos comerciales emplean sólo una única especie microbiana, lo cuál representa una gran desventaja ya que, como indica la bibliografía, limita la capacidad probiótica. El empleo del kefir como probiótico está ampliamente difundido en la literatura tanto científica como de divulgación (GARROTE et al., 1997, 1998, 2000, 2001, 2002, 2004). El kefir es probablemente el único ejemplo descrito de acción probiótica conjunta de varios microorganismos, incluyendo bacterias lácticas y levaduras, que forman parte de una compleja asociación simbiótica que da lugar al gránulo de kefir. Sin embargo, la complejidad microbiana de los gránulos dificulta el mantenimiento de una calidad constante a la hora de elaborar un producto comercial. Por este motivo la utilización de mezclas adecuadas de microorganismos aislados kefir representa una solución interesante a nivel comercial.

Así, la utilización de lactosuero como materia prima y de una mezcla de microorganismos de kefir como *starter* reducirá significativamente el costo del producto a elaborar.

Por su parte, la adición de GOS en el producto previamente a la deshidratación tendrá un efecto altamente positivo debido a que: a) los GOS contribuirán a incrementar los sólidos presentes en el lactosuero, lo cual favorecerá el secado del producto; b) los GOS actuarán como termoprotectores; c) teniendo en cuenta que los GOS son obtenidos a partir de permeado de suero, se estará valorizando otro efluente de la industria láctea; d) la presencia de GOS en el producto final puede generar un efecto simbiótico con las bacterias probióticas. La capacidad protectora de los GOS resulta especialmente trascendente a escala comercial porque el azúcar adicionado además de actuar como protector, es una fuente de fibra alimentaria, tiene acción prebiótica y propiedades edulcorantes con bajo aporte calórico.

De esta manera, la utilización de GOS resulta un sustituto económico y eficaz de los protectores actualmente utilizados, poseyendo importantes beneficios adicionales.

## BIBLIOGRAFÍA

BABY, A. R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; Zague, V.; Pinto, C. A. S. O.; Salgado, H. R. N.; Kaneko, T. M.; Velasco, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, no 3, p. 405-412, 2007.

BANVOLGYI, S.; KISS, I.; BEKASSY-MOLNAR, E.; VATAI, G. Concentration of red wine by nanofiltration. *Desalination*, v.198, p. 8-15, 2006.

CEPA – Centro de Socioeconomia e planejamento agrícola. *Custo de produção – mel*. Disponível em <[http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/custos/custo08/ago08/Mel\\_implantacao.xls](http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/custos/custo08/ago08/Mel_implantacao.xls)>. Acesso em 12 ago. 2009.

CVEK, J.; MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIC, S.; VITALI, D. MORNAR, A.; VEDRINA-DRAGOJEVIC, I.; TOMIC, S. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of croatian propolis tinctures. *Phytochemical Analysis*, v. 18, p. 451-459, 2007.

- CVEK, J.; MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; ZUBCIC, S.; VITALI, D. MORNAR, FAOSTAT. *FAO Statistical Database*, Natural Honey, 2009. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>. Acesso em 18/06/2009.
- GEENS, J.; BOUSSU, K.; VANDECASTEELE, C.; VAN DER BRUGGEN, B. Modelling of solute transport in non-aqueous nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, v. 281, p. 139-148, 2006.
- GRUPO COLMÉIAS. *Estimativas de faturamento*. Disponível em [http://www.colmeias.org.br/arquivos/artigos/artigos\\_arquivos/altaprodutiviade.rtf](http://www.colmeias.org.br/arquivos/artigos/artigos_arquivos/altaprodutiviade.rtf). Acesso em 12/08/2009.
- HABERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. *Processos de Separação por Membranas*. Ed. e-papers, Rio de Janeiro, 180p., 2006.
- HOSSAIN, M. M. Concentration of anthocyanin pigments in blackcurrant pomace by ultrafiltration. *Food Australia*, v. 55, p. 263-266, 2003.
- KONISHI, S.; SAWAYA, A.; CUSTÓDIO, A. R.; CUNHA, I.; SHIMIZU M. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. *Mensagem Doce*, v. 75, p. 22-25, 2004.
- KRELL, R. *Value-added products from beekeeping*. FAO agricultural services bulletin no. 124, 1996. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.HTM>>. Acesso em 29 jan. 2008.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAK, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, v. 84, p. 329 – 339, 2004.
- LIMA, C.A.; OLIVEIRA, J.; PEDREIRA, A.J.L.A.; CASTIGLIONI, S.A.C. Estudo da viabilidade financeira da implantação de um apiário para a produção de própolis e mel. *XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural*, 2006. Disponível em <<http://www.sober.org.br/palestra/5/869.pdf>>. Acesso em 24 ago. 2009.
- MAROULIS, Z.B.; SARAVACOS, G.D. *Food Process Design*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003. Cap. 10.
- MATTA, V.M.; MORETTI, R.H.; CABRAL, L.M.C. Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p. 477-482, 2004.

MELLO, B.C.B.S. *Concentração de extratos de própolis através de membranas poliméricas*. 2008. 110p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MIRANDA, K. F. *Estudo da concentração de licopeno por ultrafiltração a partir de suco de melancia (Citrullus vulgaris Schard)*. 2005. 149 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MOURA, F. F. *Contribuição das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Própolis Produzida por Apis mellifera na Região Nordeste do Brasil*. 2000. 69 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Noticias Apícolas. *La Cooperativa Apícola de Goya crece y exporta*. Disponível em: <<http://www.noticiasapicolas.com/goya.htm>>. Acesso em 05 ago. 2009.

PARK, Y. P.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. D. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, p. 313-318, 1998.

PEREZ, L.H.; RESENDE, J.V.; FREITAS, B.B. Mel: exportações fazem produção aumentar de Norte a Sul. *IEA-Instituto de economia agrícola*. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2078>>. Acesso em 05 ago. 2009.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, v. 18, no. 12, p.1995-2018, 1998.

PETRUS, J. C. C. *Preparação, Modificação e Caracterização de Membranas Assimétricas para Clarificação de Suco de Frutas*. 1997. 139 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PILIPOVIK, M. V.; RIVEROL, C. Assessing dealcoholization systems based on reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p.437-441, 2005.

TSUI, E. M.; CHERYAN, M. Membrane processing of xanthophylls in ethanol extracts of corn. *Journal of Food Engineering*, v. 83, p. 590-595, 2007.

USHIKUBO, F.Y.; WATANABE, A.P.; VIOTTO, L.A. Effects of operating conditions and enzyme treatment on fouling and polarized layer formation during umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice microfiltration. *Desalination*, v.200, p. 546-548, 2006.

VINCZE I.; STEFANOVITS-BÁNYAIB E.; VATAI G. Using nanofiltration and reverse osmosis for the concentration of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) juice. *Desalination*, v. 200, p. 528-530, 2006.

## CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA

---

### Menção Honrosa

#### **BALINUFIBRA – Una nueva alternativa de aprovechamiento del banano en la Agroindustria**

***Autoras:***

Wilma Pamela Villamayor Gallardo, 15 anos, e Celeste Maria Giselle Cáceres Espínola, 15 anos, alunas do 1º Bachillerato Científico do Colegio Nacional EMD Asunción Escalada

***Professora-orientadora:***

Carmen María Jiménez de Céspedes, 45 anos

***País:*** Paraguai

# BALINUFIBRA – UNA NUEVA ALTERNATIVA DE APROVECHAMIENTO DEL BANANO EN LA AGROINDUSTRIA

## RESUMEN

El objetivo principal de este proyecto es lograr el máximo aprovechamiento de la planta del banano, a partir de sus principales componentes para favorecer a la agroindustria, el almidón extraído de la banana verde ser aplicado en alimentos y bebidas como remineralizante y para aumentar el consumo de fibras para el consumo humano, al mismo tiempo demostrar la presencia de la inulina en el fruto maduro para la elaboración de sub productos utilizados como prebióticos; y además aprovechar la fibra del seudo tallo de la bananera para la obtención de celulosa aplicables a la fabricación de papel.

Con esta experiencia se demuestra la posibilidad de explotar este bioelemento en la zona de Guayaybi del departamento de San Pedro considerado el mayor productor de banana en el país y en todos los países del Mercosur; al mismo tiempo la reutilización de los desechos orgánicos y la creación de fuente de ingreso adicional para los productores de banano que hasta la fecha solo se dedica a comercializar los frutos, ignorando totalmente las otras aplicaciones que podrían en gran medida favorecer a la agroindustria.

Nuestro país único entre tantos privilegiados con la posibilidad de producir materia prima agrícola, teniendo en cuenta que actualmente, se puede encontrar en cualquier época del año todos tipos de productos. También podemos destacar que la producción de la planta de la bananera no requiere un cuidado especial pues su crecimiento no demanda muchas atenciones.

## INTRODUCCIÓN

Del banano se pueden extraer varios componentes como la inulina de la banana madura, el almidón del banano verde y la celulosa de las fibras de su tallo, estos tres derivados pueden ser muy útiles para la agroindustria.

La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en más de 36.000 especies de plantas. En la actualidad, la presencia de ciertas cantidades de inulina o sus derivados en la formulación de un producto alimenticio es condición suficiente para que dicho producto pueda ser considerado como alimento funcional.

La banana verde puede ayudar a prevenir la diabetes tipo 2 se ha demostrado que la pulpa de la fruta cocida con cáscara y el almidón aislado de la banana son capaces de reducir la liberación de insulina por parte del páncreas.

En cuanto a la celulosa esta es una fibra vegetal que conforma las paredes de las plantas y que representa el 50% de su constitución física. La estructura de la celulosa está formada por uniones de las moléculas de glucosa adheridos a la lignina, sustancia que refuerza las células, confiriéndoles resistencia.

Uno de los problemas que se presentan con frecuencia en la actualidad es, que hacer con los desechos orgánicos que abundan en nuestro medio. Guayaybi es una zona del departamento de San Pedro, considerado como el mayor productor de banana del país, produce 16.616 toneladas de banana por año y esto genera aproximadamente 20.000 toneladas de desechos orgánicos (seudotallo y raquis) anuales en el departamento. Los productores sólo se dedican a la producción y venta de los frutos ignorando las diferentes aplicaciones que se les puede dar al seudotallo y raquis.

Nuestro país único entre tantos privilegiados con la posibilidad de producir materia prima agrícola, teniendo en cuenta que actualmente, se puede encontrar en cualquier época del año todos tipos de productos. También podemos destacar que la producción de la planta de la bananera no requiere un cuidado especial pues su crecimiento no demanda muchas atenciones.

Este trabajo nos permite valorar la importancia de la planta del banano debido a los múltiples usos que se le puede dar en la agroindustria a través de la extracción de sus componentes inulina de la banana madura, el almidón de la banana verde y la celulosa de la fibra del tallo, y así también



ayudar al medio ambiente aprovechando al máximo esta planta y los beneficios que podemos obtener de ella.

Encontrar el camino de la armonía y equilibrio de la naturaleza es el desafío del hombre de hoy.

## FUNDAMENTACIÓN

El objetivo principal de este proyecto es lograr el máximo aprovechamiento de la planta del banano, a partir de sus principales componentes para favorecer a la agroindustria, el almidón extraído de la banana verde ser aplicado en alimentos y bebidas como remineralizante y para aumentar el consumo de fibras para el consumo humano, al mismo tiempo demostrar la presencia de la inulina en el fruto maduro para la elaboración de sub productos utilizados como prebióticos; y además aprovechar la fibra del seudo tallo de la bananera para la obtención de celulosa aplicables a la fabricación de papel.

El bananero es una planta de gran utilidad para el hombre. Sus frutos maduros, así como los verdes cocidos o fritos son comestibles; con ellos se obtiene una harina empleada en la cervecería para preparar la malta, y también puede aprovecharse en la fabricación de vinos y aguardientes. La inulina se utiliza ampliamente como ingrediente en alimentos funcionales., tal como se obtiene de las plantas que la contienen, puede ser directamente convertida en etanol, por medio de una sacarificación y fermentación microbiológica simultánea. Esta técnica es la base para la obtención de las bebidas alcohólicas mezcal y tequila, pero también posee un enorme potencial para convertir residuos de cosecha de alta inulina en etanol para ser utilizado como combustible. La inulina se está utilizando de manera creciente en el procesado de alimentos, debido a sus inusuales características nutricionales y, en especial, a sus propiedades como ingrediente alimentario. Por todo ello, en numerosos productos, en especial lácteos y helados, la inulina se usa para reemplazar a las grasas. En cuanto a los desechos sólidos del seudo tallo y raquis de la bananera, específicamente la fibra, es un bioelemento reciclable que se obtiene como subproducto de las actividades agrícolas, esta opción permitirá competir con los eucaliptos y pinos en la elaboración de celulosa y papel. Además ayudará a minimizar en parte los problemas económicos y ambientales que genera el propio desecho.

Cabe destacar que esta planta abunda en el territorio paraguayo y en los países del Mercosur y además su consumo es muy accesible debido a su bajo costo, de ahí nace la importancia de la realización de este proyecto ya que es necesario conocer todos los beneficios que se pueden obtener del banano puesto que además de beneficiar a la industria ayudaremos al medio ambiente evitando la deforestación de otras especies de flora considerando que el 95% de la producción de papel en el mundo viene de la madera y según referencias de las Naciones Unidas, en el 2010 esto va a quedar cinco veces mayor, lo que hace temer una acelerada explotación de la floresta con efectos devastadores para el ambiente y la humanidad.

## OBJETIVOS

### GENERALES:

- Demostrar la presencia de inulina en la banana madura.
- Demostrar que el seudo tallo y raquis de la bananera puede ser utilizado para la elaboración de celulosa y sus derivados.
- Comprobar la acción del almidón extraída de la banana verde en la reducción del PH en el intestino grueso de algunos animales.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollar técnicas que permitan extraer el almidón del banano verde.
- Comprobar si el almidón del banano verde reduce el PH del intestino grueso de algunos animales.
- Aplicar técnicas que permitan la obtención de inulina a partir de la banana madura.
- Aplicar la inulina obtenida en subproductos para la alimentación humana.
- Demostrar que el seudo tallo y raquis de la bananera se pueden obtener fibras y estas utilizado en la elaboración de diferentes productos.
- Crear fuente de ingreso adicional para los productos de banano.

## BREVE DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad se presentan varios problemas, uno de ellos es que hacer con los dos desechos orgánicos que abundan en nuestro medio. La zona de Guayaybi, departamento de San Pedro – Paraguay, es el mayor productor de banana en el país. Los productores solo se dedican a la producción y venta de los frutos ignorando totalmente las diferentes aplicaciones que le puede dar el seudo tallo, esto genera actualmente 20.000 toneladas de desechos orgánicos anuales en el departamento.

Otro problema que existe, es el aumento de los enfermos de diabetes, ya sea por herencia o por obesidad generada por la falta de actividad física y también de una alimentación balanceada.

A pesar de que la banana abunda en el Paraguay, no se han llevado a cabo procedimientos industriales para la extracción de inulina, que es un prebiótico natural, utilizado para sustituir el azúcar, en la vida de los diabéticos, ni tampoco el almidón presente en el banano verde, cuya capacidad de reducir la liberación de insulina del páncreas en el caso de diabetes mellitus ha sido comprobada.

## PLANTEO DEL PROBLEMA

¿Puede el seudo tallo y raquis de la bananera ser utilizado en la elaboración de celulosa y sus derivados como alternativa de aprovechamiento de los desechos orgánicos?

¿Puede el almidón extraído de la banana verde ser aplicado en alimentos y bebidas como remineralizante y para aumentar el consumo de fibras para el consumo humano?

¿La inulina es un componente de la banana madura?

## HIPÓTESIS

La fibra del seudo tallo de la bananera es un bioelemento suficiente en calidad y cantidad para su aprovechamiento en la elaboración de celulosa y sus derivados.

El almidón extraído de la pulpa del banano verde puede reducir el PH del intestino grueso y al ser mezclado a alimentos y bebidas para consumo humano aumentar el consumo de fibra.

La inulina presente en la banana madura se puede extraer por procesos permitidos y ser aplicado en los alimentos como prebióticos.

## VARIABLES

*Dependiente:* Obtención de celulosa y sus derivados, inulina y almidón.

*Independiente:* El seudo tallo y raquis, banana madura y verde.

*Interviniente:* Reactivos utilizados.

*Control:* Procedimientos laboratoriales.

## DISEÑO METODOLOGICO

La metodología utilizada para la elaboración del proyecto es el explorativo, práctico y experimental.

Es explorativo por que se investiga el tema a través de materiales escritos, imágenes, videos, páginas web y encuestas realizadas a los lugareños de la zona de San Pedro dedicada al rubro de la producción de la bananera.

Es práctico con aplicaciones de técnicas experimentales buscando obtener los mejores resultados.

Experimental, la metodología experimental se aplicó utilizando los reactivos y procedimientos descrito en este capítulo.

### Obtención de almidon de la banana verde

#### *Materiales*

- Cuchillo
- Banana verde
- Deshidratados de frutas
- Vaso de precipitado
- Filtro

#### *Procedimiento*

Se pela y se corta las bananas y se coloca en el deshidratador, luego se pisa hasta obtener polvo, se le agrega agua mineral, se mezcla muy bien y se filtra el filtrado se deja reposar y luego se separa el precipitado (almidón) del líquido por decantación

## Obtención de inulina de la banana madura

### *Materiales*

- Cuchillo
- Banana madura
- Deshidratados de frutas
- Vaso de precipitado
- Filtro

### *Procedimiento*

Se pela y se corta las bananas y se coloca en el deshidratador, luego se pisa hasta obtener polvo, se le agrega agua mineral, se mezcla muy bien y se filtra el filtrado se deja reposar y luego se separa el precipitado (fructosa) que contiene la inulina por decantación.

## Celulosa

### *Materiales*

- |                         |            |
|-------------------------|------------|
| • Tronco de la bananera | 3 kg       |
| • Hidróxido de sodio    | ½ al 10%   |
| • Agua                  | 5 l        |
| • Bastidor              | 2 unidades |
| • Cuba                  | 1 unidad   |

### *Procedimiento*

Se disuelve en el agua el hidróxido de sodio, se le agrega los trozos cortados del tronco de la bananera, se deja hervir por un periodo de tres horas. Cuando estén cocinadas y transformadas y pulpas se debe filtrar bajo agua corriente (para eliminar la soda cáustica). Luego se licua asta obtener una pasta sobre un bastidor. Se utilizan dos bastidores del mismo tamaño, uno de ellos con tela metálica. Se introducen uno encima del otro en la cuba y se los cubre con la pulpa y se los sube filtrando la pasta. Se saca del bastidor que sirvió para dar forma a la pasta y se invierte el otro sobre una tela, debajo de la cual al papeles de diario. Luego se deja secar en un lugar seco

## LOS SUB PRODUCTOS

### I. AGLOMERADOS

*Fibra de la bananera para aglomerado.*

*Materiales*

- Agua 5 l
- Tronco de la bananera 3 kg

*Procedimiento*

Se corta el tronco de la bananera en trozos, se tritura, se mezcla con el agua hasta obtener la fibra y luego se separa el agua de la fibra por filtración y finalmente se somete al secado solar sobre un bastidor.

### 2. ISILANTE TERMICO

*Materiales*

- Fibra de la bananera
- Fibra de vidrio

*Procedimiento*

Se mezcla la misma cantidad de ambas fibras asta obtener una consistencia homogénea y se coloca entre una prensa de madera o metal utilizando como base papel o tela que les sirva de absorbente asta eliminar la humedad y finalmente se termina secando al sol.

### 3. PAGODA

*Materiales*

- Fibra de la bananera
- Formol
- Hipoclorito de sodio
- Barniz

*Procedimiento*

La fibra de la bananera se mezcla con el formol y el hipoclorito de sodio hasta formar una mezcla homogénea. Esto se debe secar al sol, una vez bien seco, barnizarlo.

#### 4. CIELO RASO

##### *Materiales*

- Corteza de la bananera 1 kg
- Pulpa de papel 500 g
- Hidróxido de sodio 125 ml
- Halocream 50 g (liquido antinflama)
- Recipiente de acero inoxidable
- Bastidor

##### *Procedimiento*

La corteza de la bananera una vez picada y triturada, se la deja con el hidróxido de sodio por un periodo de 24 h. Pasado el tiempo establecido esta deberá ser sometida al fuego con la pulpa de papel.

Cuando el hidróxido evapora se retira del fuego el preparado, donde es colocado en un bastidor y déjase secar al sol.

Una vez seco se lo somete al halocream, y débese repetir la aplicación varias veces hasta estar seguros de que el antinflama penetre todo en la placa obtenida.

#### 5. PLASTICO REFORZADO EN FIBRA DE LA BANANERA

##### *Materiales*

- Fibra de la bananera 2 kg
- Resina 500 ml
- Catalizador 125 ml
- Molde de barro o aluminio
- Aceite
- Pegamento orgánico

##### *Procedimiento*

Preparar una plancha de la fibra, poner sobre una fórmica y dejar reposar durante 24 h de tal manera que la fibra quede húmeda. Poner al molde cera, aceite para poder desmoldar. Una vez puesta la cera alrededor del molde ir poniendo la plancha de la fibra húmeda formando una capa y dejar reposar durante 48 h.

Pasado este tiempo pasar una capa de pegamento orgánico, y de vuelta pasar una capa de la fibra de la bananera, dejando reposar otras 24 h. Una vez seco pasar la resina añadida con el catalizador, de esta manera se endurece la fibra.

## ANALISIS DE RESULTADOS

### RESISTENCIAS

#### I. PAGODA

##### *1.1. Resistencia a la tensión*

La muestra de la pagoda para el ensayo pesa 39,8 g, tiene un grosor de 0,5 cm y 150 cm<sup>2</sup> de superficie.

##### *Materiales utilizados:*

- Dinamómetro
- Garfio
- Pesas

El resultado de la prueba fue la siguiente:

La pagoda es puesta en una posición vertical donde es sostenida por el dinamómetro. En la parte inferior de la pagoda se ubica un garfio en donde será posible colocar pesas y de esta manera balancear su resistencia en esta posición en la cuales tolera un peso de 1.300 g.

##### *1.2. Resistencia a la presión*

##### *Materiales utilizados:*

- Barras de maderas (dos)
- Pesas

La pagoda es puesta en una posición horizontal donde es apoyada por dos barras de madera una en cada lado dejando libre el centro de dicho material.

La prueba de pesas fue de 3.000 g y la resistencia fue el 100% positiva en donde la muestra utilizada no llegó a quebrarse ya que toleró el peso.

##### *1.3. Permeabilidad*

##### *Materiales utilizado*

- Vaso con agua



Una pequeña muestra obtenida del seudo tallo de la bananera es sometida en un vaso con agua dejándola durante 5 minutos.

Pasados los 5 minutos, la muestra es totalmente maciza, no se destruye, ni altera su constitución, pero se observa que parte del líquido es absorbido por este.

## 2. AISLANTE TERMICO

### *Pruebas al calor*

El aislante térmico elaborado a partir de la fibra de la bananera asociado con la fibra de vidrio fue sometido al calor y se observó una transformación física.

### *Materiales*

- Termómetro
- Mechero de bunsen o de alcohol

Una vez puesto el aislante térmico encima de la llama a una cierta distancia (6 cm) y sobre el aislante térmico un termómetro, se observa que retiene la temperatura ya que esta se encuentra por debajo del aislante térmico a 60 °C y la que mide el termómetro es de 30 °C.

En el momento en que el aislante es sometido a esta prueba este se contrae y se puede afirmar que no transmite calor al tacto ya que se puede tocar.

