



Revista de Ingeniería y Ciencias Aplicadas



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



FACULTAD DE
**CIENCIAS APLICADAS
A LA INDUSTRIA**

ISSN 2796-9444 / Num. 2. Vol. 5 -2025

INDICE

Evaluación de dos formulaciones de pate de trucha Arcoiris elaboradas con diferente composición lipídica.....	1
Estudio de zonas estructuralmente sensibles de un aneurisma cerebral empleando descriptores biomecánicos bajo la teoría de Kirchhoff-Love.....	8
Liofilización de levaduras no-Saccharomyces pectinolíticas para la producción de starters enológicos.....	18
La mecatrónica en la formación básica: innovación en el laboratorio para aprender física en ingeniería y tecnicatura en mecatrónica	27
Estudio de la remoción de contaminantes acuosos con hueso calcinado y arena de Monte Hermoso.....	33
Evaluación de la fermentación con Saccharomyces cerevisiae bioacidificadora para la elaboración de vinos Malbec.....	39
Croscompilación Python de VHDL para promover el aprendizaje de Hardware Reconfigurables.....	50
Modelado matemático de la producción de biomasa de levadura enológica nativa.....	62
Remoción de arsénico en aguas subterráneas con Moringa oleífera una alternativa sustentable para el tratamiento de acuíferos en Entre Ríos.....	70
Estudio de envase y vida útil en pasta fresca libre de gluten a base de harinas de amaranto y topinambur.....	79
Inmovilización de levaduras autóctonas para la obtención de vinos regionales.....	89
Modelado de la dinámica celular utilizando celdas de Voronoi.....	95



Evaluación de dos formulaciones de pate de trucha Arcoíris elaboradas con diferente composición lipídica

María Ines Prario ^{1*}, Arturo Asiain ¹, Paula Waldman ¹, Federico Alcides Cecchi ¹,
Nicolás Germán Córdoba ¹, Thiago Landolfo ¹

1. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Mar del Plata, Grupo de Investigación, Laboratorio de Acuicultura (LACUI), Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

*E-mail: mprario@docentes.mdp.utn.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Paté de trucha ahumada
Evaluación sensorial
Consumidores
Valor agregado

RESUMEN

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) constituye una de las especies acuícolas de mayor potencial en Argentina, aunque se comercializa principalmente en filets frescos y congelados. Por otro lado, el desarrollo de productos con valor agregado representa una oportunidad para diversificar la oferta y responder a la demanda de alimentos saludables. El objetivo del presente trabajo fue formular dos tipos de paté de trucha ahumada: uno con grasa semisólida (M-01) y otro con aceite vegetal (A-01), comparando su perfil nutricional, calidad microbiológica y aceptación sensorial según el método de comparación por pares. Los filets fueron sometidos a un proceso de ahumado en caliente y procesados para obtener ambas formulaciones. Los recuentos microbiológicos se mantuvieron dentro de los límites establecidos. La formulación M-01 presentó un mayor contenido lipídico y humedad, mientras que la A-01 registró un nivel superior de carbohidratos. En el análisis sensorial, el 67% de los consumidores prefirió la M-01 frente al 33% que eligió la A-01, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). La M-01 destacó por su textura cremosa y sabor suave, mientras que la A-01 presentó una textura más firme y sabor ahumado más intenso. Ambas formulaciones resultaron aceptables, evidenciando la necesidad de continuar investigando alternativas más saludables que satisfagan las demandas de los consumidores.

Evaluation of two formulations of rainbow trout paté prepared with different lipid compositions

KEYWORDS

Smoked trout paté
Sensory evaluation
Consumers
Added value

ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the aquaculture species with the greatest potential in Argentina, although it is primarily marketed as fresh and frozen filets. However, the development of value-added products represents an opportunity to diversify the supply and respond to the demand for healthy foods. The objective of this study was to formulate two types of smoked trout paté: one with semi-solid fat (M-01) and another with vegetable oil (A-01), comparing their nutritional profiles, microbiological quality, and sensory acceptance using the pairwise comparison method. The filets were hot-smoked and processed to obtain both formulations. Microbiological counts remained within established limits. The M-01 formulation showed higher lipid and moisture content, while A-01 had higher carbohydrate levels. In the sensory analysis, 67% of consumers preferred M-01 compared to 33% who chose A-01, representing a statistically significant difference ($p < 0.05$). M-01 was distinguished by its creamy texture and mild flavor, while A-01 exhibited a firmer texture and more intense smoky flavor. Both formulations were acceptable, highlighting the need for continued research into healthier alternatives that meet consumer demands.