Una vez que el aislante regresa a su temperatura inicial vuelve también a su estado inicial.

## 3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL TALLO

El tallo de la bananera es sometido a una prensa para separar la fibra y el líquido que esta posee.

En este caso se utilizaron 500 g del tallo de la bananera.

Una vez prensado se puede observar que el tallo queda reducido a 200 g de fibra y el resto agua.

Se puede decir a partir de esta experiencia que el seudo tallo de la bananera está compuesto por 60% de agua y 40% de fibra.

El líquido del seudo tallo presenta un carácter ácido con pH 4 en donde decolora el tornasol azul a un color rosado rojizo.

#### 4.1. VENTAJAS

- Una de las ventajas más importantes que presenta la elaboración de celulosa a partir del reciclado de desechos orgánicos transcurrido todo el tiempo de las pruebas, ensayos y experimentaciones (aproximadamente 6 meses) es que las muestras obtenidas no presentan hongos y no se descomponen estando al aire libre o entre papeles que se utilizan para la absorción de su humedad.
- De acuerdo al procedimiento utilizado las fibras pueden tomar diferentes dimensiones, esto posibilita la selección de acuerdo a la necesidad de uso y al tipo de bastidor seleccionado.
- Otra ventaja importante es que para obtener celulosa a partir de las fibras no se necesita utilizar aglutinante ya que esta contiene cierto porcentaje de almidón, lignina y azúcares.
- Para los aglomerados, cielo raso y plásticos reforzados se utilizan los de mayor dimensión; sin embargo los de menor dimensión y mayor flexibilidad son para elaborar papel.
- Para el cielo raso, una de las ventajas es su bajo peso, la resistencia, la posibilidad de adherirse fácilmente a la sustancia anti flama para completar su función y es de fácil obtención y aplicación.
- Para la obtención de la materia prima es muy corto el tiempo, comparado con otras fuentes de obtención (cada 10 meses se obtiene el seudo tallo y raquis de la bananera una vez terminado el periodo de fructificación).
- Obtener la fibra es de bajo costo ya que se reutilizan desechos orgánicos y los productos químicos son accesibles.
- Transformar en subproductos la fibra obtenida es de bajo costo y fácil obtención, teniendo en cuenta que estos se pueden obtener a partir de materiales reciclados.
- Comparativamente las fibras obtenidas del raquis y el seudo tallo difiere en relación a la cantidad obtenida y el peso de materia prima utilizada, así mismo como en la calidad de la fibra teniendo en cuenta que el raquis posee menos lignina y eso le confiere mayor elasticidad, lo que permite ser utilizada como base de papel lo obtenido del raquis.

## 4.2. DESVENTAJAS

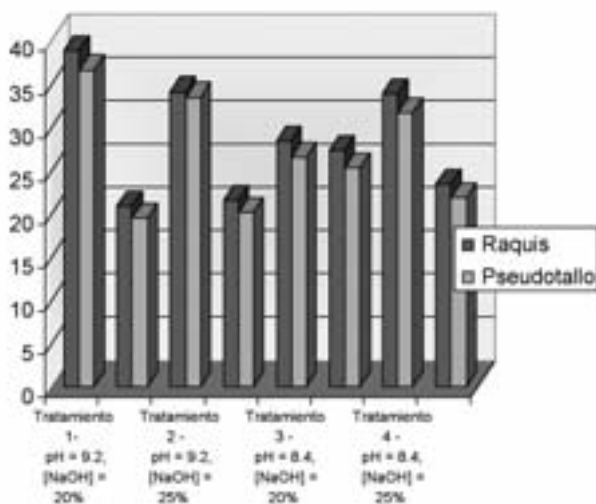
La desventaja que posee el seudo tallo para la obtención de la fibra, es la humedad que posee, del 60 al 70% y para conseguir un material firme, bien sólido y compacto lleva mucho tiempo su secado si no se cuenta con las máquinas apropiadas.

Por eso es importante utilizar la energía solar en su máximo potencial para llegar a óptimos resultados.

## 5. RENDIMIENTO DE FIBRA CRUDA Y DE CELULOSA DE LOS RESIDUOS AGRICOLAS DEL BANANO

Residuo agrícola	Tratamiento 1 pH = 9,2, [NaOH] = 20%		Tratamiento 2 pH = 9,2, [NaOH] = 25%		Tratamiento 3 pH = 8,4, [NaOH] = 20%		Tratamiento 4 pH = 8,4, [NaOH] = 25%	
	Fibra cruda (%)	Celulosa (%)	Fibra cruda (%)	Celulosa (%)	Fibra cruda (%)	Celulosa (%)	Fibra cruda (%)	Celulosa (%)
Raquis	38,7	20,9	34,0	21,5	28,3	27,2	33,8	23,4
S. tallo	36,5	19,5	33,4	20,1	26,4	25,2	31,6	21,8

**Rendimientos de Fibra cruda y de celulosa de los residuos agrícolas del banano**



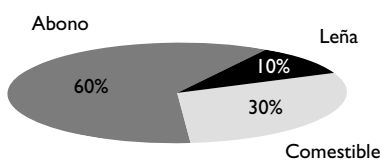
## ENCUESTA

Cien personas fueron encuestadas sobre la importancia de reciclar los desechos orgánicos.

La encuesta fue realizada en la zona de San Pedro específicamente en Guayaybi, zonas que se dedican a la plantación de banana y que arrojan los siguientes resultados.

Las preguntas realizadas fueron los siguientes:

1. *La planta de la bananera da fruto cada diez meses, pasada la época de fructificación es desechada.*



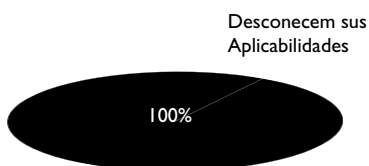
¿Usted como utiliza el seudo tallo de la bananera?

- El 60 % de las personas utilizan como abono una vez pasada la época de fructificación.

- El 30 % utilizan como comestibles para animales de granjas ya sean gallinas, patos, codorniz, otros.

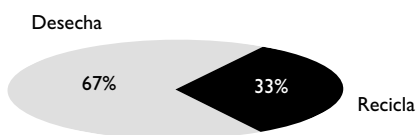
- El 10 % utilizan como leña, pero esperan tres meses para que se sequen ya que poseen mucha agua el seudo tallo.

2. *¿Cree usted que es posible reutilizar el desecho orgánico para la obtención de fibra?*



- El 100% de las personas encuestadas afirmaron que desconocen las diversas aplicaciones que se podrían dar a la fibra del seudo tallo de la bananera.

3. *Si no utiliza el seudo tallo para lo citado anteriormente. ¿Qué hace de tal elemento?*



- El 67% de las personas encuestadas respondieron que desechan tal material.

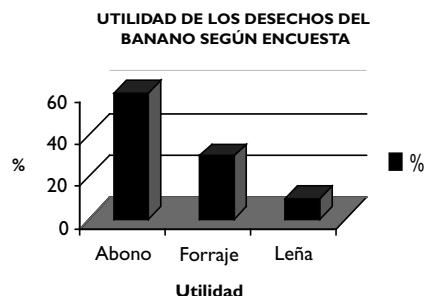
- El 33% respondieron que la reciclan utilizándolo como abono porque pasando un tiempo razonable (dos meses aproximadamente) el seudo tallo empieza a descomponerse y esto genera gusanos para lo cual beneficia para la utilización de abono.

4. ¿Usted da importancia a los desechos orgánicos para la obtención de elementos a partir del reciclado, en este caso el seudo tallo de la bananera?.

- El 83 % de las personas encuestadas respondieron que es importante utilizar el desecho orgánico como reciclado, pero algunos desconocen como hacerlo.
- El 17 % no lo consideran importante.

## ANÁLISIS DE LA ENCUESTA

A partir de encuestas a los lugareños, podemos afirmar, que la mayoría de ellos, más bien utiliza el seudo tallo desechado como abono una vez degradado el tallo, como forraje para animales y un bajo porcentaje como leña una vez deshidratado bajo el sol .



## ESTUDIO DE FACTIBILIDAD Y COSTOS

### *Pertinencia*

A nivel nacional el programa del Ministerio del Ambiente de nuestro país incluye en su ámbito de trabajo el mejor aprovechamiento de los residuos agroindustriales con miras a la disminución de la contaminación ambiental. Desde esa perspectiva este proyecto ofrece una alternativa productiva para la eliminación de ellos y así disminuir la contaminación ambiental.

La aplicación del proyecto, implica hacer una alianza con el sector productivo del campo a través de las cooperativas asociadas del distrito de Guayaybi, quienes pretenden cumplir con esta nueva etapa que es la de ejecución del mismo en este departamento.

Nuestra expectativa para llevar adelante la aplicación y ejecución, se centra en la esperanza del apoyo financiero de alguna ONG o entidad interesada en “*generar desarrollo en armonía con la naturaleza*”.

## ECOLOGÍA, CONTAMINACIÓN AMBIENTAL Y CUMPLIMIENTO DE LAS NORMAS

- La elaboración de las fibras y celulosas no generan residuos que puedan perjudicar al *medio ambiente* por el método utilizado.

- La producción de esta fibra producirá un nivel de *ruido* que se encuentra dentro de los rangos normales para el personal y el vecindario.
- Esta actividad no genera *olores* perjudiciales a terceros, además la propiedad se acondicionará para ello.
- La organización contará con todos los elementos exigidos por las *normas legales* y reglamentaciones vigentes en materia de preservación del medio ambiente y seguridad.
- Las fibras naturales obtenidas del seudo tallo y del raquis tienen muchas ventajas tales como baja densidad, alta fuerza específica, la capacidad de la modificación de la superficie de la fibra y son muchas más baratas que las fibras sintéticas.
- La tecnología que se pretende adaptar permitirá mejores ingresos al sector productivo y disminución de la contaminación ambiental, o sea una mejor calidad de vida de los productores y lugareños.

#### LOS EQUIPOS NECESARIOS A NIVEL INDUSTRIAL PARA LA PRODUCCION DE CELULOSA A PARTIR DEL SEUDO TALLO Y RAQUIS

- 1 pulper con 4 piletas de pasta
- 6 bombas de flotación
- 1 tubo separador
- 1 depurador vibratorio
- 1 refinador
- 1 bomba de regulación de consistencia
- 9 limpiadores centrífugos
- 1 maquina de papel
- 1 rebobinadora

Los equipos necesarios en la planta de recuperación de agua para el proceso son:

- plano inclinado
- decantador

Los equipos necesarios en la planta de tratamiento del efluente de tinta son:

- tanque de separación de solución
- tanque de floculación – sedimentación

## DESCRIPCIÓN TÉCNICA DE LAS MAQUINARIAS INDUSTRIALES

Para la implementación del presente proyecto de inversión, se tiene prevista la incorporación de un conjunto de bienes de capital, mediante la incorporación al amparo de los beneficios que otorga la ley n° 60/90 – Régimen de Incentivos Fiscales para la inversión de Capital Nacional y Extranjero.

## LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA



El grupo tiene proyectado llevar adelante la obtención y elaboración de fibras y celulosas a nivel industrial en el distrito Guayaybi del departamento de San Pedro, específicamente en el local de la cooperativa Guayaybi Poty Ltda. Ubicado en el distrito del mismo nombre sobre la calle diez mil a 3 km de la ruta n° 3.

El predio cuenta con una extensión de 3.000 metros cuadrados.

La propiedad tiene una ubicación óptima y su selección se hizo utilizando criterios razonablemente técnico. Cuenta con conexiones de servicios públicos imprescindibles, los elementos mencionados se vuelven más favorables por las condiciones que ofrece para un mejor mercadeo de la producción a realizar.

## ORGANIZACIÓN DE LA COOPERATIVA GUAYAYBI POTY

Es una organización Cooperativa de Producción Agropecuaria de pequeños productores que manejan de 5-10 hectáreas de tierras productivas cada uno, constituidos por 6 comités de productores, pasando a formar una asociación de productores y posteriormente la Cooperativa. Cuenta con 35 socios activos, que se dedican a la producción agrícola.

## ESTRATEGIA AMBIENTAL DE LA ORGANIZACIÓN

Este proyecto se propone, entre otras cosas, a actuar no solo sobre el costo ambiental y financiero sino también convertirlo en una fuente rentable y sostenible mediante la producción de fibra y celulosa.

Tradicionalmente el sector papelerero ha utilizado árboles para la producción de celulosa, que sirve de base para la producción de papel, en este caso se utilizara el seudotallo de banano y el raquis para dicho fin.

Los recursos naturales son cada día más escasos y el tratamiento y disposición final de los desechos es cada vez más problemático, por tal razón las tendencias mundiales promueven la reutilización y reciclaje de los desechos.

El énfasis de la producción estará no solo, en su calidad, sino también en su aspecto ambiental de lucha contra las variaciones climáticas y a su vez no utilizan fibras arbóreas, lo que favorece la disminución de los bosques talados que sirven de depósito del dióxido de carbono.

## LA DIFERENCIA QUE GARANTIZA LA NO CONTAMINACIÓN

El hidróxido utilizado para obtener la fibra podría ser un contaminante del ambiente si la disposición es inadecuada; este proyecto plantea la neutralización de esta base una vez utilizada con el líquido resultante de la humedad del seudotallo, ya que éste posee un pH ácido de un rango de 5,5 y constituye el 60% de la masa total del seudotallo.

## SITUACIÓN ECONOMICA DEL PAÍS

El proyecto en sus objetivos espera convertirse en un ingreso adicional para los campesinos mediante la explotación de sus propiedades agrícolas a través de sus residuos orgánicos.

El país actualmente atraviesa por una situación económicamente difícil por lo que este proyecto tiene como uno de los objetivos crear una fuente de ingresos adicional para los productores de banano.

### *Mercado linterno*

Hasta esta fecha en el mercado interno solo es vendida la fruta de la banana y es una de las frutas mas consumidas en nuestro medio, comercializándose en el Mercado Central de Abasto de la capital más de 60.000 kg



por día, es decir, cerca de 2.000 toneladas por mes, de este total cerca del 40% ingresa del Brasil. Lo que representa una importante suma de divisas (unos 40.000 U\$ por mes) siendo la importación más acentuada a partir de los meses de septiembre hasta marzo aproximadamente. Por tanto, existe un mercado interno muy importante que no es aprovechado por los banicultores, debido más que nada a falta de una mejor planificación de asistencia técnica y crediticia

### *Producción*

Consiste en la implantación de una fábrica para la producción de fibras y celulosas a partir del seudo tallo y raquis de la bananera, los cuales desde el punto de vista técnico tendrán las siguientes operaciones:

raleo y cortado del seudo tallo y raquis, transporte, catálisis, elaboración de pasta celulósica, secado de la pasta directa e indirectamente.

### PRECIOS

El precio del producto a ofrecer es un factor importante que influye sobre el volumen de venta y sobre los ingresos provenientes de tales ventas; en consecuencia se tomara como base los costos de producción y la estructura del mercado, buscando el punto apropiado entre el precio máximo y los costos de producción.

### ANALISIS DE INVERSIÓN

#### VALOR ACTUAL NETO (VAN)

Al analizar un negocio de plazo, comparamos la inversión con los beneficios futuros de Valor Actual Neto (VAN), que nos permite actualizar esos flujos futuros y restarle el valor de la inversión inicial. Si ese VAN es negativo deseamos la inversión propuesta.

$$VA = \frac{2082 \text{ g}}{\text{kg de Producto}} \cdot 97 \text{ kg de Producto} \cdot 100 \text{ kg de materia prima} = 3,35$$

$$\frac{85 \text{ kg de fibra cruda}}{100 \text{ kg de Producto}} \cdot 450 \text{ g} + \frac{13 \text{ kg de Almidón}}{100 \text{ kg de producto}} \cdot 1390 \text{ g} + \frac{2 \text{ kg de NaOH}}{100 \text{ kg de Producto}} \cdot 1955 \text{ g}$$

## NUESTRA ORGANIZACIÓN

La misma creara puestos directos de trabajos en plantas para la producción de fibras y celulosas mediante el reciclado del raquis y seudo tallo, el recurso humano es un valor relevante para el sistema productivo debido a que uno de los principales objetivos de este proyecto es la creación de ingreso adicional (o bien extra) para los productores de banana en el departamento de San Pedro.

## CONCLUSIÓN

La hipótesis planteada al iniciar la investigación ha sido validada, las expectativas de logros demostradas a través de experiencias y ensayos utilizando técnicas experimentales adecuadas y de bajo costo.

Los procedimientos y las técnicas aplicadas arrojaron los resultados esperados; la obtención de fibras, celulosas y subproductos derivados de estas.

Con esta experiencia se demuestra la posibilidad de explotar este bioelemento en la zona de Guayaybi del departamento de San Pedro, considerado el mayor productor de banana en el país; al mismo tiempo la reutilización de los desechos orgánicos y la creación de fuente de ingreso adicional para los productores de banano que hasta la fecha solo se dedica a comercializar los frutos, ignorando totalmente las otras aplicaciones que podrían en gran medida favorecer a la agroindustria.

Nos queda una hipótesis que surgió en los ensayos y experiencias realizadas: ¿Podría el tallo de la bananera ser utilizado para la elaboración de Placa de Absorción Acústica?

## RECOMENDACIONES

Sugerimos a los productores de la bananera del departamento de San Pedro el aprovechamiento de todos los beneficios que puede brindar esta planta, atendiendo su importancia, fácil tratamiento, disposición en cantidad, calidad y bajo costo.

## BIBLIOGRAFÍA

AQUINO. A. I.; BIANCOTTI, C. E. Producción Agropecuaria, San Lorenzo, Página 55. 2005.

BECERRA, J. F. Revista *Noticias*, Año 1, Número 10, Página 6. 2004.

COSTE, R. Colección Agricultura Tropical, Editorial Blume, Página 70 al 82. 1993.

Departamento de Ingeniería Aplicada. *Ingeniería Hoy*, Publicación de la FCFM (Facultad de Ciencias – Física – Matemática), Páginas 15 al 30. 1994.

ZÁRATE, G. C. L. *El Cultivo de la Banana*, MAG, 1999.

## FUENTES DE CONSULTA

Dirección General de Estadísticas y Censos.

Ley n. 836/80, Código Sanitario, Título II “De la salud y el medio”, Capítulo I “Del saneamiento ambiental – de la Contaminación y la polución”

<http://www.cideiber.com/infopaises/paraguay/par0200.html>

<http://www.indexmundi.com/es/paraguay>

<http://www.cideiber.com/infopaises/paraguay/par0204.html>

Banco central de Paraguay

<http://www.geocities.com/derechopy/grupo2.html>

[http://www.leyes.com.py/archivos\\_rubros/ambiental.html](http://www.leyes.com.py/archivos_rubros/ambiental.html)

Biblioteca de Consulta Encarta 2005

Cartones Yaguareté S.A.

[www.aspapel.es](http://www.aspapel.es)

[www.mma.es/normativa/legis/index.htm](http://www.mma.es/normativa/legis/index.htm)

<http://www.geocities.com/derechopy/impacto.txt> - “Ley 294/93 evaluación de impacto”

<http://www.leyes.com.py> - “Ley 585 – resolución n. 585 del MSP y BS”

## CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO

---

### Menção Honrosa

#### Selección de inóculos para la producción de vinagre de miel

***Autores:***

Natalia Draper Pastorino, 26 anos, uruguaia, aluna do quinto ano do curso de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Química da Universidade da República

***Professora-orientadora:***

Silvana Vero Mendez, 46 anos

***País:*** Uruguai

# SELECCIÓN DE INÓCULOS PARA LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE DE MIEL

## INTRODUCCIÓN

Uruguay presenta condiciones naturales favorables para la producción apícola, que dan lugar a mieles de excelente calidad y muy competitivas en mercados externos exigentes (OPYPA, 1997). Sobre la base de estas ventajas competitivas, la producción ha crecido sostenidamente. Parte del crecimiento se explica por el permanente aumento del número de colmenas (OPYPA, 1997; IICA, 2008) y de la productividad, que puede llegar a 60 kg por colmena (NIN CIRIÓN, 2003).

La mayoría de los productores se encuentra en el litoral oeste del país, debido a la mayor densidad de flora melífera (praderas, bosques, cultivos) y a que se utiliza a la abeja como agente polinizador. Una característica de la producción apícola es que se ha desarrollado en forma espontánea y bajo una gran diversidad de tipos, tamaños y niveles tecnológicos de explotación. Otra característica es la marcada estacionalidad, concentrándose el 85% de la misma entre noviembre y abril.

El destino de la producción es principalmente la exportación (IICA, 2008) que se realiza a granel, sin ningún valor agregado (OPYPA, 1997). Más del 80% de la producción se exporta, siendo Alemania, Estados Unidos y España los principales compradores (IICA, 2008). El crecimiento de las exportaciones ha sido constante, salvo en el período 2005-2006 (ERREA e ILUDAIN, 2006), donde los volúmenes y los precios se estancaron, volviéndose a recuperar en el 2007, superando los 22 millones de dólares (IICA, 2008). Por todo lo expuesto resulta notorio que el sector presenta oportunidades reales de agregado de valor al final de la cadena. La estacionalidad y la regionalidad de la producción, así como la nucleación de productores en cooperativas, podrían favorecer el establecimiento de industrias

de productos no tradicionales derivados de la miel, que podrían utilizar como materia prima los excedentes de exportación.

Como subproductos industrializables de la miel, se pueden mencionar el hidromiel y el vinagre de miel. El hidromiel se obtiene por la fermentación alcohólica de un mosto de miel y agua, realizada por levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El vinagre de miel, a su vez, se obtiene mediante una doble fermentación. En primera instancia se produce hidromiel y en un segundo paso, el etanol del hidromiel se oxida en forma incompleta a ácido acético por medio de las denominadas bacterias acéticas. Según el Reglamento Bromatológico Nacional Uruguayo el vinagre se define como el producto que contiene como mínimo 4% (p/p) de acidez acética, obtenido por fermentación acética de bebidas naturales (vinos, cervezas, sidras, hidromieles), de líquidos alcohólicos provenientes de extracto de malta, mosto de frutas, suero de leche, materias azucaradas o de alcohol etílico, rectificado debidamente diluido.

Para la producción artesanal e industrial de vinagre se utiliza en muchos casos la inoculación del sustrato etanólico, con la llamada “madre del vinagre”. Trátase de un inóculo microbiano de composición no definida obtenida como biomasa en una producción previa de vinagre. Consiste en una masa bacteriana embebida en polisacáridos producidos por las mismas bacterias acéticas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se desconoce la composición y la calidad microbiológica del mismo (GULLO and GIUDICI, 2008).

En general, la producción de vinagre puede realizarse en batch o mediante un proceso continuo. En ambos casos se parte de un sustrato etanólico al cual se adiciona cierta concentración de ácido acético previo a la fermentación (CASSANEGO et al., 2000). Dicho agregado se realiza para favorecer el crecimiento de las bacterias acéticas, algunas de las cuales no crecen en ausencia del mismo. Durante la fermentación, el etanol es convertido en ácido acético, por lo que la concentración total de ácido es mayor que la original. Cuando se ha alcanzado la concentración acética deseada, se retira del fermentador un determinado volumen del producto obtenido y el resto se deja como base para una segunda fermentación, la que comienza cuando se agrega nuevamente un volumen del sustrato etanólico, de forma de alcanzar las concentraciones necesarias para el comienzo de una nueva fermentación. De esta forma el inóculo microbiano se mantiene en el reactor de producción. Sin embargo, es siempre necesario determinar condiciones de almacenamiento de inóculo para períodos donde no se realice actividad.

Las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae*, ubicada en la clase *Alphaproteobacteria*. Se han descrito diez géneros dentro de esta familia: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Neoasaia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter* y *Granulibacter* (Yamada and Yukphan, 2008). Son bacilos Gram negativos, aeróbicos, que oxidan alcoholes y azúcares en forma incompleta dando lugar a la formación de ácidos orgánicos como producto final. Cuando el sustrato es el etanol entonces el producto final es el ácido acético, sin embargo estas bacterias pueden oxidar azúcares a ácidos orgánicos como la glucosa a ácido glucónico. Tienen un metabolismo aerobio obligado, siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Son móviles debido a la presencia de flagelo y no forman endoesporas como forma de resistencia. Estas bacterias tienen un pH óptimo en el entorno de 5-6,5 (HOLT et al., 1994), aunque muchas veces son capaces de crecer a pH más bajo, entre 3-4. Dan positiva la prueba de catalasa y negativa la prueba de oxidasa por lo que carecen de citocromo C oxidasa (DE LEY et al., 1984).

A pesar de la diversidad de bacterias acéticas, solamente ciertas especies de los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Gluconobacter* han sido asociadas a la producción de ácido acético (YAMADA, 2000, DEPPENMEIER et al., 2002, GULLO y GIUDICI, 2008). Estas bacterias han sido aisladas de las llamadas “madres del vinagre” pero además se las ha encontrado en frutos, flores, mostos de vino y de sidra (LISDIYANTI et al., 2003, BARTOWSKY et al., 2003; TOIT et al., 2002; NDOYE et al., 2006). Sin embargo el aislamiento de estas bacterias no ha resultado sencillo. Gullo et al. (2006), en su trabajo sobre la identificación y caracterización de bacterias acéticas responsables de la producción de vinagres artesanales en Italia, no lograron aislamientos directos de los vinagres. Sólo pudieron recuperar las bacterias acéticas luego de realizar enriquecimientos previos, utilizando varios medios sólidos para lograr los aislamientos posteriores. De los medios sólidos ensayados destacaron el medio GYC (SWINGS et al., 1992) por ser en el cual se recuperó la mayoría de los aislamientos. Por su parte Bartowski et al. (2003) no lograron realizar aislamientos de bacterias acéticas provenientes de vinagres de vinos, en dicho medio, ni en otra serie de medios comúnmente utilizados para aislamiento de bacterias. En ese mismo trabajo se describió el medio WL (Difco) suplementado con etanol como el medio óptimo para el aislamiento de bacterias acéticas.

No sólo se presentan dificultades en el aislamiento de las bacterias acéticas, sino también en su mantenimiento. Algunos medios apropiados para el aislamiento no son aceptables para el mantenimiento (GULLO y GIUDICI, 2008). Debido a que el propio proceso de producción del vinagre es un proceso biológico es de suma importancia un control y seguimiento de los pasos involucrados. Es fundamental, por lo tanto, la selección e identificación de los microorganismos involucrados, a la vez de establecer pautas acerca de la producción y el almacenamiento de los inóculos. Este estudio busca seleccionar e identificar cepas nativas adecuadas para este tipo de producción, así como el desarrollo de estrategias de fermentación para obtener el producto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *1) Aislamiento e identificación primaria*

Se realizaron aislamientos de varios tipos de muestras: manzanas y uvas de descarte, sidra, vinos de uva y frutilla con signos de fermentación acética, inóculo de producción comercial de vinagre y las denominadas “madre del vinagre” provenientes de tres productores artesanales de vinagre de vino.

Las muestras sólidas fueron trituradas en bolsa estéril en un homogeneizador. El líquido obtenido de la trituración fue utilizado para realizar los aislamientos. Las muestras líquidas fueron sembradas directamente.

En el caso de las muestras de frutas, en primer lugar se realizaron enriquecimientos en hidromiel suplementado con ácido acético al 1%, sulfato de amonio (0,1 g/l), sulfato de magnesio (0,1 g/l), fosfato de amonio (0,5 g/l) (CASSANEGO et al., 2000) y cicloheximide (50 µg/ml), los que luego se incubaron a 28 °C durante 72 horas. Luego de la incubación se realizaron aislamientos en los medios: GYC (DE LEY et al. 1984) y WL Nutriente (Difco) suplementado con etanol al 2% (BARTOWSKY et al., 2003). En el caso de madres del vinagre, del inóculo comercial y de muestras de bebidas alcohólicas con signos de fermentación acética, se realizaron directamente los aislamientos en ambos medios sólidos. En los casos en que luego de 72 horas de incubación a 28 °C no se detectó crecimiento en ninguno de los medios sólidos, se realizaron enriquecimientos en hidromiel a partir de las muestras originales tal como se describió anteriormente.

Las colonias típicas aisladas fueron analizadas por frotis con tinción de Gram y reacción de catalasa. Aquellos aislamientos que resultaron bastones



Gram negativos, catalasa positivo, fueron reaislados en el medio de aislamiento primario. A todos los aislamientos obtenidos se les realizó prueba de oxidación de etanol a ácido acético y de sobreoxidación de ácido acético a CO<sub>2</sub>, según De Ley et al. (1984). Las cepas se conservaron a -20 °C en Caldo Infusión Cerebro Corazón suplementado con 20% de glicerol. A los 3 y 6 meses de almacenamiento se corroboró viabilidad de las mismas por siembra directa en los medios WL Nutriente (Difco) con etanol y GYC.

## 2) Identificación molecular a nivel de especie

La identificación a nivel de especie se realizó mediante análisis de secuencias del 16SrDNA de los aislamientos. En primer lugar se realizó la extracción de ADN total de cada cepa utilizando el kit de purificación de ADN Wizard® Genomic Promega. A partir del ADN obtenido se amplificó el 16SrDNA (aprox. 1500 pares de bases), utilizando los primers universales 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GNTACCTTGTTACGACTT-3') correspondientes a las posiciones 9-27 y 1492-1509 del 16SrDNA de *E. coli*. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Labnet Multigene™ II Personal Thermal Cycler, con desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 3 min a 72 °C, y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los amplicones obtenidos fueron enviados para su secuenciación unidireccional en el laboratorio Macrogen (Corea). Las secuencias parciales obtenidas fueron comparadas con la base de datos del GenBank (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>>) mediante el Nucleotide Blast del NCBI (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>>). A su vez, dichas secuencias se alinearon utilizando el programa Mega version 4 (TAMURA, DUDLEY, NEI y KUMAR, 2007). En base al alineamiento se construyó el árbol filogenético utilizando el método de Neighbour-Joining, con un bootstrap de 1.000 repeticiones. Para realizar el árbol, se incorporaron secuencias de cepas de colección pertenecientes a diferentes especies, depositadas en el GenBank. Las distancias se calcularon utilizando el método de Jukes-Cantor.

## 3) Caracterización de bacterias acéticas. Capacidad de producción de ácido acético a partir de hidromiel

Como sustrato de partida se preparó el hidromiel por fermentación alcohólica de miel diluida y suplementada, inoculada con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada en un trabajo anterior. Esto se logró diluyendo la miel en agua destilada hasta alcanzar unos 20° Brix

aproximadamente, luego se adicionó sulfato de amonio (1,0 g/l) y fosfato de amonio (0,4 g/l), por último se inoculó con 1 ml de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* de turbidez similar al tubo 4 de la escala de Mc Farland. Luego de 48 horas de fermentación a 28 °C, el hidromiel fue centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se suplementó con sulfato de amonio (0,1 g/l), fosfato de amonio (0,5 g/l), sulfato de magnesio (0,1g/l) según Cassanego et al. (2000) y ácido acético (1%) lo cual evitó el sobrecrecimiento de las levaduras remanentes en el hidromiel. Veinte mililitros del hidromiel suplementado se dispensaron en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad y se inocularon con 0,5 ml de un inóculo de 48 horas, de cada una de las cepas acéticas, precultivadas en medio RAE (Sievers and Swings, 2005) (3% etanol, 1% ácido acético), ajustado por turbidez al tubo 1 de la escala de Mc Farland. Los cultivos se incubaron a 28 °C y con agitación (shaker orbital a 150 rpm) durante 10 días. A los días 3, 5, 7 y 10 se determinaron las concentraciones de ácido acético y etanol mediante HPLC utilizando una columna OA 1000 con solución de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvil a un flujo de 0,6 ml/min con detección UV a 210 nm en el caso del ácido acético y detección por índice de refracción en el caso del etanol. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se analizaron determinando el intervalo de confianza con un  $\alpha$  0,05, utilizando Microsoft Office Excel 2003. En base a los resultados se seleccionaron las cepas con las cuales se obtuvo mayor concentración de ácido acético.

#### 4) Fermentación competitiva

Entre dos de las cepas acéticas seleccionadas se llevó a cabo un ensayo de competencia, de forma de determinar cuál de ellas resultaría predominante en una fermentación competitiva. Para ello se inoculó hidromiel suplementado con una mezcla de las dos cepas, provenientes en un precultivo en medio RAE, tal como se describió anteriormente. La fermentación competitiva se realizó en las mismas condiciones de incubación que las explicadas anteriormente, para las cepas individuales. Al tercer y quinto día se tomaron muestras determinándose por HPLC la concentración de ácido acético producido. A su vez, se realizaron recuentos en placas de medio WL (Difco) suplementado con etanol. Se realizaron tres repeticiones simultáneas. De las placas contables de cada repetición, se realizaron cinco colonias, las cuales fueron analizadas molecularmente para determinar a cuál de las cepas acéticas correspondía. Se extrajo así, el ADN

total de los 15 aislamientos utilizando el procedimiento descrito anteriormente. A partir del ADN se realizó un REP-PCR en las condiciones descritas por de Bruijn *et al* (1996), utilizando los primers Rep1r: 5'-IIIIGCICGICATCI GGC-3' y Rep2: 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'. El procedimiento de PCR consistió en un primer calentamiento a 95 °C durante 5 min, 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 45 °C, 6 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los perfiles de amplificación obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1,5% bajo luz UV utilizando bromuro de etidio como indicador. A su vez, se obtuvieron, de igual forma, los perfiles correspondientes a las cepas puras utilizadas en la fermentación competitiva. Dichos perfiles se compararon con los obtenidos para los aislamientos del ensayo de competencia.

#### 5) Optimización de las condiciones de producción

Se planteó la optimización de la producción mediante el desarrollo de un proceso continuo, de forma de obtener un producto con una concentración de 4% de ácido acético. La cepa acética utilizada en este estudio fue la seleccionada en la fermentación competitiva. Se estudiaron tres estrategias: hidromiel (etanol al 3%) suplementado con ácido acético al 1%, hidromiel (etanol al 2%) suplementado con ácido acético al 2% e hidromiel (etanol al 3%) suplementado con ácido acético al 3%. En todos los casos se suplementó el hidromiel con extracto de levadura al 0,1%, como fuente de nitrógeno y factores de crecimiento. Para evitar las pérdidas por evaporación se aumentó al 50% el volumen de trabajo, disminuyéndose la agitación a 100 rpm. A los 3, 5 y 7 días de incubación a 28 °C se determinó por HPLC la concentración de ácido acético y etanol en cada tratamiento. Teniendo en cuenta que a partir de un gramo de etanol se produce 1,34 g de ácido acético, se calculó el porcentaje de conversión de etanol a ácido. A su vez, para evaluar la evaporación en este sistema, se utilizaron controles sin inocular, determinándose la concentración de etanol y acético antes y después del período de incubación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aislamiento e identificación primaria

Se pudo afirmar que las distintas cepas aisladas pertenecían a la familia *Acetobacteraceae* según De Ley et al. (1984). La tabla 1 muestra el origen de los aislamientos obtenidos y los medios en los cuales fueron aislados. Como

se puede apreciar, no se pudieron aislar bacterias acéticas de las muestras de sidra. En estos casos, en los enriquecimientos en hidromiel no se evidenció aumento de turbidez ni desarrollo de bastones Gram negativos. En todos los demás casos se lograron aislamientos en medio WL Nutriente (Difco) suplementado con un 2% de etanol, mientras que el medio GYC no fue efectivo en algunos casos. En la figura 1 podemos visualizar el crecimiento típico de las bacterias acéticas en los medios seleccionados.

Todos los microorganismos aislados resultaron bastones Gram negativos, evidenciaron presencia de enzima catalasa y dieron positiva la prueba de oxidación de etanol a ácido acético.

Las cepas F y Gam no crecieron en el ensayo destinado a determinar sobreoxidación de ácido acético. Solamente los aislamientos A2 y A4 no fueron capaces de oxidar el ácido acético a CO<sub>2</sub>. Estos resultados permitieron afirmar que las cepas A2 y A4 pertenecen al género *Gluconobacter* mientras que las restantes podrían corresponder a los géneros *Acetobacter* o *Gluconacetobacter*.

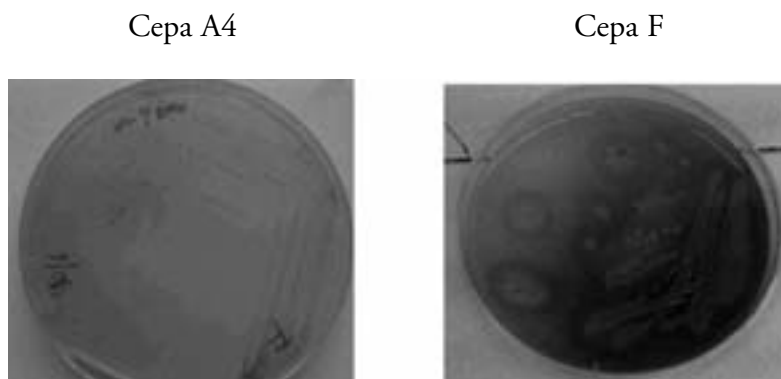
Casi todas las cepas acéticas, conservadas en glicerol 20% a -20 °C, pudieron recuperarse en medio sólido luego de 3 y 6 meses de almacenamiento. La única que no mantuvo su viabilidad fue la cepa comercial (Gam), la cual no pudo ser recuperada luego de 3 meses de almacenamiento.

**Tabla I.** Origen, medio de aislamiento y resultados de ensayo de sobreoxidación de ácido acético de los aislamientos obtenidos.

ORIGEN	AISLAMIENTO		Sobreoxidación de ácido acético
	WL	GYC	
Uvas Cabernet Sauvignon (A1)	+	+	+
Uvas Sauvignon Blanc (A2)	+	+	-
Uvas Merlot (A3)	+	+	+
Uvas Tannat (A4, A6)	+/+	+/+	-/+
Vino Moscatel (A7)	+	+	+
Sidra A, B y C	-	-	Nd
Vino de Frutilla (F)	+	-	Nd
Manzanas (M1, M2, M3)	+	+	+
Madre vinagre (MR)	+	+	+
Madre vinagre comercial (Gam)	+	-	Nd

Nd: No se determinó.

**Figura 1.** Cepas aisladas en medios WL (suplementado con 2% de etanol) y GyC



## 2) Identificación molecular a nivel de especie

El análisis de las secuencias del 16S rDNA, utilizando como base de datos el GenBank, dio como resultado que las cepas A2 y A4 presentaban un 100% de similitud con secuencias correspondientes a cepas de la especie *Gluconobacter oxydans*. Este resultado confirmó para estas cepas la identificación fenotípica a nivel de género realizada previamente. El análisis de las secuencias del aislamiento F mostró un 99% de similitud con secuencias correspondientes a la especie *Acetobacter pastorianus*, mientras que las secuencias de los restantes aislamientos evidenciaron entre un 99% y un 100% de similitud con secuencias correspondientes a dos especies del género *Gluconacetobacter*. La Figura 2 muestra el árbol filogenético construido en base al alineamiento de dichas secuencias. En el mismo se observan las relaciones entre las secuencias obtenidas para los diferentes aislamientos con secuencias depositadas en el GenBank, correspondientes a cepas de colección de varias especies acéticas. Las barras horizontales indican el número de bases diferentes entre grupos, de acuerdo a la escala mostrada en la figura, cuya unidad (0,002) corresponde a una diferencia de 2 bases en 1.000. Se puede observar que la mayoría de los aislamientos conforman un grupo con secuencias correspondientes a *Gluconacetobacter saccharivorans*, especie descrita en el 2006 (Lisdiyanti et al., 2006). La cepa M1, en cambio, forma un grupo aparte junto a cepas tipo de la especie *Gluconacetobacter hansenii*. Por su parte, la cepa comercial (Gam) fue identificada como *Ga. europaeus*, especie cuyo mantenimiento en medios de cultivo no es sencillo (SIEVERS and SWINGS, 2005).

**Figura 2.** Árbol filogenético construido en base a las secuencias del 16SrDNA de los aislamientos y de cepas de referencia



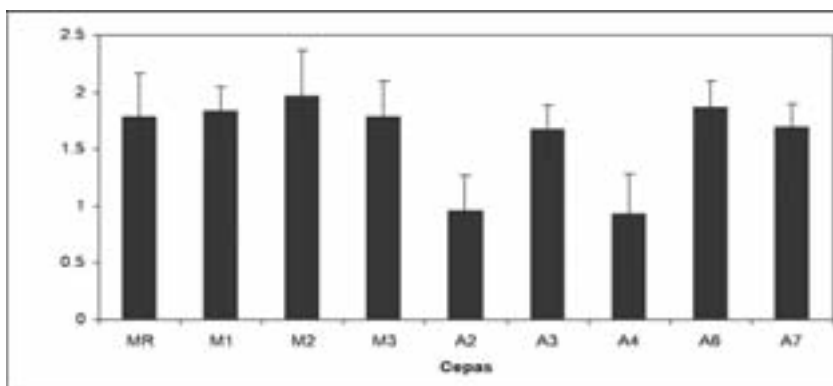
### 3) Caracterización de bacterias acéticas. Capacidad de producción de ácido acético a partir de hidromiel

La Figura 3 muestra la concentración máxima de ácido acético alcanzada por cada una de las cepas. La producción de acético se constató hasta el quinto día, observándose una disminución de la concentración de ácido en días posteriores, posiblemente debido a evaporación o sobreoxidación microbiana del mismo.

Las cepas F y Gam no crecieron en hidromiel suplementado, en las condiciones del ensayo, por lo fueron descartadas para ensayos posteriores.

Los resultados mostraron que los aislamientos del género *Gluconobacter* produjeron cantidades de ácido significativamente menores que los aislamientos del género *Gluconacetobacter*. A su vez, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de acético alcanzadas por acción de los diferentes aislamientos del género *Gluconacetobacter*. Dado que dichos aislamientos pertenecían a dos especies diferentes se decidió realizar un ensayo competitivo entre aislamientos de las dos especies, de forma de determinar qué especie sería dominante en el proceso de fermentación.

**Figura 3.** Concentración máxima de ácido acético producida por cada uno de los aislamientos. Las barras indican el intervalo de confianza con  $\alpha = 0,05$ .



#### 4) Fermentación competitiva

Las colonias desarrolladas en las placas contables, obtenidas en la fermentación competitiva, no mostraron diferencias fenotípicas. A su vez, el análisis de los perfiles obtenidos por REP-PCR para los 15 aislamientos provenientes de dichas placas evidenciaron que en todos los casos se trataba de la cepa MR, identificada como *Ga. saccharivorans*. Este resultado permitió afirmar que la cepa MR se impuso a la cepa M1 en la fermentación competitiva, por lo que la misma fue seleccionada para realizar los ensayos de optimización de producción.

La Figura 4 muestra los perfiles correspondientes a las cepas MR y M1 y los obtenidos con los aislamientos de la fermentación competitiva. En la misma se puede apreciar que dichas cepas son fácilmente diferenciables.

La concentración de ácido acético y el recuento bacteriano obtenidos en la fermentación competitiva, fueron mayores que los obtenidos con las mismas cepas inoculadas en forma individual. El recuento de bacterias al quinto día en la fermentación competitiva fue  $2,6 \times 10^6$  ufc/ml, mientras que en la fermentaciones individuales se detectaron  $9 \times 10^5$  ufc/ml y  $2 \times 10^5$  ufc/ml para MR y M1 respectivamente. A su vez en la fermentación competitiva se alcanzó una concentración de 2,5% de acético, valor superior al obtenido en las fermentaciones individuales (ver Figura 3). Este resultado hizo suponer que las células que no prosperaron en la fermentación, aportaron factores de crecimiento, cuya ausencia limitaría el crecimiento de la cepa MR en la fermentación individual.

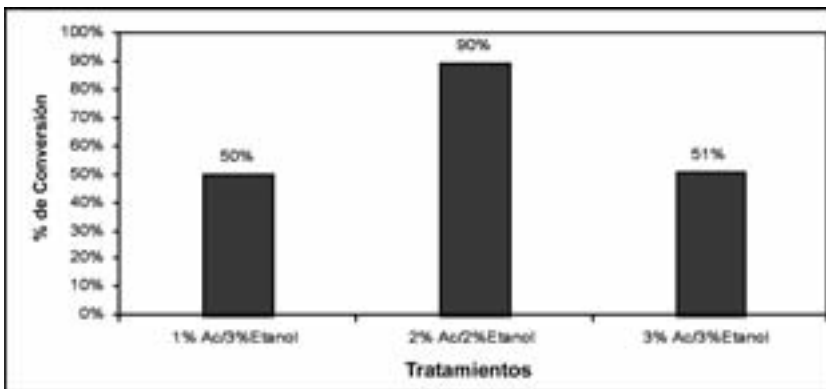


**Figura 4.** Perfiles de Rep-PCR obtenidos para la cepa MR, la cepa MI y dos aislamientos obtenidos en la fermentación competitiva (A y S). Los dos últimos carriles corresponden a marcadores de peso molecular

### 5) Optimización de las condiciones de producción

La Figura 5 muestra los porcentajes de conversión de etanol a ácido acético obtenidos al quinto día de fermentación, en cada uno de los tratamientos ensayados. Los valores obtenidos al tercer y séptimo día fueron menores que los obtenidos en el quinto día, por lo que no fueron analizados en esta instancia. Cabe destacar que la disminución de acético al séptimo día puede deberse a evaporación o sobreoxidación del mismo en el proceso.

**Figura 5.** Porcentaje de conversión de etanol a ácido acético alcanzada al quinto día en diferentes estrategias de fermentación



Los resultados muestran que la mejor estrategia para la producción de vinagre en estas condiciones sería la utilización de hidromiel conteniendo 2% de etanol suplementado con ácido acético al 2%. En dichas condiciones se obtuvo un producto con concentración acética del 4,1%, lo que implica un porcentaje de conversión de etanol a ácido acético del 90%. A su vez, se puso en evidencia que concentraciones de etanol del orden del 3% inhibían de alguna manera el crecimiento de las bacterias seleccionadas ya que en los tratamientos en los que se utilizó esta concentración de alcohol, el porcentaje de conversión llegó solamente al 50%, independientemente del porcentaje de acético inicial.



Los controles de evaporación, sin inóculo microbiano, mostraron que las concentraciones de acético y etanol no variaron hasta el quinto día, lo que validó en parte los resultados obtenidos.

## CONCLUSIONES

Las estrategias desarrolladas permitieron el aislamiento de cepas acéticas capaces de producir ácido acético por oxidación incompleta del etanol presente en hidromiel. Se obtuvieron cepas pertenecientes a tres géneros, pero sólo las correspondientes al género *Gluconacetobacter* resultaron buenas candidatas para la producción de vinagre de miel. Los resultados obtenidos representan un punto de partida para el desarrollo de una producción a pequeña escala, ya que se cuenta con un proceso y una cepa adecuada, debidamente identificada y cuyas condiciones de mantenimiento durante por lo menos 6 meses, han sido establecidas.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto PDT 74/11 (Biotecnología) y por la ANII.