1. Introducción

El aumento sostenido en el consumo de productos pesqueros, junto con su sobreexplotación, ha causado una disminución significativa en la cantidad disponible de especies de interés comercial. Frente a esta problemática, la acuicultura se posiciona como una alternativa productiva factible, principalmente nivel global, donde dicha actividad ha experimentado un marcado aumento en los últimos años, particularmente en países desarrollados donde los productos alimenticios derivados de estos cultivos están adquiriendo un aumento significativo en los diferentes mercados.

En Argentina, el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) ha mostrado un notable crecimiento en los últimos años, alcanzando en 2022 el 76% de la producción acuícola nacional (Dirección de Acuicultura, 2022). No obstante, su comercialización se concentra principalmente en formato filet fresco y congelado, así como en productos ahumados envasados al vacío de forma artesanal, pero con escaso desarrollo de subproductos con valor agregado.

Por otra parte, históricamente, el consumo de salmón chileno ha mostrado una notable estabilidad comercial a lo largo del tiempo, independientemente de las fluctuaciones económicas. En este contexto, y considerando que la trucha arcoíris presenta atributos sensoriales similares a los del salmón, se presenta como una alternativa potencial para reemplazarlo. De este modo, la incorporación de productos procesados con valor agregado a base de trucha arcoíris podría favorecer su posicionamiento en el mercado argentino, no solo como sustituto del salmón chileno, sino también como una opción viable capaz de responder a la creciente demanda de alimentos de alta calidad.

Paralelamente, el creciente interés de los consumidores por una alimentación saludable ha impulsado la demanda de alimentos de origen natural, particularmente aquellos con bajo contenido de grasas saturadas, asociadas al desarrollo de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares y obesidad. En este contexto, el desarrollo de productos ictícolas con valor agregado y que se orienten a la reducción de grasas animales y su reemplazo por lípidos insaturados de origen vegetal representa una línea

de investigación de gran relevancia en el desarrollo de productos alimenticios en el mercado actual, haciendo hincapié principalmente en las propiedades nutricionales, pero sin afectar los atributos sensoriales esperados por los consumidores.

El objetivo del presente trabajo fue formular dos tipos de paté de trucha ahumada, una elaborada con grasa semisólida (Formulación M-01) y otra empleando aceite vegetal (Formulación A-01), con el fin de determinar el perfil nutricional, aptitud microbiológica y evaluar la preferencia de los consumidores mediante un ensayo sensorial.

2. Materiales y métodos

Siguiendo la metodología de Hualde et al. (2010), se llevó a cabo el proceso de ahumado en caliente. Para ello, se procesaron 1,5Kg de filet de trucha arcoíris en un ahumador artesanal con capacidad de 140 litros. El procedimiento consistió en un salado previo al 10% de salmuera durante 6 horas a 5 °C, seguido de un oreado con circulación de aire durante 8 horas a 10 °C, permitiendo de esta manera reducir la humedad y favorecer la formación de una película en la superficie de las muestras. Posteriormente, se llevó a cabo el ahumado emparrillado y el procedimiento consistió en las siguientes etapas:

- Etapa 1: Secado: 30 ± 4 minutos a 30 °C.
- Etapa 2: Cocción: 45 ± 5 minutos a 60-70 °C.
- Etapa 3: Deshidratado: 60 ± 5 minutos a 45-50 °C.

Una vez obtenidos los filets de trucha ahumada, se llevó a cabo el emprolijado de los mismos. Con los recortes generados se elaboró el paté ahumado, triturando la materia prima hasta obtener una pasta fina y de consistencia homogénea. A partir de esta base, se diseñaron dos formulaciones mencionadas en la Tabla 1.

El producto final fue envasado en recipientes de vidrio de 250 cm³ y posteriormente sometido a un proceso de pasteurización de $85 \pm 5^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, con el fin de garantizar la inocuidad de los productos.

Posteriormente se evaluaron los posibles indicadores de contaminación BAM (ISO 4833), Coliformes totales (ISO 4832), *Escherichia coli* (ICMSF), Hongos y Levaduras (ISO 21527-2:2008), *Staphylococcus aureus* (IRAM 15115-2), *Listeria monocytogenes* (USDA-FSIS) antes de su consumo.