## BIBLIOGRAFÍA

- BARTOWSSKY, E. J.; XIA, D.; GIBSON, R.; FLEET, G.; HENSCHKE, P. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 36:307-314. 2003.
- CASSANEGO, E.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, R.; SIMAS, A.; MEUNERT, E. Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar. *B. CEPPA, Curitiba*. 18:39-50. 2000.
- DE BRUIJN, F. J., RADEMAKER, J. L. W., SCHNEIDER, M., ROSSBACH, U., and LOUWS, F. J. Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacterial and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant Microbe Interactions*. Stacey, G. and Gresshoff, P. (eds.) APS Press. 1996.
- DE LEY, J., GOSSELÉ, F. & SWINGS, J. Genus I *Acetobacter*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Williams & Wilkens, Maryland, U.S.A., pp. 268-274. 1984.

- GULLO, M.; GIUDICI, P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic Vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology* 125:46-53. 2008.
- IICA. 2008. Evolución y situación de la cadena agroalimentaria apícola. Uruguay Agroalimnetario en cifras. URL: <<http://www.iica.org.uy/online/agroencifras/Miel-2008.pdf>>. Consultado: Diciembre, 2008.
- LISDIYANTI, P.; NAVARRO, R.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 2101-2111. 2006.
- NIN CIRIÓN, R. Miel: Situación actual y perspectivas. Anuario 2003, OPYPA. URL: <<http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/miel%20uruguay.pdf>>. 2003.
- OPYPA. La industria de transformación de productos agropecuarios. 1997. URL: <[http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Litpa/litpa\\_default.htm](http://www.mgap.gub.uy/opypa/PUBLICACIONES/Litpa/litpa_default.htm)>. Consultado: Diciembre, 2008.
- SIEVER, M., and SWINGS, J. *Genus VIII. Gluconacetobacter* In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. Two, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. 2nd edition BRENNER, D. J., KRIEG, N. R., and STALEY, J. T. (eds.). Springer New York. pp. 72-77. 2005.
- YAMADA, Y., and YUKPHAN, P. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125:15-24. 2008.

## CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR

---

### Menção Honrosa

**Tecnología sustentable para extracción de aceites a partir de semillas oleaginosas: aplicación de solventes no contaminantes en condiciones de alta eficiencia y no inflamabilidad**

***Autor:***

Pablo Ezequiel Hegel, 30 años, argentino, doctor en ingeniería química pela Universidad Nacional del Sur - CONICET

***País:*** Argentina

# TECNOLOGÍA SUSTENTABLE PARA EXTRACCIÓN DE ACEITES A PARTIR DE SEMILLAS OLEGINOSAS: APLICACIÓN DE SOLVENTES NO CONTAMINANTES EN CONDICIONES DE ALTA EFICIENCIA Y NO INFLAMABILIDAD

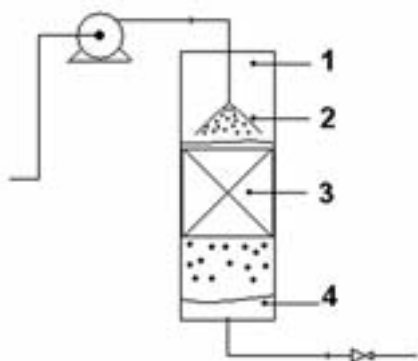
## RESUMEN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la extracción de aceites a partir de semillas oleosas, en el cual se utiliza un solvente o una mezcla de solventes no contaminantes (gases densos), en condiciones adecuadas como para que dicho solvente o mezcla de solventes sea completamente miscible con el aceite a extraer en la fase líquida y como para que la fase vapor presente en el proceso no sea inflamable. De esta manera, la completa miscibilidad asegura una alta eficiencia de extracción mediante un proceso no contaminante y seguro.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Tanto en los procedimientos de extracción de aceites con fines farmacológicos o cosméticos (triglicéridos o ceras), como en los de extracción de aceites edibles, el contenido de solventes en los residuos y en el producto final debe ser mínimo. Es por ello que, gracias a que pueden ser eliminados fácilmente del extracto (KING et al., 1996), la utilización de solventes cuasicríticos, tales como el propano, el butano, el pentano, el dimetileter o el CO<sub>2</sub>, ha resultado ser particularmente atractiva.

La utilización de solventes cuasicríticos en procedimientos extractivos ha sido ampliamente estudiada. En particular, una técnica apropiada para conseguir un contacto adecuado entre el gas condensado y las semillas molidas, es la conocida como percolación, en la cual se agrega un solvente líquido sobre un lecho de semillas de poca altura (ver figura 1) (HEGEL et al., 2004). No obstante, esta técnica presenta la desventaja de que, con excepción del CO<sub>2</sub>, todos los solventes antes mencionados son inflamables, lo que dificulta la descarga de las bandejas de semillas y la carga del extractor en condiciones de seguridad.



**Figura 1.** Extracción de aceites vegetales en un lecho fijo de semillas molidas por percolación de gases licuados. 1. Solvente en fase vapor (propano gaseoso). 2. Solvente en estado líquido. 3. Lecho de semillas molidas. 4. Miscela (solvente + aceite) a separación.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee un procedimiento novedoso para extraer aceites vegetales a partir de semillas molidas y/o para expeler aceites vegetales a partir de semillas sin moler, en el cual se utiliza mezclas de CO<sub>2</sub> con propano, de manera que la fase vapor no sea inflamable y que la fase líquida sea totalmente miscible con el aceite extraído.

## SOLVENTES SUPERCRÍTICOS Y CUASICRÍTICOS (GASES DENSOS)

El dióxido de carbono es el solvente supercrítico más estudiado y utilizado en la industria alimenticia, no solo porque es barato y esta disponible en grandes cantidades y pureza, sino también porque es seguro, no inflamable, fácil de manejar, y además fisiológicamente se encuentra presente en los alimentos en muy bajas cantidades. Por estas características está aprobado para su uso en la industria de alimentos sin declaración (TYLER, 1984, KING et al., 1993). Además, al efectuarse el reciclo del CO<sub>2</sub> se minimizan las emisiones del mismo hacia el medio ambiente. La extracción con dióxido de carbono supercrítico de aceites vegetales, tanto esenciales como fijos, ha sido estudiada ampliamente (REVERCHON, 1997, REVERCHON et al., 2006, REVERCHON et al., 2000), y continua siendo aún hoy día tema de estudio.

La aplicación industrial de estos procesos, por otra parte, esta limitada a pocos casos, en particular debido a las condiciones de alta presión a las que es necesario trabajar para realizar una operación eficiente. Para entender el problema es conveniente resaltar las características del dióxido de carbono supercrítico desde el punto de vista de su poder solvente:

- el CO<sub>2</sub> es capaz de disolver compuestos no polares, o levemente polarizables;
- posee la virtud de ser muy buen solvente para compuestos de bajo peso molecular; este poder solvente decrece a medida que aumenta el peso molecular;
- tiene una gran afinidad con compuestos orgánicos oxigenados de mediano peso molecular;
- los ácidos grasos libres y sus glicéridos exhiben una muy baja solubilidad en CO<sub>2</sub> y los pigmentos son aún menos solubles;
- el agua tiene baja solubilidad en CO<sub>2</sub> a temperaturas por debajo de los 100 °C;
- las proteínas, los polisacáridos y las sales en general, son insolubles en CO<sub>2</sub>;
- el dióxido de carbono supercrítico es capaz de separar compuestos de alto peso molecular, baja polaridad y volatilidad, a medida que se incrementa la presión de operación.

Estas características que presenta el CO<sub>2</sub> lo muestran como un solvente poco atractivo desde el punto de vista económico para la extracción de aceites vegetales (compuestos de gran peso molecular), ya que la solubilidad de los triglicéridos es muy baja, aún a presiones de 300 bar (FRIEDRICH et al., 1984). El sistema dióxido de carbono + aceite vegetal presenta un comportamiento de fases heterogéneo (líquido-líquido-vapor, líquido-líquido, líquido-vapor) en un rango de condiciones muy amplio, tanto subcríticas como supercríticas (condiciones críticas del CO<sub>2</sub>: 73 bar y 32 °C).

Por otra parte, los aceites vegetales son completamente miscibles con solventes nopolares como el propano, butanos, pentanos y/o dimetileter en estado líquido, a temperatura ambiente. Por ejemplo, existe una gran afinidad entre la molécula de propano y las cadenas hidrocarbonadas de los triglicéridos. A temperaturas más elevadas, a condiciones cercanas a la temperatura crítica de estos solventes existe un rango de condiciones de inmiscibilidad líquido-líquido. Si bien tal rango varía con la composición del aceite, el mismo se extiende, por ejemplo para el propano, aproximadamente desde los 70 a 100 °C. Sin embargo, a diferencia del CO<sub>2</sub>, en este rango de temperatura del sistema se puede recuperar la miscibilidad completa en la fase líquida incrementando la presión (HEGEL et al., 2006).

En los procesos de extracción de aceites fijos a partir de matrices vegetales es importante tener el sistema aceite-solvente en una fase líquida (o fluida con una densidad del orden de la de los líquidos), totalmente homogénea, ya que la aparición de una segunda fase líquida es perjudicial para el proceso de transferencia de masa, reduciendo la eficiencia de extracción del solvente. Esto se confirmó al realizar una serie de extracciones en condiciones de equilibrio líquido-líquido-vapor. Una segunda fase líquida en el sistema da lugar a dos efectos negativos durante el proceso de extracción: el primero tiene que ver con la baja solubilidad del aceite en la fase líquida de menor densidad, rica en solvente. El segundo efecto está relacionado con la alta viscosidad de la fase líquida concentrada en aceite en contacto con las semillas molidas, que limita la transferencia de masa hacia la fase líquida rica en solvente. Estos efectos provocan que el solvente pase a través de las semillas molidas extrayendo muy poco aceite desde las mismas. Así, el propano, los butanos o pentanos son muy buenos solventes para la extracción de los aceites vegetales, a temperaturas de extracción que se encuentren por debajo del rango de inmiscibilidad líquida.

Asimismo, el propano también es considerado un solvente verde, es decir no tóxico para el ser humano y para los animales en general (BRUNNER, 1994). El contenido de propano residual que puede existir en los alimentos es muy bajo, ya que bajo condiciones atmosféricas su solubilidad es muy baja en general (el propano es un gas en condiciones atmosféricas).

Sin embargo, el propano posee una desventaja en comparación con el dióxido de carbono, y es su alta inflamabilidad, característica que torna peligrosa su implementación en un proceso discontinuo (como lo es generalmente el de extracción con gases densos) por la interacción que existe entre los operarios y el equipo al efectuar el recambio de las semillas oleosas a procesar.

Una mezcla de propano y dióxido de carbono podría ofrecer ciertas virtudes en la extracción de aceites vegetales, al ofrecer un buen poder solvente (propano), selectividad (la presencia de CO<sub>2</sub> podría evitar la extracción de pigmentos y ácidos grasos libres), y seguridad al operar con mezclas solventes no inflamables (HEGEL et al., 2006, HEGEL et al., 2007).

Las condiciones de operación del proceso, es decir temperatura, presión y composición del solvente, se pueden obtener a partir de la ingeniería del equilibrio de fases de los sistemas binarios: CO<sub>2</sub> + propano, CO<sub>2</sub> + aceite vegetal, propano + aceite vegetal, y a partir de la predicción del sistema

ternario CO<sub>2</sub> + propano + aceite vegetal por medio de un modelo termodinámico. El análisis sistemático del comportamiento de fases del sistema ternario a estudiar requiere por un lado de un modelo termodinámico robusto y confiable, que permita predecir el comportamiento de mezclas altamente asimétricas, y también es muy importante disponer de información experimental que permita evaluar la fiabilidad del modelo, y de ser necesario realizar un ajuste de sus parámetros para efectuar un análisis riguroso de la selección de las condiciones de operación de la mezcla solvente.

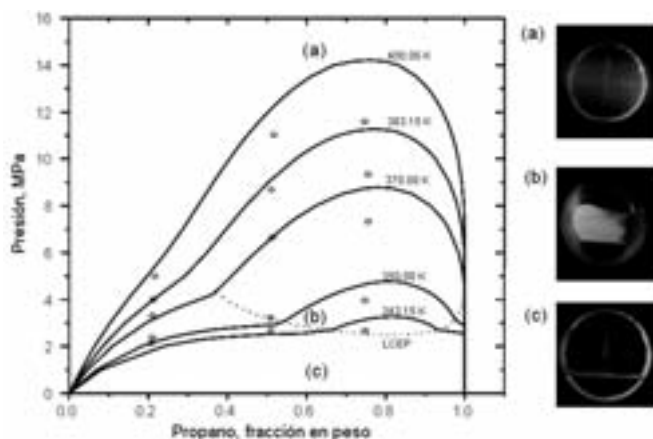
En este trabajo se seleccionó como modelo termodinámico la ecuación de estado a contribución grupal (GC-EOS), ya que de acuerdo con estudios realizados en trabajos previos (ESPINOSA et al., 2000, ESPINOSA et al., 2002, PEREDA et al., 2006) demostró ser apropiada para la predicción de mezclas altamente asimétricas, como es el caso de las mezclas de CO<sub>2</sub> + propano + aceite vegetal estudiadas. Se analizaron los sistemas binarios y el sistema ternario por medio de la ecuación GC-EOS, para determinar en forma preeliminar las condiciones de operación del sistema. Luego se realizaron mediciones de equilibrio entre fases del sistema bajo estudio, para determinar fehacientemente las condiciones de equilibrio líquido-líquido-vapor.

La utilización de CO<sub>2</sub>, propano, dimetileter, butanos o pentanos como solventes en la extracción de aceites fueron estudiados previamente por de la Fuente et al. (HEGEL et al., 2006), Coorens et al. (1988), Florouse et al. (2002) y Zozel (US\$ 4,331,695) (1982). Para ilustrar el comportamiento del propano en la extracción de aceites, se puede usar el gráfico presión – composición de una mezcla binaria propano+aceite (ver Figura 2 en la cual el aceite está representado por tripalmitin). Se observa que por debajo de 60 °C, la mezcla de propano y aceite es completamente miscible en todas proporciones. No obstante, a temperaturas mayores aparece inmiscibilidad líquido-líquido y, como consecuencia, disminuye drásticamente el poder solvente del propano.

Estudios previos realizados por Marchiaro et al. (1999) mostraron que por debajo de 60 °C, bajo condiciones de miscibilidad completa y utilizando propano líquido como solvente, podría obtenerse una extracción rápida y eficiente del aceite de semillas. Resultados similares se mencionan también en la patente US\$ 5,405,663 (HEIDLAS et al., 1995). Similar comportamiento al propano, en lo que refiere a la extracción de aceites vegetales, presentan los butanos, pentanos y el dimetileter.



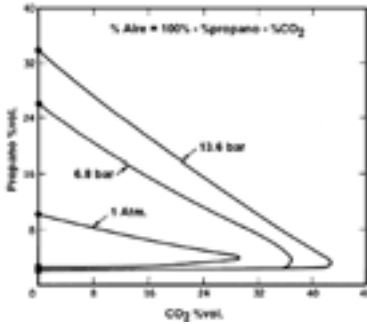
**Figura 2.** Equilibrio de fases de propano + tripalmitin. Diagrama presión vs. concentración de propano a distintas temperaturas de operación (Coorens et al., 1988). Estado de fases: (a) estado supercrítico, (b) equilibrio líquido-líquido-vapor, (c) equilibrio líquido-vapor (De la Fuente et al., 1997).



## SEGURIDAD OPERATIVA. MEZCLAS NO COMBUSTIBLES

El análisis de riesgo y la seguridad de las plantas de procesos químicos e industriales es de suma importancia cuando se diseña un proceso, más aún cuando se trabaja con gases inflamables. Los gases inflamables tienen la capacidad de mezclarse rápidamente con el aire, para formar mezclas combustibles. De esta manera, ante algún incidente (un escape de gas, por ejemplo) pueden ocasionar daños serios a las instalaciones y al personal, si las mezclas se ponen en contacto con alguna fuente de ignición. El riesgo es aún más importante al tener en cuenta que se trabaja con recipientes a presión.

Por cuestiones de seguridad es muy importante conocer las propiedades combustibles de los solventes, en nuestro caso propano, que intervienen en el proceso. Por lo general aumentos de temperatura y presión incrementan el rango de concentración donde tiene lugar una mezcla inflamable. Conociendo los límites prácticos de flamabilidad es posible tornar las mezclas en no combustibles mediante el agregado de agentes inertes. Dentro de los métodos más comunes para inertizar reactores se procede a inyectar un gas inerte a presión, luego se ventea el contenido del equipo hasta la presión atmosférica, repitiendo la operación hasta disminuir el contenido de agente oxidante hasta el nivel deseado. Sin embargo, este procedimiento resulta poco práctico y antieconómico.



**Figura 3.** Efecto de la presión sobre la cantidad de CO<sub>2</sub> necesaria para inertizar la mezcla combustible (ZABETAKIS, 1965).

Otra alternativa es operar directamente con una mezcla no combustible. De esta manera, ante un incidente como un escape de gas por ejemplo, el riesgo de flama-bilidad se vuelve muy bajo. Los agentes inertizantes por excelencia son el nitrógeno, dióxido de carbono (utilizados en el industria), y el halón 1211 y 1301 (utilizados en los extinguidores de fuego).

En la figura 3 se puede observar el efecto inertizante del CO<sub>2</sub> sobre el proceso de combustión del propano con aire (ZABETAKIS, 1965). La figura 3 muestra que a partir de una concentración del 28% de CO<sub>2</sub>, aproximadamente, la mezcla de propano y aire se torna no combustible a presión atmosférica. A mayores presiones, sin embargo, se requiere una mayor cantidad de agente inerte para evitar la inflamación. Esto se debe a que la región de flamabilidad se amplía con el incremento de la presión. En lo que respecta a la extracción de aceite desde semillas molidas usando gases (o mezclas de gases) condensados como solventes, es preferible usar solventes saturados en lugar de subenfriados. De esta manera, la presión de operación del extractor se minimiza. Por otro lado, el proceso resulta similar al utilizado convencionalmente en la industria: extracción por percolación del solvente a través del lecho de material a procesar. Esto por un lado brinda un proceso factible económica y tecnológicamente, y también facilita la operación, pues no es necesario bombear el solvente a altas presiones en flujo forzado a través de lecho. En este proceso, existirá vapor en un seudoequilibrio con el solvente líquido, en el extractor (ver figura 1).

En principio la operación con propano puro no presenta riesgos de flamabilidad durante la extracción debido a la ausencia de aire en el extractor. Sin embargo, un eventual escape de solvente implica un alto riesgo de flamabilidad. En un escape, el combustible se pone en contacto aire y se dispersa en el mismo, descendiendo su concentración a niveles que se encuentran dentro de la zona de flamabilidad.

Además, durante el proceso de separación del aceite, aguas abajo del extractor, también existe el riesgo de inflamación por contacto no deseado del solvente con aire. Otro aspecto crítico a analizar es el proceso de apertura

del recipiente de extracción, el cual expone su interior al ambiente circundante. Durante esta operación los operarios, al efectuar el recambio del material a procesar, toman contacto con el solvente en fase vapor. Si se utiliza una mezcla de propano y dióxido de carbono en estado vapor se torna no inflamable en presencia de aire cuando la concentración de CO<sub>2</sub> es de por lo menos 30 % en volumen (ZABETAKIS, 1965).

## REGIÓN FACTIBLE DE OPERACIÓN

Las mezclas de propano y dióxido de carbono permiten extraer aceites fijos con alta eficiencia. Illés et al. (1997) emplearon una mezcla de propano y dióxido de carbono (relación molar 66:34) a 28 °C y presiones de entre 80-120 bar para extraer aceite de rosa mosqueta (*rosa aff. Cynosbate fructus cum geminare*).

El agregado de CO<sub>2</sub> al propano o a butanos, a pentanos o al dimetileter da lugar a que la inmiscibilidad liquido-líquido que presentan estos solventes con el aceite a altas temperaturas se produzca a temperaturas más bajas. S. Peter et al. (1992) utilizaron dicha propiedad de conseguir la inmiscibilidad liquido-liquido entre la fase aceite y la fase solvente, para poder refinar o fraccionar el aceite, usando mezclas de CO<sub>2</sub> y propano y así obtener monoglicéridos de mezclas complejas de estos compuestos con triglicéridos, diglicéridos y ácidos grasos libres. Una propiedad similar se describe en la patente US\$ 5,626,756 (HEIDLAS et al., 1997) que se refiere al fraccionamiento o purificación de aceites utilizando mezclas de CO<sub>2</sub> y propano, en procesos de extracción o fraccionamiento líquido-líquido.

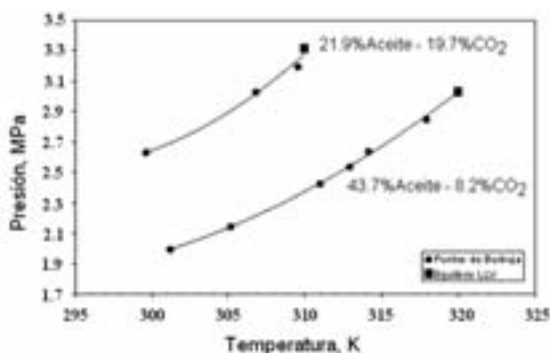
En la presente invención se ha desarrollado un procedimiento de extracción de aceites que, aunque utiliza mezclas de CO<sub>2</sub> y propano, se diferencia de los procedimientos arriba mencionados principalmente en que: i) el procedimiento de la invención, se lleva a cabo en condiciones de completa miscibilidad de la fase líquida oleosa con la mezcla solvente y ii) el procedimiento de la invención se realiza bajo condiciones en donde se cumple que la fase vapor en equilibrio con la mezcla solvente es no inflamable.

Se determinaron las regiones de miscibilidad total y parcial que presentan los aceites vegetales con las mezclas solventes. Estudios de equilibrio entre fases permitieron observar la estabilidad de la fase líquida (solvente) en mezclas con propano. Así, en forma experimental, se encontró que mediante el agregado de CO<sub>2</sub> se puede inducir la formación de la

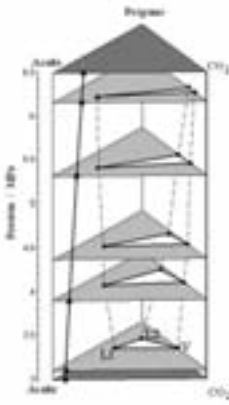
inmiscibilidad líquido – líquido y que este fenómeno puede conseguirse a temperaturas más bajas a medida que el contenido de CO<sub>2</sub> es mayor (ver figuras 4 y 5).

Las determinaciones del comportamiento de fases se realizaron en una celda de volumen variable con control independiente de temperatura, presión y composición, en mezclas ternarias. La celda permite la observación directa del contenido de la celda a través de una ventana axial y otra transversal, para determinar la condición de fases: sólo líquido, líquido + vapor, o líquido + líquido + vapor. Asimismo, la celda puede operarse para la medición de presiones de burbuja de mezclas binarias o ternarias de composición conocida haciendo variar la posición del pistón hasta que desaparezca la última burbuja de vapor. En el caso de estudiar mezclas líquido + líquido + vapor, el sistema permite el muestreo independiente de cada fase, manteniendo constante la presión y la temperatura (HEGEL et al., 2006, HEGEL et al., 2007).

**Figura 4.** Diagrama presión-temperatura del equilibrio entre fases líquido-vapor (LV-●) y líquido-líquido-vapor (L1L2V-■) del sistema aceite de girasol + propano + dióxido de carbono (HEGEL, 2007).

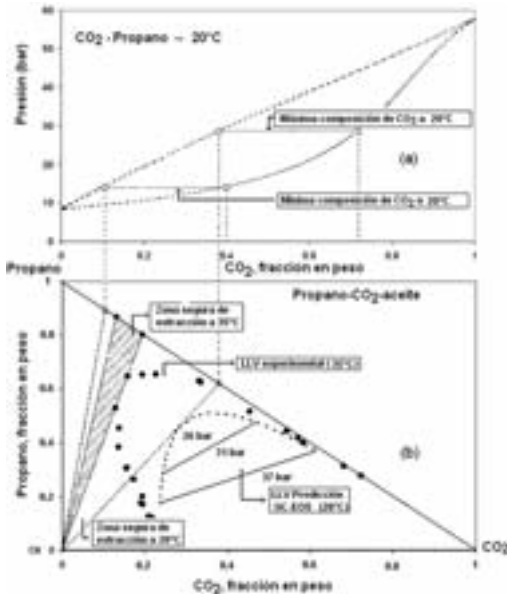


En la figura 5 puede observarse la región del comportamiento líquido-líquido-vapor a 35 °C de temperatura. Como puede verse, la composición de las dos fases más livianas correspondientes al equilibrio trifásico se van acercando a medida que la presión se incrementa, hasta que finalmente se hacen iguales a una presión cercana a la presión crítica del binario CO<sub>2</sub> + propano a 35 °C. Por otra parte, a medida que la presión disminuye las dos fases líquidas tienden a una misma composición a una presión cercana a 28 bar, hasta que finalmente la fase líquida liviana desaparece dando lugar a una única fase líquida.



**Figura 5.** Comportamiento de la región de tres fases L1L2V (●), L1: Fase líquida pesada (rica en aceite), L2: Fase líquida liviana (rica en solvente CO<sub>2</sub>+propano), V: Fase vapor. Equilibrio líquido-vapor del sistema binario dióxido de carbono-aceite de girasol (■). Datos experimentales: (HEGEL et al., 2006)

De acuerdo con la regla de las fases de Gibbs, dichos sistemas de tres componentes y tres fases presentan únicamente dos grados de libertad. En consecuencia, una vez fijada la presión y la temperatura, el sistema queda determinado totalmente. De esta forma, tal como ilustra la Figura 6, para el sistema propano + CO<sub>2</sub> + aceite de girasol, se puede diseñar la condición de fases requerida para una extracción eficiente (aceite + solvente completamente miscibles) y una fase vapor no inflamable. Los resultados del equilibrio líquido + líquido + vapor obtenidos pueden representarse observando cómo varían las composiciones de las dos fases líquidas: la oleosa (pesada) y la solvente (liviana) en función de la presión. Así, a temperatura constante, a mayor contenido de CO<sub>2</sub> se tendrá una mayor presión de operación. Asimismo se observa que a bajas presiones las composiciones de ambas fases convergen y que por debajo de 28 bar a 35 °C, se obtiene una miscibilidad completa. La información obtenida puede volcarse en un diagrama ternario que permite una mejor identificación de las zonas de completa miscibilidad e inmiscibilidad que presenta esta mezcla ternaria a una dada temperatura (Figura 6b) (HEGEL et al., 2007).



**Figura 6.** Ingeniería del equilibrio entre fases del proceso de extracción de aceites a partir de gases licuados. Sistema CO<sub>2</sub> + propano + aceite de girasol. (a) Diagrama de equilibrio de fases líquido-vapor, presión-concentración de la mezcla solvente CO<sub>2</sub> + propano (predicción de GC-EOS, Espinosa et al., 1988), (b) Diagrama triangular de equilibrio de fases LLV y LV. (●) Datos experimentales (HEGEL et al., 2006, HEGEL et al., 2007, HEGEL, 2007).

Por otra parte, una vez determinada la región de inmiscibilidad de fases de

las mezclas de aceite + propano + CO<sub>2</sub>, se establecieron las condiciones de no inflamabilidad de la fase vapor en las mezclas de CO<sub>2</sub> y propano. Estudios previos han demostrado que si la composición del CO<sub>2</sub> en la fase vapor es superior al 40% en peso, la mezcla con aire no es inflamable a presión atmosférica (ZABETAKIS, 1965). Así, la concentración de CO<sub>2</sub> que tiene que tener el solvente para satisfacer estas condiciones se muestra en un diagrama presión-composición para la mezcla de CO<sub>2</sub> + propano (ver Figura 6a). Como surge de la Figura 6, para obtener una mezcla que no sea inflamable deberá utilizarse una composición en peso de CO<sub>2</sub> del 10,5% a 20 °C y del 12,8 % de CO<sub>2</sub> a 35 °C.

En consecuencia, resulta posible determinar, con la ayuda de la Figura 6, cuál es la región factible de operación para un proceso de extracción por percolación o inmersión que utilice una mezcla solvente de vapores no inflamables y completa miscibilidad de la fase solvente con el aceite a extraer. Esta región está limitada por dos líneas de operación que se determinan de la siguiente manera, utilizando como ejemplo una mezcla de CO<sub>2</sub> y propano, cada línea de operación une el lado del diagrama ternario CO<sub>2</sub>-propano, que representa el estado inicial del solvente, con el vértice del componente puro (aceite), dando lugar a todas las mezclas posibles que se tienen en el proceso de extracción. Usando el diagrama ternario es posible trazar, desde el lado que representa las composiciones de la mezcla solvente (lado propano – CO<sub>2</sub>), una línea de operación que represente la composición mínima que tiene que tener el solvente para garantizar en la fase vapor una concentración de CO<sub>2</sub> mayor al 40%, extendida hasta el vértice del aceite. La segunda línea de operación pasa por el punto que representa al aceite y es tangente a la curva de inmiscibilidad de fases, determinando así la máxima concentración de CO<sub>2</sub> que puede tener el sistema para evitar la región de inmiscibilidad líquido-líquido, durante la extracción por percolación o inundación del lecho de semillas molidas.

En la Figura 6 puede observarse que la región de operación segura y eficiente a 20 °C es más amplia que a 35 °C. Igualmente puede fijarse un límite de máxima temperatura de extracción que admite condiciones de no inflamabilidad en 40 °C, pues a esta temperatura la región de operación factible desaparece. Por otra parte, también puede verse del diagrama que operando a 20 °C es posible operar con una mezcla solvente de 40% de CO<sub>2</sub> en la fase líquida en condiciones de completa miscibilidad, lo que garantiza la no inflamabilidad tanto de la fase líquida como de la fase vapor (HEGEL, 2007).

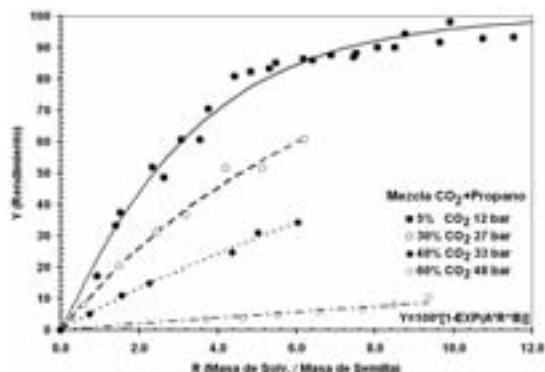
Por consiguiente, si se reduce la temperatura de extracción, la región de operación factible bajo condiciones de completa miscibilidad y no inflamabilidad se incrementa sensiblemente. La utilización del diagrama (figura 6) presenta una metodología directa para resolver el problema de Ingeniería de Fases que plantea la extracción de aceites vegetales fijos con mezclas de CO<sub>2</sub> y propano. El método desarrollado permite diseñar la condición de fases que establece una extracción mejor y más segura.

## EJEMPLOS DE OPERACIÓN

El procedimiento de la invención se aplicó a la extracción de semillas de soja molidas (contenido de aceite: 18% en peso) las que se trataron con mezclas de dióxido de carbono y propano a 25 °C de acuerdo a un procedimiento similar al descrito en la Figura 1. Se evaluó el desempeño de mezclas solventes con composiciones crecientes de dióxido de carbono, en una concentración de entre 5% y 60% de dióxido de carbono, en un rango de presiones de entre 12 a 48 bar. Para una concentración de dióxido de carbono en el solvente del 26,6% en peso, la mezcla solvente fue totalmente miscible con el aceite y se alcanzó una extracción del 60% para una relación de solvente/masa de semillas de alrededor de 6. Sin embargo, cuando la extracción se llevó a cabo con una concentración de 59,8% de CO<sub>2</sub>, la mezcla solvente no fue totalmente miscible con el aceite y para la misma relación solvente/masa de semillas la extracción fue de alrededor del 5,4 %.

La separación del aceite y del solvente luego de la extracción se llevó a cabo mediante la expansión a presión atmosférica de la mezcla de solvente y aceite. En la figura 7 se muestra el rendimiento de extracción respecto de la cantidad de solvente utilizada. Resultados similares se obtuvieron con la extracción de aceite de rosa mosqueta (*ross aff. Cynosbate fructus cum seminare*) y de aceite de girasol. En ambos casos la extracción en la zona de completa miscibilidad y fase vapor no inflamable fue considerablemente superior a la operación de extracción en condiciones de miscibilidad parcial. Por ejemplo, para semillas de rosa mosqueta, utilizando una relación de solvente/masa de semillas de alrededor de 1, se extrajo un 80% operando en la zona de miscibilidad completa. Por otra parte, cuando se operó en la zona de miscibilidad parcial en fase líquida se extrajo un 11%. En el caso de semillas de girasol la extracción fué del 66% operando con 30% de CO<sub>2</sub> (zona de miscibilidad total) y del 5,6% cuando la concentración de CO<sub>2</sub> fué del 67% en peso (zona de miscibilidad parcial).

**Figura 7.** Efecto de la proporción de dióxido de carbono en la mezcla solvente sobre el rendimiento de extracción de aceite de soja como función de la relación masa de solvente/masa de semillas, a 298,15 K. Solvente: mezclas líquidas de CO<sub>2</sub> y Propano. Presión de extracción: 12 a 48 bar. Símbolos: Datos experimentales (HEGEL et al., 2006, HEGEL et al., 2007, HEGEL, 2007). Líneas continuas: datos suavizados. Rendimiento = masa de aceite extraída / masa total de aceite.



## CONCLUSIONES

En este documento se resume todo el trabajo de ingeniería necesario para el desarrollo de un nuevo proceso para la extracción de aceites a partir de semillas oleosas, en el cual se utiliza un solvente mixto (CO<sub>2</sub> + propano) nocontaminante, en condiciones adecuadas como para que dicho solvente sea completamente miscible con el aceite a extraer en la fase líquida y como para que la fase vapor presente en el proceso no sea inflamable. De esta manera, la completa miscibilidad asegura una alta eficiencia de extracción mediante un proceso no contaminante y seguro.

**A partir de este trabajo se realizaron las siguientes publicaciones:**

**Patente en trámite (en fase final)**

*Título:* Un procedimiento para la extracción de aceites a partir de semillas oleosas.

*Número de Solicitud:* P080104414

**Publicaciones en revistas con referato**

Pablo Hegel, Guillermo Mabe, Marcelo Zabaloy, Selva Pereda and Esteban A. Brignole. Liquid-Liquid-Supercritical Fluid Equilibria for Systems Containing Carbon Dioxide, Propane, and Triglycerides. *J. Chem. Eng. Data*, (2009), 54, 2085–2089.



P. E. Hegel, M. S. Zabaloy, G. D. B. Mabe, S. Pereda, E. A. Brignole. "Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using carbon dioxide + propane solvent mixtures". *The Journal of Supercritical Fluids* (2007) 42, 318-324

P. E. Hegel, G. D. B. Mabe, S. Pereda, M. S. Zabaloy and E. A. Brignole. "Phase equilibria of near critical CO<sub>2</sub> + propane mixtures with fixed oils in the LV, LL and LLV region". *The Journal of Supercritical Fluids* (2006) 37, 316-322.

## BIBLIOGRAFÍA

BRUNNER, G. *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and The Applications to Separation Process.* (1994)

COORENS, H. G. A., Peters, C. J., DE SWAAN ARONS, J. Phase equilibria in binary mixtures of propane and tripalmitin. *Fluid Phase Equilibria* 40 (1988) 135

DE LA FUENTE, B. J. C., FORNARI, T., BRIGNOLE, E. A., BOTTINI, S. Phase equilibria in mixtures of triglycerides with low molecular weight alkanes. *Fluid Phase Equilibria.* 128 (1997) 221-227

ESPINOSA, S., BOTTINI, S. B., BRIGNOLE, E. A., Process analysis and phase equilibria for the removal of chemicals from fatty oils using near-critical fluids solvents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 2000, 3024-3033.

ESPINOSA, S., FORNARI, T., BOTTINI, S. B., BRIGNOLE, E. A. Phase equilibria in mixtures of fatty oils and derivatives with near critical fluids using the GC-EOS model. *The Journal of Supercritical Fluids.* 23 (2002) 91-102

FLORUSSE, L., FORNARI, T., BOTTINI, S., PETERS, C. Phase behavior of the binary system near critical dimethylether and tripalmitin: measurements and thermodynamic modeling. *Journal of Supercritical Fluids* 22 (2002) 1-13

FRIEDRICH, J. P., VALLEY, G. III. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Lipids from Lipids Containing Materials. United States Patent: 4.466.923-Aug. 21 (1984).

HEGEL, P. E., MABE, G. B., BRIGNOLE, E. A. Practical Aspects in the Extraction of Fixed Oil from Seeds. Florianopolis, Brasil. Abril 2004. V Encontro Brasileiro de Fluidos Supercríticos.

- HEGEL, P. E., MABE, G., PEREDA, S., ZABALOY, M., BRIGNOLE, E. Phase equilibria of near critical CO<sub>2</sub>+propane mixtures with fixed oils in the LV, LL, and LLV region. *J. of Supercritical Fluids* 37(2006) 316-322
- HEGEL, P. E., ZABALOY, M., MABE, G., PEREDA, S., BRIGNOLE, E. Phase equilibrium engineering of the extraction of oils from seeds using CO<sub>2</sub> + propane solvent mixtures. *J. of Supercritical Fluids* 42(2007) 318-324
- HEIDLAS, J., CULLY, J., VOLLBRECHT, H. R. *Process for the extraction of fats and oils*. United States Patent N° 5,405,633 (1995). SKW Trostberg Aktiengesellschaft (Trostberg, DE)
- ILLÉS, V., SZALAI, O., THEN, M., DAOOD, H., PERNECZKI, S. Extraction of hiprose fruit by supercritical CO<sub>2</sub> + propane. *Journal of Supercritical Fluids* 10 (1997) 209-218.
- KING, J. W., LIST, G. *Supercritical Fluid Technology in Oil and Lipid Chemistry*. National Center for Agricultural Utilization Research Peoria, Illinois. Champaign, Illinois. AOCS Press ISBN 0-935315-71-3
- KING, M. B., BOTT, T. R. Extraction of Natural Products. *Using Near Critical Solvents*. Chapman and Hall. First Edition. (1993).
- MARCHIARO, A., MABE, G. D., FOCO, G. M., BRIGNOLE, E. A., BOTTÍNI, S. B. Extraction of Rosa Mosqueta (*Rosa aff. Rubiginosa*) Oil with Dense Fluids, *Acta Horticulturae*, 503, 37-44 (1999).
- PEREDA, S., ROVETTO, L., BOTTINI, S. B., BRIGNOLE, E. A. Phase-Equilibrium Modeling in the Hydrogenation of Vegetable Oils and Derivatives. *JACOS – USA*, (2006) 83, 461 - 467.
- PETER, S. K., WEIDNER, E. O., ENDER, U. M., CZECH, B. A. *Process for the recovery of monoglycerides, diglycerides from a mixture containing monoglycerides, diglycerides, and triglycerides*. United States Patent 5, 110, 509 (1992)
- REVERCHON, E.; Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. of Supercritical Fluids* 10(1997)1-37
- REVERCHON, E.; DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercritical Fluids* 38(2006) 146-16
- REVERCHON, E.; KAZIUNAS, A., MARRONE, C. Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction of Hiprose Seed Oil: Experiments and Mathematical Modelling. *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 2195-2201.

TYLER, F. M. *Carbon Dioxide: The solvent for The Food and Related Industries*. Wolviston Consultancy Services Limited, England (1984)

ZABETAKIS, M. G. Flammability Characteristics of Combustible Gases and Vapors. *Bulletin 627 Bureau of Mines*. Washington U.S. Dept. of The Interior, Bureau of Mines

ZOSEL, K. *Production of fats and oil from vegetable and animal products*. United States Patent N° 4,331,695 (1982). Studiengesellschaft Kohle mbH (Mulheim, DE);

## CATEGORIA INTEGRAÇÃO

---

### Menção Honrosa

#### **Efeito de extratos de resíduos de uva (*Vitis labrusca*) na inibição da oxidação lipídica em carne de frango cozida armazenada sob refrigeração**

***Autores:***

Carmen Josefina Contreras Castillo, 52 anos, peruana, doutora em tecnologia de alimentos; Ligianne Din Shirahigue, 28 anos, brasileira, mestre em ciência e tecnologia de alimentos e Miriam Mabel Selani, 24 anos, brasileira, mestranda em ciência e tecnologia de alimentos

***Países:*** Brasil e Peru

# EFEITO DE EXTRATOS DE RESÍDUOS DE UVA (*VITIS LABRUSCA*) NA INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CARNE DE FRANGO COZIDA ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO \*

## RESUMO

Mediante a popularidade do consumo de frango, a segunda carne mais consumida no mundo, a transformação de sua carne em produtos industrializados é de suma importância para a praticidade, variedade e balanceamento do cardápio. Entretanto, a carne de frango, especialmente seus produtos industrializados, apresenta sérios problemas de processamento e de conservação. Lipídeos insaturados, fina moagem, incorporação de ar, pigmentos heme, contato com os metais e a elevação da temperatura durante o processamento contribuem para a oxidação lipídica, processo que limita a estabilidade e a vida útil dos alimentos, sendo as alterações no sabor e aroma seus sinais mais notáveis. Na tentativa de controlar este processo, as indústrias alimentícias fazem uso de antioxidantes sintéticos. No entanto, devido tanto às pesquisas que indicam possíveis efeitos tóxicos destes como ao consumidor cada vez mais exigente quanto à preferência por produtos naturais e benéficos à saúde, tem aumentado o interesse por métodos alternativos para retardar a oxidação lipídica em alimentos, tais como o uso de antioxidantes naturais. Entre estes podemos citar os resíduos da indústria vinícola, que apresentam atividade antioxidante atribuída à presença de compostos fenólicos. Além disso, o uso de semente e casca de uva tem se mostrado economicamente viável, uma vez que a matéria-prima são os subprodutos do processo de fabricação do vinho, além de ser interessante também pelo ponto de vista ambiental. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a utilização de resíduos da indústria vinícola (semente e casca de uva)

\* Agradecimentos: este estudo foi realizado no Laboratório de Qualidade de Carnes e Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade de São Paulo – ESALQ/USP, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP). Ligianne Din Shirahigue recebeu bolsa de mestrado CAPES e Miriam Mabel Selani recebeu bolsa de mestrado FAPESP.

como antioxidante natural sobre a estabilidade oxidativa da carne de frango, assim como os benefícios e desvantagens de se aplicar esses ingredientes a produtos processados.

## INTRODUÇÃO

### *Oxidação lipídica em carne de frango*

Os lipídios são biomoléculas que, juntamente com os carboidratos e as proteínas, formam o grupo de compostos mais importantes em alimentos (BOBBIO e BOBBIO, 1985). Eles estão relacionados com as propriedades sensoriais, pois afetam características como textura, suculência, sabor, aroma e cor, sendo estas as responsáveis pela aceitação do produto pelo consumidor (COSGROVE et al., 1987). A oxidação lipídica em carnes e seus derivados é, depois da deterioração microbiana, o principal processo que resulta na perda de qualidade desses alimentos (GRAY et al., 1996), pois gera produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial, tornando-os impróprios para o consumo. Além disso, provoca a degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, assim como interfere na integridade e na segurança do alimento, por meio da formação de compostos potencialmente tóxicos (SILVA et al., 1999), como o malonaldeído. Por ser muito reativo, este composto pode interagir por meio de ligações cruzadas com DNA e proteínas, promovendo aberrações cromossômicas e redução da capacidade de síntese protéica, respectivamente (MIYAKE e SHIBAMOTO, 1998).

A auto-oxidação é considerada um processo degradativo, pelo qual o oxigênio atmosférico ou dissolvido no alimento entra em contato com ácidos graxos (ALLEN e HAMILTON, 1994), provocando reações onde seus produtos iniciais propagam-se em cadeia, originando compostos indesejáveis nos alimentos. A etapa de iniciação ocorre de forma lenta e depende de um iniciador, que pode ser luz, calor, metais, oxigênio livre ou certas enzimas. O ácido graxo, em decorrência destes fatores, pode sofrer modificações conformacionais em sua molécula, que favorecem a remoção de um hidrogênio do carbono adjacente à dupla ligação, formando um radical livre. A partir de sua formação, este é capaz de combinar-se com o oxigênio, formando peróxidos e posteriormente hidroperóxidos, em que, então, a reação procede rapidamente. A terminação, última etapa do processo de oxidação, ocorre quando todo o oxigênio estiver esgotado ou

houver formação de compostos inativos. Estes compostos conferem ao alimento sabores e odores desagradáveis, característicos do ranço oxidativo.

Durante o processo de conversão do músculo em carne, mudanças bioquímicas que acompanham o metabolismo *post-mortem* promovem condições para que o processo de oxidação se instale. Algumas alterações pós-abate predisõem o músculo à oxidação, tais como atordoamento e sangria, cessação da circulação sanguínea, cessação rápida da circulação de nutrientes, aceleração do metabolismo anaeróbico, acúmulo de ácido lático, abaixamento do pH, destruição parcial do compartimento celular, ocorrência das reações em cadeias catalisadas pelo ferro e início da oxidação na membrana lipídica (MORRISSEY et al., 1998). No entanto, quando a carne é submetida a processamentos tecnológicos como corte, moagem e cozimento, a deterioração oxidativa é acelerada pela ruptura das membranas celulares do músculo, que facilita a interação entre os lipídeos e as substâncias pró-oxidantes (O'NEILL et al., 1998). A cocção provoca a desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, a perda da atividade enzimática de algumas delas, libera o ferro que atua como catalisador da oxidação, além de afetar a atividade de enzimas antioxidantes (MAGGIONI et al. 2008).

## ANTIOXIDANTES

Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*), os antioxidantes são substâncias utilizadas para preservar e estender a vida útil de alimentos que possuem lipídeos oxidáveis, retardando as reações de oxidação. Estas substâncias podem ser provenientes de fontes sintéticas ou compostos isolados naturalmente dos alimentos (ADEGOKE et al., 1998).

De acordo com Rafecas et al. (1998), para ser empregado em alimentos, o antioxidante deve ser efetivo em baixa concentração (0,01% ou menos), atendendo aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato; não conferir odor ou sabor estranho ao produto; ser efetivo durante o período de estocagem do produto; ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento. Além desses fatores, devem-se considerar também a legislação vigente, o custo e a preferência do consumidor por antioxidantes naturais.

O uso destes compostos deve ser feito antes ou durante o período de indução, uma vez que, iniciado o processo de rancificação oxidativa, não é

possível parar sua evolução pela adoção de antioxidantes. Assim, a adição desses compostos não é capaz de corrigir carnes onde o ranço já se estabeleceu, dada a irreversibilidade do processo. Do mesmo modo, o antioxidante não mascara as propriedades organolépticas alteradas pela rancificação (MAGGIONI et al., 2008).