Tabla 1. Formulación de las muestras ensayadas de Trucha Arcoíris ahumada

Ingredientes	Formulación M-01	Formulación A-01
Pasta de pescado (%)	42,3	42,3
Manteca (%)	12,3	-----
Harina de trigo (%)	8,6	10,45
Crema de leche (%)	18,4	18,4
Leche entera (%)	18,4	18,4
Aceite vegetal (%)	-----	10,45

Asimismo, se determinó la composición nutricional de las diferentes muestras (Humedad AOAC 950.46B, Cenizas AOAC 942.05, Grasas AOAC 991.3, Proteínas (Kjeldahl), Carbohidratos y valor energético (por cálculo) y se evaluaron los atributos sensoriales de color, olor, sabor y la aceptabilidad entre ambas formulaciones. La evaluación sensorial se llevó a cabo con un panel de 90 consumidores, comprendiendo un rango etario de 18 a 65 años. Las muestras de cada tratamiento se sirvieron untadas sobre una rodaja de pan sin sal como vector, a temperatura ambiente y en platos descartables con su respectivo código formado por tres dígitos al azar. Para cada consumidor se colocó un vaso con agua para neutralizar el sabor de su paladar antes y después de probar cada muestra a evaluar. A través de una prueba de comparación pareada (ISO 5495:2005), se identificaron las preferencias entre ambas formulaciones, así como los motivos de elección e intención de compra.

El procesamiento de los datos se realizó utilizando el software Microsoft Excel 2016, aplicando un análisis estadístico de diferencia binomial de dos colas con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3. Resultados y Discusión

Análisis Microbiológicos

De acuerdo con los resultados microbiológicos, ambas formulaciones presentaron una carga microbiana con valores dentro de los límites establecidos por el Código Alimentario Argentino (CAA, 2022) y ausencia de microorganismos patógenos que pudieran comprometer la inocuidad de los productos.

Composición proximal

Al analizar la composición proximal, se pudo observar que la Formulación M-01 presentó un mayor contenido de humedad (63,9%) en

comparación con la Formulación A-01 (61,4%). Esta diferencia podría explicarse por el hecho de que una mayor proporción de lípidos contribuye a una mayor retención de agua en el producto, siendo un efecto que se ve potenciado principalmente en matrices emulsificadas (Absalimova et al., 2025). Resultados similares fueron reportados en trucha arcoíris ahumada por Gaibor y Santos (1995), quienes observaron un contenido de agua aproximadamente dos veces superior al de productos de origen cárnico. Esta diferencia en la composición podría influir de manera directa en la percepción sensorial, particularmente en atributos como untuosidad y jugosidad del producto final (Villarreal et al., 2010).

En relación con el contenido de extracto etéreo, la Formulación M-01 presentó un valor significativamente superior (14,2%) en comparación con la Formulación A-01 (11,4%). Este resultado era esperable, dado que la inclusión de manteca en la formulación M-01 aportó un mayor contenido de lípidos, particularmente ácidos grasos saturados, incrementando de esta manera el valor porcentual en la muestra evaluada.

El contenido proteico no presentó diferencias significativas entre la formulación M-01 (11,7%) y la formulación A-01 (11,3%), lo cual podría atribuirse a la utilización de una proporción equivalente de pasta de trucha como ingrediente principal en ambas preparaciones. Los valores obtenidos se asemejan con los reportados por Aquerreta et al. (2002), para patés de atún (11%) y anchoveta (10%), pero un poco menor a los demostrados por (Villarreal et al., 2010) donde el pate de trucha presentó un 13,8% de proteína. Esta diferencia podría atribuirse a diversos factores, tal como la variabilidad en la edad o condiciones de cultivo de los especímenes, alimentación, diferencias en las proporciones en la formulación, etc.

Respecto a la cantidad de carbohidratos presentes, la Formulación A-01 presentó un valor superior (13,1%) frente a la Formulación M-01 (8,2%).

Estos valores están relacionados con la mayor proporción de hidratos de carbono incorporados en la muestra elaborada con aceite vegetal, con el fin de aumentar la emulsión y consistencia del producto.

En cuanto al valor energético, se observaron diferencias mínimas entre las formulaciones evaluadas, registrándose 201,8 kcal/100 g en la Formulación A-01 y 205,8 kcal/100 g en la Formulación M-01 respectivamente.

Tabla 2. Comparación de los resultados microbiológicos entre ambas formulaciones

Parámetro	Formulación M-01	Formulación A-01
Bacterias mesófilas aerobias	260 UFC/g	50 UFC/g
Coliformes totales	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1g	Ausencia en 1g
<i>Staphylococcus aureus</i>	<100 UFC/g	<100 UFC/g
Hongos y levaduras	<100 UFC/g	<100 UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25g	Ausencia en 25g

Tabla 3. Composición proximal de las formulaciones ensayadas.