Os antioxidantes sintéticos mais comumente usados são BHA (Butil-hidroxianisol), BHT (Butil-hidroxi-tolueno), TBHQ (Butil-hidroquinona terciária) e PG (propil galato). Várias regulamentações existem, em diferentes países, para o controle da quantidade destes antioxidantes em alimentos. Porém, há restrições para o uso dos mesmos, pois há suspeitas de serem carcinogênicos (MADVHAVI e SALUNKHE, 1995).

Atualmente, a utilização de antioxidantes em produtos alimentícios é controlada pela legislação dos países ou por padrões internacionais. Deste modo, apenas alguns compostos reconhecidos como seguros pelas organizações internacionais como a *Food and Agriculture Organization* (FAO), *Joint Expert Committee* (JECFA) e a *World Health Organi* (WHO) são permitidos para o uso em alimentos (SOARES, 2002). No Brasil, o uso destes antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde, que limita 200 mg.kg<sup>-1</sup> para BHA e TBHQ e 100 mg.g<sup>-1</sup> para BHT (BRASIL, 1998).

Os aspectos toxicológicos dos antioxidantes têm sido uma das áreas de maior controvérsia nos debates sobre a segurança dos aditivos alimentares. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo seu consumo, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos (SOARES, 2002).

## RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VINÍCOLA

Em 2007, a produção mundial de uva chegou a aproximadamente 67 milhões de toneladas, sendo considerada a fruta de maior produção mundial. Em relação à produção mundial de vinho, esta foi de aproximadamente 26,3 toneladas, sendo que entre os vinte maiores produtores estão a Argentina (5º lugar), o Chile (10º lugar) e o Brasil (19º lugar), indicando o crescimento e a expressividade da América do Sul nesse setor (FAO, 2007). Devido à grande importância da produção vitivinícola



nesses países, em 1996 foi elaborado o Regulamento Vitivinícola do Mercosul, que estabelece padrões de qualidade a serem adotados para a produção, a comercialização e a distribuição de vinhos.

Do volume total de uva produzida no mundo em 2007, 39,2% foram destinados à elaboração de vinhos, gerando resíduos como sementes, cascas e engace (FAO, 2007). Grandes quantidades de resíduos líquidos e sólidos são produzidas anualmente pela indústria de processamento de alimentos. Estes materiais contêm resíduos biodegradáveis e sua eliminação cria sérios problemas ambientais. As quantidades de resíduos gerados durante o processamento podem ser significativamente reduzidas por meio da utilização de métodos novos ou modificados, ou mediante tratamento e reutilização (MAKRIS et al., 2006).

Os resíduos da indústria vinícola, que consistem principalmente em subprodutos sólidos, incluindo engace e bagaço, correspondem a aproximadamente 30% do volume total das uvas utilizadas para a produção de vinho. Todos esses subprodutos podem apresentar uma quantidade considerável de componentes fenólicos (GONZÁLES-PARAMÁS et al., 2004), dependendo do tipo de uva (branca ou tinta), da parte do tecido (casca, semente, etc), assim como das condições do processo.

Nos últimos anos, não só os subprodutos da produção de vinhos, mas também uma série de outros resíduos agrícolas de origem vegetal, tem atraído considerável atenção como potenciais fontes de fenólicos bioativos, que podem ser utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentar. No entanto, em muitos casos, há poucos estudos sobre a viabilidade do aproveitamento desses resíduos.

Estudos em relação aos subprodutos da vinificação estão focados principalmente na composição polifenólica de sementes, ricas em flavanóis (GUENDEZ et al., 2005), e do bagaço, composto de sementes e cascas, e também avaliado como uma fonte potencial de polifenóis antioxidantes (PINELO et al., 2005).

Dessa forma, o presente estudo teve o intuito de avaliar os resíduos da uva como opção de substituição aos aditivos sintéticos, o que pode levar à: redução do impacto ao meio ambiente, à maior taxa de aproveitamento dos alimentos, à diminuição nas perdas, além de agregar valor ao resíduo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção dos extratos de uva*

O material cru consiste em resíduos de semente e casca de uva das variedades Niágara e Isabel (*Vitis labrusca*), proveniente da indústria de vinho COOPERVIL (Videira, SC, Brazil). Os resíduos foram desidratados em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C, por 24 horas, moídas e armazenadas sob congelamento (-18 °C). Vinte gramas de resíduos desidratados foram macerados com 100 ml de etanol 80% (v/v) em temperatura ambiente, e protegidos da luz por 48 horas, sob constante agitação mecânica. O sobrenadante foi filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotativo a 65°C até a evaporação total dos solventes. Os resíduos foram dissolvidos em água até um volume final de 50 ml. Os extratos obtidos, EUI (Extrato de Uva Isabel) e EUN (Extrato de Uva Niágara), foram armazenados sob refrigeração (4 to 8 °C).

### CONTEÚDO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) dos EUI e EUN foi determinado pelo método proposto por Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventos (1999). As soluções dos extratos (0.1 ml) foram misturados com 5 ml de água destilada e 0.5 mL de reagente Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos de reação, 1.5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%) e 2.9 ml de água destilada foram adicionados. A absorbância foi medida em espectrofotometria (Shimadzu UV-1240, Tokyo, Japan) a 765 nm depois de duas horas de incubação no escuro e à temperatura ambiente. CFT foi expresso em equivalente de ácido gálico por mililitro (mg GA.ml<sup>-1</sup>) ou em equivalente de ácido gálico por 100 g (db) de resíduo de uva.

### CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa dos EUN e EUI foram realizadas de acordo com o método descrito por Alencar (2005), com modificações. Cinco microlitros de cada extrato na concentração de 5% foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo fotodiodos a 210 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido ortofosfórico (0,1%) (solvente A) e metanol/ácido ortofosfórico (0,1%) (solvente B),

com vazão constante de 1 ml/min. O gradiente foi isocrático com 20%. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 °C e os cromatogramas foram processados utilizando “software” específico. Foram utilizados os seguintes padrões autênticos de flavonóides (Sigma): catequina, epicatequina *green tea*, epicatequina galato, epigallocatequina *green tea* e epigallocatequina galato.

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE RADICAL DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Mensor et al. (2001). A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 ml da amostra de extrato, 3 ml de etanol P.A. e 0,3 ml da solução do radical DPPH 0,5 mM em etanol. Para cada amostra foi realizado, em paralelo, um teste branco com adição de etanol em substituição à solução de DPPH 0,5 mM, para descontar uma possível descoloração que pudesse influenciar na interpretação dos resultados. Os extratos foram avaliados na concentração de 200 e 300 µg/ml e as substâncias de referência (BHT e  $\alpha$ -tocoferol) na concentração final de 90 µg/ml. Também foram realizados testes dos extratos combinados entre si e com o antioxidante sintético BHT: Isabel + Niágara (300 µg/ml); Isabel + BHT (300 µg/ml) e Niágara + BHT (300 µg/ml).

A atividade antirradical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada por meio da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH – extratos e padrões após 40 minutos de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol), de acordo com a fórmula:

% Atividade antioxidante =  $100 - ((A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) * 100) / A_{\text{controle}}$  em que:

$A_{\text{amostra}}$  = absorbância da solução DPPH (amostras)

$A_{\text{branco}}$  = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH

$A_{\text{controle}}$  = absorbância da solução referência de DPPH (etanol).

#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O experimento foi realizado de acordo com o método de Emmons et al. (1999) com algumas modificações. Foram pesados 10 mg de  $\beta$ -caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 ml de clorofórmio. Após isto, foi retirada

uma alíquota de 3 ml da solução clorofórmio-beta-caroteno e adicionada 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em 100 ml de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 ml da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50 µL de EAUN e EAUI. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos, durante 2 horas com incubação das amostras em banho-maria a 50 °C, para reação de oxidação. A amostra controle continha 50 µL de solvente. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 minutos de incubação, usando a seguinte equação:

$$AA = (R_{\text{controle}} - R_{\text{amostra}}) / R_{\text{controle}} \times 100$$

#### PREPARO E COZIMENTO DAS AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO

Amostras de coxa e sobrecoxa de frango foram obtidas de aves abatidas com aproximadamente 42 dias de idade, sob inspeção do SIF, de abatedouro próximo ao município de Piracicaba, em São Paulo. Essas aves foram abatidas, depenadas, evisceradas e resfriadas. As carcaças foram separadas em partes e resfriadas em câmara fria. Posteriormente, as amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo para processo e embalagem. Para cada tratamento, aproximadamente 1000 g de coxa e sobrecoxa de frango sem osso e sem pele foram triturados em um triturador (HOBART 4B22-2), na proporção 1:1. Posteriormente, foram adicionadas quatro diferentes concentrações de cada extrato (EUN e EUI). Também foram preparadas amostras com BHT, de acordo com a Portaria nº 1.004 da Secretaria de Vigilância Sanitária, sendo 0,01 g.100 g<sup>-1</sup> de carne dissolvido em óleo vegetal bruto até obtenção de um volume final de 5 mL. O tratamento denominado controle (CNTL) não teve adição de qualquer tipo de antioxidante (Tabela 1). O cloreto de sódio (1%) foi adicionado em todos os tratamentos. Para cada tratamento, a carne triturada foi homogeneizada em um *cutter*. A partir dessa mistura foram pesadas 40 porções de 25 g de carne, moldadas na forma de bolinhos e armazenadas a 0 °C por aproximadamente 1 hora, totalizando 40 amostras. Após o armazenamento, as amostras foram cozidas em uma chapa elétrica tipo *grill*, onde as temperaturas das porções se mantiveram em torno de 72 °C por 4 a 5 minutos. Depois de cozidas as amostras foram mantidas a temperatura

de aproximadamente 28 °C em um ambiente limpo e higiênico e, posteriormente, acondicionadas em bandejas de poliestireno recobertas com filme de policloreto de vinila (PVC), caracterizando a embalagem aeróbica. As amostras foram armazenadas sob refrigeração (4±1 °C), por até 14 dias. Este procedimento foi realizado em triplicata.

**Tabela 1.** Identificação de cada tratamento

<b>Tratamento</b>	<b>Identificação</b>	<b>Concentração do extrato (ppm)</b>
<b>CNTL</b>	<b>Controle – sem antioxidante</b>	
BHT	BHT 0,01 g.100 g <sup>-1</sup> de carne	
EUI 10	Extrato uva Isabel 10 mg CFT	10
EUI 20	Extrato uva Isabel 20 mg CFT	20
EUI 40	Extrato uva Isabel 40 mg CFT	40
EUI 60	Extrato uva Isabel 60 mg CFT	60
EUN 10	Extrato uva Niágara 10 mg CFT	10
EUN 20	Extrato uva Niágara 20 mg CFT	20
EUN 40	Extrato uva Niágara 40 mg CFT	40
EUN 60	Extrato uva Niágara 60 mg CFT	60

#### DETERMINAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

A determinação do valor das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada nos tempos 0, 3, 7 e 14 dias, armazenadas sob refrigeração (4±1 °C). As análises foram feitas em duplicata, em todos os pontos de análises, segundo metodologia descrita por Sorensen e Jorgensen (1996).

Foi utilizado o padrão 1,1'3,3'' tetraetoxipropano (TEP), cuja hidrólise ácida gera malonaldeído na proporção de 1mol:1mol, para obtenção de uma curva padrão, composta por 7 pontos de diferentes concentrações (0; 0,6; 0,9; 1,2; 1,4; 2,0 e 3,0 mol.L<sup>-1</sup> de TEP).

Os aldeídos foram extraídos fazendo-se um extrato ácido-aquoso homogeneizado em Ultra-Turrax com 5g de amostra e 15 ml de ácido tricloroacético (TCA) diluído em Propil Galato (PG) e um agente quelante, sal sódico EDTA, com a finalidade de evitar a formação errônea de malonaldeído ou outras substâncias reativas ao TBA durante a mistura e filtração da amostra. Esse extrato filtrado reagiu com a solução de TBA sob aquecimento (40 minutos a 95 °C em banho-maria) para a formação do complexo colorido medido em espectrofotômetro Shimadzu, o modelo UV-Vis mini 1240, com absorbância máxima em 532 e 600 nm.

Para os cálculos da curva padrão, assume-se que a concentração e a absorvância são plotados no eixo x e y, respectivamente, determinando a equação da reta de uma regressão linear, a partir da qual se obtém a concentração da amostra. Os resultados são expressos em “valor de TBARS”, definido como mg malonaldeído por kg de amostra.

## AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS, utilizando procedimento MIXED, com análise de variância pela metodologia dos quadrados mínimos.

Para os testes *in vitro* nos extratos de uva foi realizada análise de variância (ANOVA) e aplicado teste de *Tukey* para observar as diferenças significativas entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).

Para o ensaio de determinação da concentração dos extratos a serem aplicados nas amostras de carne de frango processada, e posterior avaliação da estabilidade oxidativa, foi realizado um delineamento em blocos casualizados, com três repetições para cada tratamento. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ( $p < 0,05$ ), considerando um modelo com os efeitos fixos de bloco, tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo de armazenamento. Devido à estrutura de medidas repetidas, utilizou-se uma análise de correlação do tipo Huynh-Feldt entre estas medidas, ao longo do tempo de armazenamento. Adicionalmente, utilizaram-se as análises de regressões simples e/ou múltipla, para os efeitos quantitativos, quando estes foram significativos ( $p < 0,05$ ) na ANOVA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Conteúdo de compostos fenólicos totais*

Nos resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos analisados não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as duas variedades estudadas. Considerando o volume dos extratos e a quantidade de material vegetal extraído, verificou-se que os resíduos de semente e da casca das uvas Isabel e Niágara apresentaram, respectivamente, teores de CFT de 430,55 e 522,22 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> (Tabela 2). Estudos realizados por Alonso et al. (1991), avaliando o efeito de várias misturas de etanol/água para a extração de compostos fenólicos em sementes uva,

observaram que a extração mais eficiente ocorre quando o conteúdo de etanol é maior. Em outro estudo, Kallithraka et al. (1995) verificaram que o metanol é o melhor solvente para a extração dos compostos fenólicos, porém este não é aconselhável para extratos a serem aplicados em alimentos. A eficiência da extração e a determinação da atividade antioxidante dos extratos dependem do tipo de solvente, devido às diferenças existentes nos potenciais antioxidantes e à polaridade dos compostos (YANISHLIEVA, 1997). O etanol e a água são os solventes mais empregados para a extração de antioxidantes, por razões de não toxicidade e de abundância, respectivamente. No presente estudo, a utilização do solvente etanol 80% mostrou ser eficiente na extração destes compostos, sendo uma opção de baixo custo. Cataneo et al. (2008), usando acetona 80% como solvente, encontraram quantidades de compostos fenólicos que variavam de 370,16 a 420,61 mg GAE.100 g<sup>-1</sup> em resíduos de uva Pinot (*Vitis vinifera*) e 109,64 a 207,8 mg GAE.100g<sup>-1</sup> em resíduos de Couderc (*Vitis labrusca*). Por outro lado, em resíduos de uva (*Vitis vinifera*) das variedades *Tannat* e *Ancelota*, extraídos com acetona 80%, foram determinados, respectivamente, teores de 690 e 765 mg GAE .100g<sup>-1</sup> (ROCKENBACH et al., 2008).

**Tabela 2.** Conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) de extratos de resíduos de uva Isabel (EUI) e Niágara (EUN) expressos em equivalente de ácido gálico (GAE)  
**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA  
 EM FASE REVERSA (CLAE-FR)**

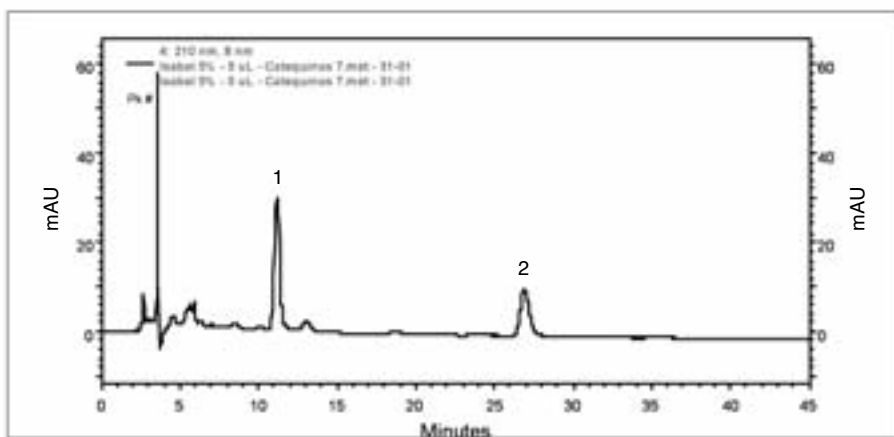
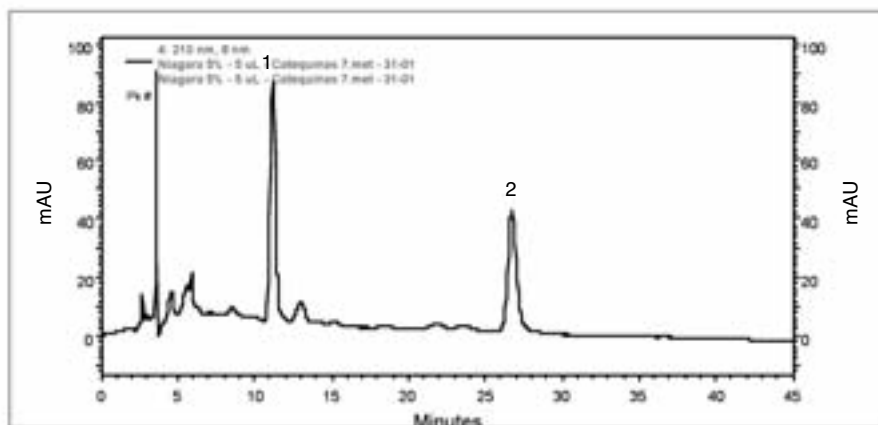
<b>Amostras</b>	<b>Resíduo de uva (semente e casca) CFT (MG GAE.100 g<sup>-1</sup> peso seco)</b>
Isabel	430.55
Niagara	522.22
Pr>F	

Os cromatogramas dos extratos de uva Niágara (EUN) e uva Isabel (EUI) estão demonstrados nas figuras a seguir. Nos cromatogramas de CLAE dos extratos de semente e de casca de uvas avaliados a 210 nm, pode-se observar, para uva Niágara, pico a 11,2 minutos, catequina (1) e pico a 26,7 minutos, epicatequina *green tea* (2).

Já para a uva Isabel, pode-se observar no cromatograma a presença de pico a 12,5 minutos, catequina (1) e pico a 29,3 minutos, epicatequina *green tea* (2). Estes picos também foram observados nos estudos de Liang et al. (2004)

por meio de CLAE para amostras de extrato de semente de uva extraídos com etanol 40%, analisados a 272 nm. Os autores observaram cromatograma que apresentava picos em 35,42 minutos, catequina e em 42,07 minutos para epicatequina, corroborando com os resultados encontrados neste experimento, identificando os padrões catequina e epicatequina como picos majoritários. Segundo Bakkalbasi, Yemis e Aslanova (2005), cromatograma típico de extrato aquoso de semente de uva em CLAE apresenta três picos majoritários, ácido gálico, (+) catequina e (-) epicatequina.

**Figura 1.** Cromatogramas de amostras de extratos de semente e casca de uva injetadas na concentração de 5% (a) amostra de uva Niágara; 1, Catequina; 2, Epicatequina *green tea*. (b) amostra de uva Isabel; 1, Catequina; 2, Epicatequina *green tea*.





As concentrações de catequina e epicatequina em extratos de semente e casca de uva estão apresentadas na Tabela 3. O extrato de semente e de casca de uva Niágara apresentou maior valor de catequina e epicatequina ( $P < 0,05$ ). Não foi encontrada na literatura a quantificação de compostos fenólicos de uvas Niágara e Isabel extraídos pelo procedimento deste experimento, para efeito de comparação.

Estudos realizados por Dani et al. (2007) avaliaram a concentração de catequina e epicatequina em suco de uva da variedade Niágara e encontraram valores de 0,739 e 0,595 mg.100g<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores foram menores dos encontrados neste experimento, mostrando que o procedimento de extração possibilitou quantificar valores consideráveis de compostos fenólicos (catequina e epicatequina).

**Tabela 3.** Teores de catequina e epicatequina em extratos de semente e casca de uva.

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. (C) Catequina; (EC) Epicatequina *green tea*.

Amostra	Concentração (mg.100g <sup>-1</sup> )	
	C	EC
Extrato uva Isabel	4,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,43 ± 0,03 <sup>b</sup>
Extrato de uva Niágara	12,57 ± 0,31 <sup>a</sup>	20,63 ± 0,64 <sup>a</sup>
Pr>F	0,0007	0,024

Estudos de Kahkonen et al. (1999) e Shahidi et al. (2003) relataram que diferenças na atividade antioxidante de extratos de plantas provém das diferentes estruturas dos ácidos fenólicos e flavonóides presentes nestas plantas. A atividade antioxidante destes ácidos fenólicos e seus derivados de ésteres depende do número de grupos hidroxila das moléculas. As altas atividades antioxidantes em extratos de semente de uva podem ser devido à alta quantidade de epicatequina e catequina em extratos de semente de uva (RABABAH; HETTIARACHCHY; HORAX, 2004). Isto explica a atividade antioxidante encontrada pelos extratos analisados neste experimento, pois os extratos de semente e casca de uva das variedades Isabel e Niágara apresentam quantidades consideráveis destes compostos catequina e epicatequina (Tabela 3). Estes resultados estão de acordo com os estudos de Peng et al. (2001), que relataram que o conteúdo do tipo polimérico e manomérico (catequina e epicatequina) em sementes de uva podem ser responsáveis por uma maior atividade antioxidante.

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE SEMENTE E CASCA DE UVA

Os resultados obtidos para o sequestro do radical DPPH para as substâncias referenciais de elevada atividade antioxidante como  $\alpha$ -tocoferol e BHT (90  $\mu\text{g/ml}$ ) e para os extratos de uva Isabel (EUI) e uva Niágara (EUN), analisados nas concentrações de 100, 200 e 300  $\mu\text{g/ml}$ , estão demonstrados na Tabela 4. As concentrações testadas foram baseadas em pesquisa de alguns trabalhos.

Conforme demonstrado na Tabela 4, o extrato de uva Niágara apresentou maior atividade de sequestro do radical DPPH (média =  $92,72 \pm 1,75\%$ ), seguido pela uva Isabel (média= $89,09 \pm 0,92\%$ ), ambos analisados na concentração de 300  $\mu\text{g/ml}$ . Estes valores não foram significativamente diferentes ( $P>0,05$ ) do padrão  $\alpha$ -tocoferol ( $95,40 \pm 1,39$ ). Para a menor concentração testada (100  $\mu\text{g/ml}$ ) foram observados baixos valores de atividade antioxidante; O extrato de uva Niágara apresentou uma atividade antioxidante de  $44,47 \pm 9,19\%$ , seguido pela uva Isabel, com  $47,29 \pm 5,79\%$ . Não foram encontrados trabalhos que relatem a atividade antioxidante dos extratos de uva das variedades Niagara e Isabel (*Vitis labrusca*), para efeito de comparação. Porém, os autores Baydar, Özkan e Yasar (2007) avaliaram a atividade de sequestro do radical DPPH dos extratos de uva *Vitis vinífera* em diferentes concentrações, extraídos com solvente acetona:água:ácido acético (90:9,5:0,5) e observaram valores mais altos para as concentrações menores, como 90,2%, 91,1% e 92,6%, para as concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Esta diferença da atividade antioxidante pode estar associada ao solvente utilizado para extração dos compostos fenólicos nas amostras, onde pode ter ocorrido uma melhor extração com os solventes utilizados por estes autores, ou até mesmo pelas espécies serem diferentes, onde a *Vitis vinífera* pode conter maior concentração destes compostos, possuindo maior atividade antioxidante.

**Tabela 4.** Médias da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH dos extratos EUI e EUN e as substâncias de referências  $\alpha$ -tocoferol e BHT (n=24)

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tratamentos	Atividade antioxidante (%)
EUI 100 $\mu$ g/ml	47,29 $\pm$ 5,79 <sup>c</sup>
EUI 200 $\mu$ g/ml	75,65 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup>
EUI 300 $\mu$ g/ml	89,09 $\pm$ 0,92 <sup>ab</sup>
EUN 100 $\mu$ g/ml	44,47 $\pm$ 9,19 <sup>c</sup>
EUN 200 $\mu$ g/ml	83,36 $\pm$ 4,98 <sup>ab</sup>
EUN 300 $\mu$ g/ml	92,72 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>
$\alpha$ -tocoferol 90 $\mu$ g/ml	95,40 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>
BHT 90 $\mu$ g/ml	14,16 $\pm$ 9,29 <sup>d</sup>
Pr>F	0,0000

Os resultados obtidos para o sequestro do radical DPPH para as substâncias referências de elevada atividade antioxidante como  $\alpha$ -tocoferol e BHT (90  $\mu$ g/ml) e para as combinações dos extratos de uva Isabel (EUI), de uva Niágara (EUN) e os extratos combinados com antioxidante sintético BHT, analisados na concentração de 300  $\mu$ g/ml, estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Médias da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH das combinações dos extratos EUI e EUN, combinações dos extratos com BHT e as substâncias de referências  $\alpha$ -tocoferol e BHT

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05) pelo teste de Tukey.

Tratamentos	Atividade antioxidante (%)
EUI + EUN (300 $\mu$ g/ml)	63,08 $\pm$ 16,21 <sup>bc</sup>
EUI + BHT (300 $\mu$ g/ml)	39,99 $\pm$ 3,71 <sup>cd</sup>
EUN + BHT (300 $\mu$ g/ml)	86,93 $\pm$ 11,75 <sup>ab</sup>
$\alpha$ -tocoferol 90 $\mu$ g/ml	94,53 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
BHT 90 $\mu$ g/ml	32,48 $\pm$ 0,00 <sup>d</sup>
Pr>F	0,000

Em relação aos resultados da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH, os tratamentos tiveram efeitos significativos (P<0,05) sobre os níveis de AA%, sendo que o padrão  $\alpha$ -tocoferol e a combinação EUN + BHT (300  $\mu$ g/ml) apresentaram os maiores valores

médios de atividade antioxidante (AA%), e os menores níveis médios foram observados pela combinação EUI + BHT (300 µg/ml). Não foram encontrados estudos relacionados à atividade antioxidante da combinação dos extratos de semente e de casca de uva das variedades Isabel e Niágara e a combinação dos extratos com antioxidante sintético BHT, para efeito de comparação.

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante dos extratos EUI e EUN, avaliados nas concentrações de 200 e 300 µg/ml, e as substâncias referências  $\alpha$ -tocoferol e BHT (90 µg/ml), pelo método do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. Na avaliação do potencial antioxidante por este método, o  $\beta$ -caroteno sofre ataque dos radicais livres do ácido linoléico, e assim perde suas duplas ligações e conseqüentemente ocorre a descoloração, tendo como principal vantagem a efetiva oxidação do sistema (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

A Tabela 6 demonstra que o extrato de uva Niágara, nas concentrações de 200 e 300 g/ml, apresentou maiores valores de atividade antioxidante, 68,43 e 56,13%, respectivamente, porém não foram encontrados trabalhos que relatem a atividade antioxidante dos extratos de uva das variedades Niagara e Isabel (*Vitis labrusca*) por este método, para efeito de comparação. O extrato de uva Isabel diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) do extrato de uva Niagara em ambas as concentrações analisadas, mostrando não ter um valor alto para atividade antioxidante por este método, indicando que a uva da variedade Niágara tem melhor atividade antioxidante. Isto pode ser explicado devido à maior quantidade de compostos fenólicos (catequina e epicatequina) encontrada nas análises anteriormente realizadas.

Comparando a atividade antioxidante destas variedades, nas diferentes concentrações com os padrões BHT e  $\alpha$ -tocoferol (substâncias de referência), observou-se que apenas a variedade Niágara, na concentração de 300 µg/ml, mostrou não ter diferença significativa ( $P < 0,05$ ), sendo possível afirmar que esta variedade apresenta boa atividade antioxidante comparada aos padrões.

**Tabela 6.** Atividade antioxidante na inibição da peroxidação lipídica dos extratos EUI e EUN e as substâncias de referência  $\alpha$ -tocoferol, BHT

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Tratamentos ( $\mu\text{g/ml}$ )		Atividade antioxidante (%)
Extrato uva Isabel	200	$35,94 \pm 16,79^{\text{cd}}$
	300	$32,49 \pm 8,99^{\text{d}}$
Extrato uva Niágara	200	$56,13 \pm 0,35^{\text{bc}}$
	300	$68,53 \pm 3,97^{\text{ab}}$
$\alpha$ -tocoferol	90	$89,63 \pm 5,18^{\text{a}}$
BHT	90	$93,81 \pm 5,05^{\text{a}}$
Pr>F	-	0,0000

Nos seus estudos, Negro, Tommasi e Miceli (2003) pesquisaram a atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico de diferentes concentrações de extratos de uvas (*Vitis viniferas*), extraídos com etanol 80% acidificado com 0,5% 0.1N HCl. Estes extratos foram obtidos dos componentes da uva (semente e casca). Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, e isto aumentou conforme houve crescimento da concentração de substâncias fenólicas até atingir a concentração mais alta de 160  $\mu\text{g/ml}$ . Testando os extratos na concentração de 160  $\mu\text{g/ml}$ , eles obtiveram valores altos de atividade antioxidante, nos limites de  $86,33 \pm 0,64\%$  para os extratos de casca e  $89,97 \pm 1,57\%$  para os extratos de semente de uva. Estes resultados foram melhores que os obtidos pelo presente estudo, pois foram encontradas altas atividades antioxidantes em concentrações menores, o que pode estar associado ao tipo de uva testado e às formas pelas quais os compostos fenólicos foram extraídos, com uso de diferentes solventes.

O mecanismo da descoloração do  $\beta$ -caroteno é um fenômeno de um radical livre que resulta em um hidroperóxido formado do ácido linoléico. No sistema modelo, o  $\beta$ -caroteno sofre a descoloração rápida na ausência de um antioxidante. Como as moléculas do  $\beta$ -caroteno perdem as duplas ligações pela oxidação, o composto perde características, como sua cor laranja, que pode ser observada espectrofotometricamente. A presença de diferentes extratos antioxidantes pode impedir a descoloração do  $\beta$ -caroteno, neutralizando o radical livre do ácido linoléico e outros radicais livres formados no sistema (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001).

Este mecanismo foi observado nas análises realizadas neste experimento, onde a adição dos extratos antioxidantes de semente e casca de uva impediu a descoloração do  $\beta$ -caroteno, com a neutralização do radical livre do ácido linoléico e de outros formados no sistema.

#### DETERMINAÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

Os valores de TBARS para carne de frango cozida, embalada em condição aeróbica (PVC) e armazenada a  $4 \pm 1$  °C por até 14 dias, foi significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) para os fatores 'tratamento' e 'tempo de armazenamento' e para a interação entre estes (Tabela 7). As médias dos valores de TBARS para todos os tratamentos mostraram-se significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). As concentrações mais altas de extratos adicionados apresentaram valores de TBARS mais baixos, sendo estes 3.88 e 3.90 mg de malonaldeído.kg<sup>-1</sup> de carne para EUN60 e EUI60, respectivamente. Estes resultados demonstram o efeito antioxidante dos extratos de casca e de semente de uva, diminuindo o valor de TBARS. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores (LAI et al., 1991; MIELNIK et al., 2003; MIELNIK et al., 2006), que verificaram uma relação linear entre a quantidade de um antioxidante (extrato de alecrim e extrato de semente de uva) e os valores de TBARS, indicando que o efeito depende da concentração dos antioxidantes, como foi observado no presente estudo.

Observa-se nas figuras 2 e 3 que, ao longo do tempo de armazenamento, houve um aumento nos valores de TBARS, porém estes valores foram superiores nos tratamentos CNTL, 10 e 20 mg GAE de extratos adicionados, em que as baixas concentrações dos extratos apresentaram valores de TBARS semelhantes ao controle (sem adição de extrato). Isto difere do observado nos estudos de Mielnik et al. (2006), no qual a utilização de concentrações baixas do extrato de semente de uva preveniu o desenvolvimento da oxidação lipídica na carne de peru, porém de forma lenta. Já para os demais tratamentos, BHT, 40 e 60 ppm de GAE de extratos de uva, os valores de TBARS foram menores ( $p < 0,05$ ), indicando uma maior eficiência dos extratos quando em concentrações maiores.

O tempo de armazenamento teve influência significativa ( $p < 0,05$ ) no desenvolvimento da oxidação lipídica na carne de frango processada, o que resultou em um aumento nos valores de TBARS durante o armazenamento

(Tabela 7). O cozimento altera os componentes químicos da carne devido à incorporação do meio de cocção e à perda de nutrientes e água para o mesmo, possibilitando que as reações de deterioração se desencadeassem mais facilmente com os dias de armazenamento.

Esses processos mecânicos proporcionam uma aceleração da oxidação lipídica, já que alteram as estruturas da carne, e aumentam a superfície de contato com agentes deteriorantes. Estes resultados também foram observados por Mielnik et al. (2006) que, ao longo do período de armazenamento, observaram aumento intensivo nos valores de TBARS, em amostras de carne de peru.

A interação entre a concentração de extrato de uva e o tempo de armazenamento acentuou a importância da quantidade de antioxidante acrescentado à carne antes do cozimento. Os valores mais altos de TBARS, medidos diretamente após o cozimento (Figura 2 e 3), foram obtidos nas amostras de carne de frango sem antioxidante (CNTL) ( $2.53 \text{ mg malonaldeído.kg}^{-1}$ ). Os extratos de uva mostraram um efeito protetor significativo em relação à oxidação lipídica, que ocorre tanto durante o processo de cozimento como no armazenamento refrigerado. As altas concentrações equivalentes a 60 mg de GAE dos extratos de uva (EUI60 e EUN60) retardaram o processo de oxidação mais eficientemente, mantendo os valores de TBARS durante o armazenamento de 7 dias abaixo de  $4.12 \text{ mg malonaldeído.kg}^{-1}$  carne (Tabela 7).

A rancidez oxidativa medida por TBARS para todas as amostras aumentaram durante o armazenamento, porém em proporções diferentes entre os diversos tratamentos. Diversos estudos sobre a atividade antioxidante dos extratos de semente de uva em carnes estão descritos (AHN; GRÜN; FERNANDO, 2002; ROJAS; BREWER, 2007; BRANNAN; MAH, 2007; BRANNAN, 2008). Estes autores afirmam que, mesmo em diferentes concentrações, os extratos de semente de uva apresentaram eficiente atividade na inibição da oxidação lipídica em vários tipos de carnes e se apresentam como potencial antioxidante natural em carnes cruas e cozidas. Os resultados desse estudo, principalmente para as concentrações de 40 e 60 mg de compostos fenólicos totais (GAE), corroboram as observações acima e comprovam o efeito positivo dos extratos de uva na estabilidade oxidativa dos produtos cárneos cozidos.

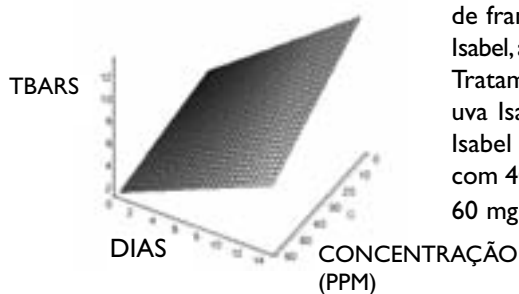
**Tabela 7.** Resultados das análises de variância para valores de TBARS medidos em carne de frango cozida, submetida à aplicação de diferentes tratamentos antioxidantes e armazenada a  $4\pm 1$  °C até os 14 dias em embalagem aeróbica

Fonte de variação	Fator	TBARS (mg.kg <sup>-1</sup> ) valores médios	Nível de significância
Tratamentos (A)	CNTL	6.41	0.0001*
	BHT	4.68	
	EUI10	7.14	
	EUI20	6.18	
	EUI40	4.61	
	EUI60	3.90	
	EUN10	6.20	
	EUN 20	6.12	
	EUN40	4.79	
	EUN60	3.88	
Tempo de armazenamento – dias (B)	0	1.95	0.0001*
	3	4.16	
	7	5.98	
	14	9.49	
Tratamento x tempo de armazenamento em dias (A x B)	CNTL x 0	2.53	0.0116*
	CNTL x 3	5.68	
	CNTL x 7	7.23	
	CNTL x 14	10.21	
	BHT x 0	1.65	
	BHT x 3	3.59	
	BHT x 7	5.46	
	BHT x 14	8.03	
	EUI10 x 0	2.41	
	EUI10 x 3	5.63	
	EUI10 x 7	8.13	
	EUI10 x 14	12.39	
	EUI 20 x 0	2.09	
	EUI20 x 3	5.05	
	EUI20 x 7	7.19	
	EUI20 x 14	10.40	
	EUI40 x 0	1.70	
	EUI40 x 3	2.73	
	EUI40 x 7	5.25	
	EUI40 x 14	8.74	
	EUI60 x 0	1.53	
	EUI60 x 3	2.57	
	EUI60 x 7	4.11	
	EUI60 x 14	7.24	
EUN10 x 0	2.12		
EUN10 x 3	5.16		

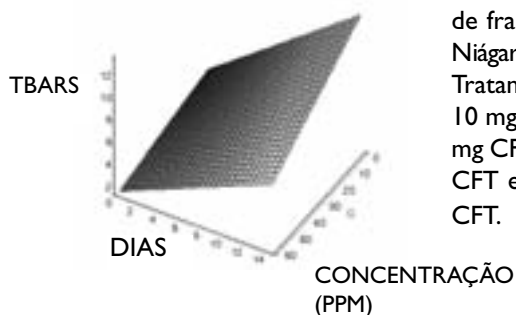


Fonte de variação	Fator	TBARS (mg.kg <sup>-1</sup> ) valores médios	Nível de significância
	EUN10 × 3	5.16	
	EUN10 × 7	6.87	
	EUN10 × 14	10.64	
	EUN20 × 0	2.08	
	EUN20 × 3	4.74	
	EUN20 × 7	6.73	
	EUN20 X 14	10.96	
	EUN40 × 0	1.71	
	EUN40 × 3	3.74	
	EUN40 × 7	4.80	
	EUN40 × 14	8.93	
	EUN60 × 0	1.66	
	EUN60 × 3	2.66	
	EUN60 × 7	4.08	
	EUN60 × 14	7.13	

**Figura 2.** Superfície de resposta obtida para os valores de TBARS (mg.kg<sup>-1</sup>) das amostras de carne de frango cozidas, adicionadas dos extratos de uva Isabel, armazenadas sob condições aeróbicas a 4± °C. Tratamentos: CNTL: controle; EUI10: extrato de uva Isabel com 10 mg CFT, EUI20: extrato de uva Isabel com 20 mg CFT, EUI40: extrato de uva Isabel com 40 mg CFT e EUI60: extrato de uva Isabel com 60 mg CFT.



**Figura 3.** Superfície de resposta obtida para os valores de TBARS (mg.kg<sup>-1</sup>) das amostras de carne de frango cozidas, adicionadas dos extratos de uva Niágara, armazenadas sob condições aeróbicas a 4± °C. Tratamentos: EUN10: extrato de uva Niágara com 10 mg CFT, EUN20: extrato de uva Niágara com 20 mg CFT; EUN40: extrato de uva Niágara com 40 mg CFT e EUN60: extrato de uva Niágara com 60 mg CFT.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de caracterizar quimicamente os extratos de semente e de casca de uva mostrou que tanto a variedade Isabel quanto a Niágara apresentaram valores consideráveis de compostos fenólicos totais. O extrato de semente e de casca de uva da variedade Niágara apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (catequina e epicatequina) identificados por CLAE. Estes extratos apresentaram alta atividade antioxidante.

O efeito da adição de extratos de semente e de casca de uva em carne de frango processada e cozida mostrou resultados consideráveis quanto à estabilidade oxidativa. As concentrações de extratos na faixa de 40 a 60 mg apresentaram resultados compatíveis com o antioxidante sintético BHT.

A eficiência dos extratos de semente e casca de uva aumentou com o incremento das concentrações destes antioxidantes. A adição dos extratos de uva, combinada com a embalagem a vácuo, deve ser considerada um bom método para aumentar a estabilidade lipídica na carne de frango cozida, armazenada sob refrigeração a  $4 \pm 1$  °C, num prazo de 14 dias para produtos embalados em condição aeróbica (PVC) e a vácuo.

## BIBLIOGRAFIA

- AHN, J.; GRÜN, I.U.; FERNANDO, L.N. Antioxidant properties of natural plant extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef. *Journal of Food Science*, Chicago, v.67, n.4, p.1364-1369, 2002.
- ADEGOKE, G.O.; VIJAY KUMAR, M.; GOPALA KRISHNA, A.G.; VARADARAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in foods – A critical appraisal. *Journal of Food Science and Technology*, v.35, n.4, p.283-298, 1998.
- ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y.K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. Paredes-Guzmán, J.; Park, Y. K.; *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.4, p.909-915, 2005.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. *Rancidity in foods*. 3.ed. London: Blackie Academic, 1994.
- ALONSO, A.M. et al. Determination of antioxidant activity of wine by products and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. V. 50, n. 21, p. 5832-5836, 2002.

BAKKALBASI, E., YEMIS, O.; ASLANOVA, D. Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey. *European Food Research Technology*, 221, 792-797, 2005.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; YASAR, S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, Kidlington, v.18, n.9, p.1131-1136, 2007.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*, New York, v.219, n.6, p.561-571, 2004.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. *Química do processamento de alimentos*. 3. ed. São Paulo: Varela, 144p, 2001.

BRANNAN, R.G. Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *Journal of Food Science*, Oxford, v.73, n.1, p.C36-C40, 2008.

BRANNAN, R.G.; MAH,E. Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Science*, Kidlington, v.77, n.4, p.540-546, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Disponível em: <<http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=38>>. Acesso em: 3 de novembro de 2008.

CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.; KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. *Semina Ciência Agrária*, Londrina, v.29, n.1, p.93-102, 2008.

COSGROVE, J.P. et al. The Kinetics of autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, v.2, p.299-304, 1987.

EMMONS, C.L., PETERSON, D.M.; PAUL, G.L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and content of phenolic and tocol antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4894-4898, 1999.

DANI, C., OLIBONI, L.S., VANDERLINDE, R., BONATTO, D., SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically or conventionally produced grapes. *Food and Chemistry Toxicology*, 45, 2574-2580, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 16 de agosto de 2009.

GONZÁLES-PARAMÁS, A.M.; ESTEBAN-RUANO, S.; SANTOS-BUELGA, C.; PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J.C. R. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.52, p.234–238, 2004.

GRAY, J. I.; GOMAA, E. A.; BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Science*, v. 34, p.111-123, 1996.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SINGH, R.P.; SAKARIAH, K.K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, Kidlington, v.73, p.285-290, 2001.

LAI, S.M.; GRAY, J.I.; SMITH, D.M.; BOORE, A.M; CRACKEL, R.L.; BYCLEY, D.J. Effects of oleoresin rosemary, tertiary, butylhydroquinone and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *Journal of food Science*, Chicago, v.56, n.3, p.616-620, 1991.

LIANG, C.P., WANG, M., SIMON, J.E.; HO, C.T. Antioxidant activity of plant extracts on the inhibition of citral off-odor formation. *Molecular Nutrition Food Research*, 48, 308-317, 2004.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. *Antioxidants*, New York: Marcel Dekker, 177p., 1995.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; PRADO, R.M.; ZAWADSKI, F.; ITO, R.H.; PRADO, I.N. Fatores que Afetam a Estabilidade da Carne. Artigo Técnico. *Revista Nacional da Carne*, nº. 374, abril de 2008.

MAKRIS, D.P.; BOSKOU, G.; ANDRIKOPOULOS, N.K. Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, n.2, p. 125-132, 2007.

MENSOR, L.L., MENEZES, F.S., LEITÃO, G.G., REIS, A.S., dos SANTOS, T.C., COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, 15, 127- 130, 2001.

- MIELNIK, M.B.; AABY, K.; SKREDE, G. Commercial antioxidants control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. *Meat Science*, Kidlington, v.65, n.3, p.1147-1155, 2003.
- MIELNIK, M.B.; OLSEN, E.; VOGT, G.; ADELIN, D.; SKREDE, G. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *Food Science and Technology*, Amsterdam, v.39, n.3, p.191-198, 2006.
- MIYAKE, T & SHIBAMOTO, T. Inhibition of malonaldehyde and acetaldehyde formation from blood plasma oxidation by naturally occurring antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.46, p.3694-3697, 1998.
- MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D. J. Lipid stability in meat and meat products. *Meat Science*, v.49, p.73-86, 1998.
- NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, Kidlington, n.87, n.1, p.41- 44, 2003.
- O'NEILL, L.M.; GALVIN, K.; MORRISSEY, P.A.; BUCKLEY, D.J. Comparison of effects of dietary olive oil, tallow and vitamin E on the quality of broiler meat and meat products. *British Poultry Science*, v. 39, n.3, p.365-371, 1998.
- PINELO, M; RUBILAR, M.J.; SINEIRO, J.; N-UNEZ, J.M. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p. 2111–2117, 2005.
- R. GUENDEZ, R.; KALLITHRAKA,S.; MAKRIS, D.P.; KEFALAS, P. An analytical survey of the polyphenols of seeds of varieties of grape (*Vitis vinifera* sp.) cultivated in Greece: implications for exploitation as a source of value-added phytochemicals, *Phytochemical Analysis*, v.16, p.17–23, 2005.
- RABABAH, T.M.; HETTIARACHCHY, N.S.; HORAX, R. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal Agriculture Food and Chemistry*, Washington, v.52, n.16, p.5183-5186, 2004.

- RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J.; Liquid chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products. *Journal Chromatography A*, v. 822, p.305-309, 1998.
- ROCKENBACH, I.I; SILVA, G.L; Eliseu RODRIGUES, E., KUSKOSKI, E.M.; FETT, R. Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Anceleta*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28 p. 238-244, 2008.
- ROJAS, M.C.; BREWER, M.S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science*, Oxford, v.72, n.4, p.S282-S288, 2007.
- SHAHIDI, F.; DESILVA, C.; AMAROWICZ, R. Antioxidant activity of extracts of defatted seeds of niger (*Guizotia abyssinica*). *Journal of the American Oil Chemists Society*, Champaign, v.80, n.5, p.443-450, 2003.
- SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, 94p., 1999.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. v.15, p.3-16, 2002.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, San Diego, v.299, p.152-178, 1999.
- SORENSEN, G.; JORGENSEN, S.S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, New York, v.202, n.3, p.205- 210, 1996.