Parámetro	formulación A	formulación B
Humedad (%)	63,9	61,4
Cenizas (%)	2,4	2,4
Grasas (%)	14,2	11,4
Proteínas (%)	11,3	11,7
Carbohidratos (%)	8,2	13,1
Valor energético (Kcal/100g)	205,8	201,8

Evaluación sensorial

El análisis sensorial demostró que la Formulación M-01 presentó una mayor aceptación global, con un 67% de preferencia, frente al 33% de la Formulación A-01, diferencias que resultaron ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 1).

Al analizar la percepción del sabor, la Formulación A-01 se identificó como un producto con sabor ahumado intenso y persistente en el paladar, mientras que la Formulación M-01 se percibió más suave y atenuado.

En cuanto a la textura, la muestra elaborada con manteca (Formulación M-01) fue caracterizada como más cremosa, untuosa, suave y homogénea, asociándose a un paté tradicional. En contraste, con la formulación A-01 la cual fue descrita como pastosa y ligeramente arenosa.

En el atributo olor, la Formulación A-01, fue mencionada por los consumidores con mayor

frecuencia ya que consideraron que presentaba un aroma más intenso, asociado directamente a la carne ahumada. En contraposición con la Formulación M-01 que se percibió con un aroma más tenue, lo que podría explicarse por un efecto de enmascaramiento del atribuido al incorporar el ingrediente manteca a la formulación.

Finalmente, en lo referente al color, no se registraron diferencias entre ambas formulaciones como tampoco fue señalado como un descriptor relevante por los consumidores durante la evaluación.

Asimismo, al analizar la intención de compra entre ambas formulaciones, se observó que el 90% de los participantes estaría dispuesto a adquirir el producto. Sin embargo, un 20% de los encuestados señalaron que la decisión final de compra estaría condicionada al precio de venta.



Figura 1. Porcentaje de respuestas de los consumidores según las muestras analizadas

De acuerdo con los resultados obtenidos, discriminados según los diferentes atributos evaluados, se pueden observar en la figura 2, la distribución comparativa entre las características sensoriales que obtuvieron mayor mención por los consumidores.

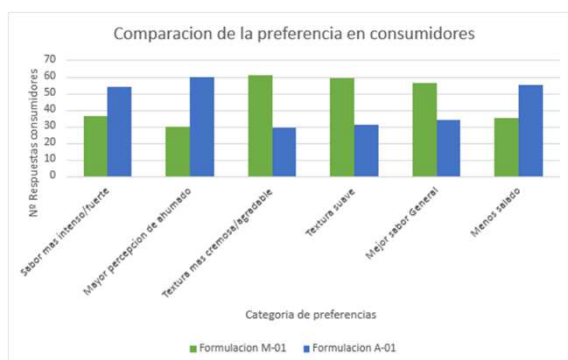


Figura 2. Distribución de los resultados de acuerdo con los principales atributos sensoriales

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron concluir que ninguna de las muestras evaluadas superó los límites microbiológicos establecidos por el Código Alimentario Argentino, confirmando características higiénico-sanitarias aptas para el consumo humano.

En cuanto a la composición proximal, la Formulación M-01, presentó un mayor contenido de grasas saturadas y humedad, obteniendo un producto alimenticio con características de textura cremosa, pero con un leve incremento en el valor energético. En contraposición, la formulación A-01 elaborada con aceite vegetal demostró un mayor aporte de hidratos de carbono, asociado a una textura más firme y compacta

Desde el punto de vista sensorial, la muestra formulada con manteca, M-01, obtuvo una mayor preferencia entre los consumidores, principalmente debido a su sabor ahumado más suave y textura untuosa, cremosa y homogénea.

El presente estudio demostró que el desarrollo de paté de trucha ahumada con valor agregado, utilizando ingredientes de origen vegetal, constituye una oportunidad para la diversificación de la industria acuícola argentina. Dicho trabajo evidenció que la preferencia del consumidor por el paté de trucha ahumada está influenciada principalmente por el sabor y la textura de los productos, siendo la Formulación M-01, elaborada con grasa semisólida la de mayor aceptación por parte del consumidor. Sin embargo, la Formulación A-01, con aceite vegetal, que ofrece un perfil nutricional más saludable podría posicionarse como una alternativa atractiva para consumidores que priorizan alimentos más ligeros y funcionales.