# NOTAS SOBRE OS AUTORES

## CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA – 1º Lugar

**Brian Samir Ginés Bejarano** (*autor*), 17 años, paraguayo, estudiante del 1er curso del Colegio Iberoamericano localizado en Asunción/Paraguay; presidente del Club de Ciencia Galileo Galilei y de la Academia Literaria ALSPV; miembro directivo de la R.E.A.L.; y escritor del Centro Astronómico Bicentenario.

**Walter Israel Martinez Cantero** (*autor*), 15 años, paraguayo, estudiante del 1er curso del Colegio Iberoamericano, localizado en Asunción/Paraguay, y miembro del Club de Ciencia Galileo Galilei.

**Fanny Elizabeth Florentín de Gonzalez** (*profesora-orientadora*), 42 años, paraguaya, de profesión Química Analítica, es egresada de la Universidad Nacional de Asunción, en la Facultad de Química, y habilitada para la Docencia del Instituto Superior de Educación (I.S.E.). Ejerce la docencia en el Colegio Iberoamericano en las cátedras de Ciencias de la Naturaleza, Salud, y Química; además, es profesora en el Colegio Nacional San Vicente de Pal, Colegio Nacional Vicepresidente Sánchez, y en la Universidad Iberoamericana. Asimismo, es asesora del Club de Ciencias Galileo Galilei del Colegio Iberoamericano.

## CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO – 1º Lugar

**Jéssica de Matos Nunes** (*autora*), 21 anos, brasileira, aluna do 8º semestre do curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Atualmente é bolsista de iniciação científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Atua nas áreas de fitoquímica e biotecnologia vegetal com a prospecção fitoquímica e elaboração de protocolos de cultivo em larga escala para espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil.

**Gilsane Lino von Poser** (*professora-orientadora*), 50 anos, brasileira. É graduada em Farmácia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, 1981). Possui doutorado em Ciências Farmacêuticas pela UFRGS (1997). Atualmente é Professora Associada da disciplina de Farmacognosia I na Faculdade de Farmácia da UFRGS e bolsista de Produtividade 2 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmacognosia, atuando principalmente no estudo de espécies nativas de *Valeriana* (Valerianaceae), *Pterocaulon* (Asteraceae) e *Hypericum* (Guttiferae), visando ao isolamento e à identificação de moléculas com atividades farmacológicas.

### **CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR – 1º Lugar**

**Beatriz Camargo Barros de Silveira Mello**, 26 anos, brasileira, aluna de doutorado em engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (2005). Atuou como estagiária no desenvolvimento de novos produtos provenientes de matéria-prima apícola. Fez mestrado em Engenharia de Alimentos na mesma universidade, com conclusão em 2008. Atualmente está cursando doutorado na Unicamp com o seguinte projeto de pesquisa: estudo do processo de concentração de extratos aquosos de própolis por nanofiltração.

### **CATEGORIA INTEGRAÇÃO – 1º Lugar**

**Alejandra Londero**, 27 años, argentina. Licenciada en Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (2006). Becaria Interna de Posgrado tipo I del CONICET desde 2007. Ayudante diplomada en la Cátedra de Química Biológica en la FCNyM, UNLP, desde 2008. Cursos de posgrado aprobados: 5. Comunicaciones a congresos: 10. Publicaciones científicas en revistas internacionales: 1. Participación en proyectos de investigación: 3. Tesis doctoral en curso “Alimentos funcionales: obtención de un nuevo alimento funcional a partir de gránulos de kefir y un efluente de la industria quesera.



**Anália Graciela Abraham**, 48 años, argentina. Bioquímica y Dra. en Ciências Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Profesora Adjunta (Bioquímica y Control de Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP). Investigadora Independiente (CONICET, Argentina). Área de investigación: microbiología, bacterias lácticas exopolisacáridos, prebióticos y alimentos funcionales. Bioquímica y tecnología de alimentos. Dictado y organización de cursos de posgrado (nacionales e internacionales). Dirección de tesis de doctorado, de maestría y trabajos finales de grado. Trinta publicaciones en revistas internacionales y más de 10 trabajos completos en actas de congresos nacionales e internacionales. Dirección de proyectos científicos subsidiados por organismos nacionales e internacionales (CONICET, CABBIO, ANPCyT, UNLP).

**Andrea Gómez-Zavaglia**, 40 años, argentina. Investigadora Adjunta (Carrera de Investigador CONICET, Argentina). Tesis Doctoral UNLP (Argentina, 2000). Estancias postdoctorales: Universidad Buenos Aires (2000-2002), Max Planck Institut (Alemania, 2002) y Universidad de Coimbra (Portugal, 2003-2005). Profesora Visitante de la Universidad de Vigo y Autónoma de Madrid. Participación en 24 proyectos de investigación (líder en 8). Coordinadora de la Red NovelProbio (proyecto multilateral financiado por el Programa Cyted). Revisora de las revistas internacionales indexadas. Evaluadora de proyectos nacionales e internacionales. Directora de 2 Investigadores CONICET y 2 becarios doctorales y postdoctorales. Organización de 8 congresos internacionales y 2 cursos de posgrado; 60 trabajos publicados en revistas internacionales; 3 capítulos de libro; 2 patentes en trámite; 85 trabajos en congresos; 8 conferencias dictadas. Dominio de alemán, francés, inglés y portugués.

**Andrés Illanes Frontaura**, 61 años, chileno. Ingeniero Civil Químico, M.Sc. Biochemical Engineering Massachusetts Institute of Technology, Profesor Titular, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Facultad Ingeniería, PUCV Chile. Profesor de pregrado y posgrado (maestría y doctorado) en Ingeniería Bioquímica y Biotecnología. Profesor visitante en universidades de Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, España, México, Perú y Uruguay. Campo de investigación: biocatálisis enzimática (diseño y evaluación de biocatalizadores para reacciones de síntesis orgánica). Más de 70 publicaciones en revistas internacionales con referato; 100 presentaciones a congresos internacionales. Autor de dos libros y numerosos capítulos de libros.

**Angela María León Peláez**, 40 años, colombiana. Antropóloga (Corporación Universitaria Lasallista. Ingeniera de Alimentos. Universidad Antioquia); Magíster en Biotecnología (Colegio Mayor de Antioquia: Especialista en Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia). Becaria Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (Argentina). Finalista Premio Presidencial “Prácticas Educativas Solidarias en la Educación Superior”, Ministerio de Educación, Argentina. Docente Posgrado de Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia, Seccional Medellín (2002-2003). Profesor universitario asistente, Universidad Antioquia (2004). Jefe de trabajos prácticos. UNLP (2009 y continúa). Responsable de 4 proyectos de investigación (Colombia). Codirector de un proyecto de extensión (Argentina); 9 presentaciones a congresos; 2 publicaciones en revistas nacionales.

**Carlos Andrés Serna Cataño**, 24 años, colombiano, Ingeniero de Alimentos – Universidad de Antioquia. Participación en investigación: Grupo de Bioconversión de Materias Primas y Residuos Agroindustriales en Productos de Interés Alimentario (BIOALI). Participación en proyectos: “Aislamiento y caracterización de una colección de Bacterias Ácido Lácticas silvestres”; “Puesta a punto de métodos para el análisis de detoxificación de aflatoxinas a través de la aplicación de fermentos de leche a partir de gránulos de Kefir”, y ayudante en el Laboratorio de Química Analítica.

**Edilson Arley Quintero Yepes**, 24 años, colombiano, Ingeniero de Alimentos – Universidad de Antioquia. Participación en investigación: Grupo de Bioconversión de Materias Primas y Residuos Agroindustriales en Productos de Interés Alimentario (BIOALI). Participación en Proyectos: “Aislamiento y caracterización de una colección de bacterias ácido lácticas silvestres”; “Puesta a punto de métodos para el análisis de detoxificación de aflatoxinas a través de la aplicación de fermentos de leche a partir de gránulos de Kefir”, y ayudante en el Laboratorio de Química Analítica y Orgánica.

**Emiliano Javier Kakisu**, 32 años, argentino, Centro de ID en Criotecología de Alimentos. Becario Posgrado tipo I CONICET. Publicaciones en periódicos y revistas científicas: 2. Trabajos presentados a congresos: 18.

**Emma Elizabeth Tymczynszyn**, 33 años, argentina. Título de grado: Bioquímica – Facultad de Farmacia y Bioquímica – UBA – Año 2003. Título de posgrado: Doctora de la Universidad de Buenos Aires – Año 2007. Posición actual: Investigador Asistente del CONICET. Director: Dra. Andrea Gómez-Zavaglia. Producción Científica: 8 publicaciones internacionales en revistas con referato, 1 capítulo de libro, 20 Presentaciones a Congreso nacionales e internacionales, 1 premio otorgado por la Asociación Argentina de Microbiológica. Becas obtenidas: beca estímulo 2000, beca de doctorado 2003, beca posdoctoral 2007. Participación en 10 proyectos de investigación y en una Red Cyted.

**Graciela Liliana de Antoni**, 60 años, argentina, Doctora en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Profesora Titular de Microbiología General (Facultad Ciencias Exactas, UNLP). Investigador Principal de CIC PBA Secretaria Académica de la Fac. Ciencias Exactas. Premio Dupont-CONICET 2005 (Director). Mención especial en el Premio Presidencial (Director). Presentaciones a congresos nacionales e internacionales: 180. Trabajos publicados en actas de congresos: 14. Publicaciones en revistas internacionales con referato: 60. Capítulo de libro: 2. Conferencias y mesas redondas en congresos: 30. Conferencias en empresas: 4. Cursos de posgrado dictados: 36. Dirección de tesis doctorales: 13 (terminadas y aprobadas) y 5 en ejecución.

**Graciela L. Garrote**, 39 años, argentina, Bioquímica y Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Docente de la cátedra de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Investigador Adjunto del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Área de investigación: microbiología, bacterias ácido lácticas, levaduras, probióticos, bioquímica y tecnología de los alimentos. Participación en la organización y dictado de 9 cursos de posgrado nacionales e internacionales. Tesis dirigidas o codirigidas: 2 doctorales, 1 de magister y 4 de grado. Publicaciones en revistas internacionales: 10. Autor de 3 capítulos de libro. Comunicaciones en congresos y reuniones científicas: 60. Participación en 18 proyectos científicos acreditados por instituciones nacionales e internacionales (CONICET, CABBIO, ANPCyT, UNLP).

**María de los Angeles Serradell**, 35 años, argentina, Bioquímica, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. Título de posgrado: Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Posición actual en investigación: Investigadora Asistente del CONICET. Posición docente actual en la UNLP: Jefe de Trabajos Prácticos, Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Trabajos científicos publicados con referato: 4 artículos y 1 capítulo de libro. Comunicaciones a congresos nacionales e internacionales: 25. Participación en proyectos de investigación (1998 – 2009): 14.

**Marina Alejandra Golowczyk**, 32 años, argentina. Licenciada en Biología orientación Zoología (UNLP, finalizado 10/2000). Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP, finalizado 6/2008) con el tema de Tesis “Caracterización taxonómica, probiótica y tecnológica de lactobacilos aislados de kéfir” realizado bajo la dirección de la Dra. Graciela De Antoni y la codirección de la Dra. Analía Abraham. Actualmente becaria posdoctoral del CONICET y ayudante diplomada de la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Producción científica: 28 presentaciones a congresos nacionales e internacionales y 7 trabajos publicados en revistas internacionales con referato.

**Oscar Esteban Gerbino**, 28 años, argentino. Licenciado en Biotecnología. Realizando el doctorado con el tema: “Interacción de proteínas de Capa S con metales: análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular”; con la Beca Agencia PICT 2006/00068. Miembro del proyecto de extensión “KEFIR, un alimento probiótico, a costo cero, para comedores comunitarios”. Publicación: Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in vitro gastric system en el *Journal of Applied Microbiology*.

**Pablo Mobili**, 34 años, argentino. Bioquímico (UNLP, finalizado 9/2001). Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP, finalizado 5/2008) con el tema de tesis “Caracterización de las proteínas de superficie (capa-S) de *Lactobacillus kefir*” bajo la dirección de la Dra. Graciela De Antoni y la Dra. Analía Abraham. Actualmente becario posdoctoral del CONICET y jefe de trabajos prácticos de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Producción científica: 22 presentaciones a congresos nacionales e internacionales y 5 trabajos publicados en revistas internacionales con referato.

**Pablo Fernando Pérez**, 48 años, argentino. Dr. en Bioquímica, Profesor Adjunto de Microbiología (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) e Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Durante toda su carrera ha realizado docencia de grado y posgrado. Su campo de especialización es el efecto de los microorganismos intestinales sobre la homeostasis del hospedador y ha focalizado sus estudios en dos vertientes principales: efectos benéficos y adversos. Ha publicado trabajos en revistas de circulación internacional sobre sistemas *in vitro* e *in vivo* sobre los mecanismos de interacción con el hospedador de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Giardia intestinalis* y *Clostridium difficile* así como también acerca del antagonismo del efecto de estos patógenos a través del tratamiento probiótico.

**Paula Carasi**, 25 años, argentina. En el año 2008 obtuve el título de Licenciada en Bioquímica en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Estoy realizando la tesis doctoral en la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) bajo la dirección de la Dra. Graciela De Antoni. Desarrollo actividades docentes en la Cátedra de Introducción a la Química y Química General de la misma facultad.

### **CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA – Menção Honrosa**

Las alumnas responsables por el trabajo nominado a mención especial son **Wilma Pamela Villamayor Gallardo** (15 años) y **Celeste Maria Giselle Cáceres Espínola** (15 años), paraguayas, estudiantes del 1º Bachillerato Científico del Colegio Nacional EMD Asunción Escalada, localizado en Asunción/Paraguay.

**Carmen María Jiménez de Céspedes** (*profesora-orientadora*), 45 años, paraguaya, posgrado en didáctica superior universitaria, licenciada en ciencias de la educación, profesora de química y física. Autora dos libros: *Proyectos Innovadores Exitosos* y *Química en Acción*, medalla de oro a la excelencia educativa año 2009. Varios premios internacionales con alumnos del nivel medio en competencias internacionales realizadas en Brasil, Argentina, México, Perú, EE.UU. y Túnez-África. Coordinadora de proyectos y catedrática en el área de química y física en los colegios Asunción Escalada y San Ignacio de Loyola de Asunción.

## **CATEGORIA ESTUDANTE UNIVERSITÁRIO – Menção Honrosa**

**Natalia Draper Pastorino** (*autora*), 25 años, uruguaya, alumna del quinto año de la carrera de Ingeniería Alimentar de la Facultad de Química de la Universidad de la República. Actualmente becada por la ANII en el marco de la investigación de “**Optimización de las condiciones de producción del Vinagre de Miel**”. Responsable académico: Dra. Silvana Vero. Cátedra de Microbiología – Facultad de Química. Asistente especializado del Laboratorio de Aguas Residuales y Análisis Especiales de la Administración de las Obras Sanitarias del Estado (OSE).

**Silvana Vero Mendez** (*profesora-orientadora*), 45 años, uruguaya. Química Farmacéutica: 1987. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Doctorado en Química: 1997. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Posdoctorado: 1998-1999. Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Córdoba (España). Profesor Agregado (Grado 4). Cátedra de Microbiología. Facultad de Química. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

## **CATEGORIA JOVEM PESQUISADOR – Menção Honrosa**

**Pablo Ezequiel Hegel**, 30 años, argentino. Ingeniero Químico (UNS – Argentina). Doctorado en Ingeniería Química (PLAPIQUI, Argentina). Postdoctorado en Ingeniería Química (PLAPIQUI, Argentina). Investigación en el área de termodinámica y procesos de separación: ingeniería del equilibrio entre fases aplicada a sistemas de extracción de productos naturales y su fraccionamiento con gases densos para la obtención de productos de alto valor agregado, así como también a sistemas de reacción en medios supercríticos para la producción de biocombustibles y aditivos.

## **CATEGORIA INTEGRAÇÃO – Menção Honrosa**

**Carmen Josefina Contreras Castillo**, 52 años, peruana. Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Nacional Agraria La Molina (1981), mestrado em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (1990) e doutorado em Tecnologia de Alimentos

pela Universidade Estadual de Campinas (1995). Atualmente é Professora Associada da Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Tem experiência na área de ciência e tecnologia de alimentos, com ênfase em tecnologia de carnes, atuando principalmente nos seguintes temas: embalagens a vácuo e atmosfera modificada, aumento de vida útil, carnes, jejum alimentar, irradiação, qualidade e processamento.

**Ligianne Din Shirahigue**, 28 anos, brasileira. Bolsista de apoio técnico em extensão no país do CNPq – Nível A. Possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Norte do Paraná (2003) e mestrado em ciência de tecnologia de alimentos pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (2008). Tem experiência na área de ciência e tecnologia de alimentos, com ênfase em ciência e tecnologia de produtos de origem animal, atuando principalmente nos seguintes temas: estabilidade oxidativa de produtos de origem animal, antioxidantes naturais, extrato de semente e casca de uva, compostos fenólicos, atmosfera modificada e MAP.

**Miriam Mabel Selani**, 24 anos, brasileira. Possui graduação em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP (2007). Tem experiência na área de ciência e tecnologia de alimentos, tendo atuado nas áreas de tecnologia de carnes, alimentos funcionais e pós-colheita de frutas e hortaliças. Atualmente cursa mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela ESALQ/USP, na área de tecnologia de carnes, atuando principalmente nos seguintes temas: aumento de vida útil, antioxidantes naturais, extrato de semente e casca de uva, oxidação lipídica em carnes.

## NOTA SOBRE OS MEMBROS DA COMISSÃO DE AVALIAÇÃO

### **Professor Ary Mergulhão Filho, UNESCO/Brasil – Presidente da Comissão de Avaliação**

Brasileiro, com mestrado em Ciências pelo Instituto Tecnológico da Aeronáutica (ITA). Atuou como empresário e consultor de empresas. Orientou mais de sessenta trabalhos acadêmicos de graduação em 19 anos como professor universitário. Na esfera pública, atuou no Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e no Ministério da Ciência e Tecnologia na formulação e implantação de políticas para o setor. Atualmente é Oficial de Ciência e Tecnologia da UNESCO no Brasil.

### **Professor Héctor Pralong, Representante da RECyT/Argentina**

Argentino, Ingeniero Químico recibido en el Universidad de Buenos Aires. Se desempeña como Asistente Técnico de la Plataforma de Biotecnologías del MERCOSUR, BIOTECSUR, donde desarrolla actividades en los sectores, agropecuario, industria y salud. También es profesor de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y del Instituto Tecnológico Buenos Aires (ITBA) y al mismo tiempo investigador en las dos primeras. Además ha desarrollado diversas actividades en la industria en el área de la Administración de Operaciones en diferentes temáticas productivas y de servicios.

### **Professora Concepta McManus, Representante da RECyT/Brasil (Brasília)**

Professora da Universidade de Brasília na área de Genética e Melhoramento Animal, com doutorado pela University of Oxford (Inglaterra 1991) e pós-doutorado pela University of Sydney (Australiá 2002). Bolsa de produtividade 1B do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Participante do Comitê Técnico do Macroprograma 2 e PAC da EMBRAPA, do Comitê de Assessoramento em Ciências Agrárias da FAP-DF, de Comitês da CAPES e CNPq, com mais de 100 artigos publicados em revistas indexadas, nacionais e internacionais, bem como mais de 100 alunos orientados.



**Professor Manlio Silvestre Fernandes, Representante da RECyT/Brasil (Rio de Janeiro)**

Concluiu o doutorado em Crop And Soil Sciences, na Michigan State University, em 1974. Atualmente é Professor Emérito da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Publicou 84 artigos em periódicos especializados e 101 trabalhos em anais de eventos. Possui 6 capítulos de livros e 2 livros publicados. Orientou 26 dissertações de mestrado e 17 teses de doutorado nas áreas de agronomia e botânica. Atua na área de agronomia, com ênfase em nutrição mineral de plantas. Em suas atividades profissionais interagiu com 148 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu currículo Lattes os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico-cultural são: nutrição de plantas, arroz, hidroponia, nutrição mineral de plantas, amino-N, absorção de N, milho, nitrato, nitrogênio e N-Uptake.

**Professor Francisco Frederico Sparenberg Oliveira, Representante da RECyT/Brasil (São Paulo)**

Brasileiro, Engenheiro Agrônomo formado pela Escola Superior de Agricultura da Universidade de São Paulo, com mestrado em ecologia pelo Departamento de Ecologia da Universidade de Brasília, Assessor da Secretaria de Política Industrial do Ministério da Ciência e Tecnologia, Melhorista de Cana de Açúcar do Programa Nacional de Melhoramento da Cana de Açúcar – PPLANALSUCAR. Atualmente é responsável pelos Comitês Brasileiros de Carne e Leite – ABNT CB 56 e Café ABNT CB 52 e é gerente de Articulação Nacional da Associação Brasileira de Normas Técnicas.

**Professora Rosa Oviedo de Cristaldo, Representante da RECyT/Paraguai**

Paraguaya, con doctorado en Fitotecnia por la Universidad Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil e ingeniero agrônomo por la Universidad Nacional de Asunción (UNA), Paraguay. Fue fitomejoradora del Programa Nacional de Trigo y co-creadora de variedades actualmente en cultivo. Directora de la Carrera de Ingeniería Agronómica y del Departamento de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA. Par Evaluador para Carreras de Agronomía del MERCOSUR y de la Red Iberoamericana de Acreditación de Carreras de Educación Superior (RIACES). Consultora de la FAO para recursos fitogenéticos. En

la actualidad, se desempeña como Docente Investigador del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) de la UNA. Es orientadora de tesis, con numerosos artículos publicados y trabajos presentados en seminarios y conferencias. Recibió distinciones del Premio Nacional de Ciencias 2002 y Honor al Mérito de la Universidad Nacional de Asunción 2000 y 2008.

**Professor Daniel Bayce Muñoz, Representante da RECyT/Uruguai**

Egresado de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República. Se especializó en botánica, flora y vegetación del Uruguay, recursos genéticos de especies indígenas y semillas, temas que desarrolló desde el año 1978 al 2004 en la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República en el Departamento de Biología Vegetal, donde se retiró con el cargo de Profesor Adjunto. Actualmente es Profesor de Botánica del Instituto Universitario St. Clare de Punta del Este y miembro de su Consejo Académico. Integra el Consejo Miembro del Consejo de Editores de la Newsletter Biosafety and Biosecurity, ANBIO. Participó en 28 tribunales de tesis de grado y presentó más de 40 trabajos / publicaciones en seminarios y congresos. En la actividad profesional desarrolla los temas vinculados a semillas, propiedad intelectual y biotecnología vegetal, en sus aspectos técnicos y normativos de comercio nacional e internacional. Ocupa el cargo de Director Ejecutivo de la Cámara Uruguaya de Semillas desde 1994 y es miembro de la Junta Directiva del Instituto Nacional de Semillas desde el año 2004. Es consultor en los temas de su especialidad.

2009

*prêmio* MERCOSUL DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

*premio* MERCOSUR DE  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Tema: **Agroindústria** *Agroindustria*

*A edição 2009 do Prêmio MERCOSUL de Ciência e Tecnologia,  
voltada para o tema da Agroindústria, premia  
oito trabalhos publicados neste livro.*

*Os trabalhos representam potencial contribuição para o  
desenvolvimento científico e tecnológico dos países  
do MERCOSUL e foram desenvolvidos por estudantes do ensino médio,  
universitários, pesquisadores graduados e doutores da área.*

ORGANIZAÇÃO ORGANIZACIÓN



Representação  
no Brasil

RECyT



PATROCÍNIO PATROCINIO



Ministério da  
Ciência e Tecnologia