En este contexto, el presente estudio demostró que los productos con mayor contenido graso fueron los de mayor preferencia, lo que resalta la necesidad de avanzar en el desarrollo de nuevas formulaciones que permitan lograr productos de origen acuícola con valor agregado más saludables y que, a su vez, respondan a las expectativas de los consumidores, resultando esencial para mantener la competitividad del sector y satisfacer las demandas del mercado.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto de Investigación y Desarrollo PID-UTN I+D N°8627 "Desarrollo de productos alimenticios con valor agregado a partir de trucha arcoiris (*Oncorhynchus Mykiss*) producidas por acuicultura".

Parte de los resultados fueron presentados en el I Congreso Iberoamericano de Alimentos 4.0: Aplicaciones en Gastronomía y Agroindustria- Facultad de Ciencias de la Alimentación - Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER).

6. Referencias

Dirección de Acuicultura. (2022). Producción de acuicultura en Argentina durante el año 2022. Ministerio de Economía, Secretaría de Bioeconomía.

<https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/acu>

- [icultura/estadisticas_archivos/000000_Producción%20de%20Acuicultura%20en%20Argentina%20durante%20el%20año%202022.pdf](#)
- Hualde, P., Berenguer, P., & Moreno, P. (2010). Cría de truchas en pequeña escala (1a ed., p. 78). Neuquén: Edición propia. ISBN 978-987-05-8473-5
- International Organization for Standardization. (2003). ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C. ISO.
- International Organization for Standardization. (2006). ISO 4832:2006. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coliforms — Colony-count technique. ISO.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2002). Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management. Springer.
- International Organization for Standardization. (2008). ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity ≤ 0.95 . ISO.
- Instituto Argentino de Normalización y Certificación. (2008). IRAM 15115-2: Microbiología de alimentos — Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus aureus* — Parte 2. IRAM.
- U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. (2014). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg, and environmental samples (MLG 8.10). USDA-FSIS.
- AOAC International. (2006) Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). Association of Official Analytical Communities. Method 950.46.
- AOAC International. (2005) Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.). Association of Official Analytical Communities. Method 942.05.
- AOAC International. (2005) Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.). Association of Official Analytical Communities. Method 991.36.
- AOAC International. (2005) Official methods of analysis of AOAC International (18th ed.). Association of Official Analytical Communities. Method 981.10.
- International Organization for Standardization. (2005) Sensory analysis — Methodology — Paired comparison test (ISO 5495:2005). ISO.
- Microsoft Corporation. (2016) Microsoft Excel (Versión 2016) [Software]. Microsoft. <https://www.microsoft.com/>
- Código Alimentario Argentino. (2025). Código Alimentario Argentino Capítulo VI. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- Absalimova, M., Lee, J., Xiong, Y. L., Song, H., Kim, S. H., Jo, Y. J., & Choi, M. J. (2025). Impact of solid-to-liquid lipid ratio on the gelation and emulsion properties of lamb myofibrillar protein gels. Food Research International, 208, 116261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2025.116261>
- Gaibor, M., & Santos, H. (1995). Desarrollo tecnológico para procesar trucha arcoíris de humedad intermedia. Alimentos Ciencia e Ingeniería, 4(1), 34–46.
- Villarroel, M., Hazbun, J., & Morales, P. (2010). Desarrollo de una formulación de paté a base de descartes de pulpa de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 60(2), 199–204. Recuperado el 8 de septiembre de 2025 de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222010000200014&lng=es&tlng=es
- Aquerreta, Y., Astiasarán, I., Mohino, A., & Bello, J. (2002). Composition of pâtés elaborated with mackerel flesh (*Scomber scombrus*) and tuna liver (*Thunnus thynnus*):

Comparison with commercial fish pâtés.
Food Chemistry, 77(2), 147–153.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00333-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00333-1)



Estudio de zonas estructuralmente sensibles de un aneurisma cerebral empleando descriptores biomecánicos bajo la teoría de Kirchhoff-Love

Aldana Giménez¹, Brian Villegas¹, Nicolás Muzi^{2,3}, Daniel Millán^{*1,3}

1. Departamento de Ingeniería Mecánica, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo, San Rafael, M5600AGP, Mendoza, Argentina
2. Departamento de Física y Matemática, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo, San Rafael, M5600AGP, Mendoza, Argentina
3. Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria, CONICET - UNCUIYO, San Rafael, M5600AGP, Mendoza, Argentina

*E-mail: dmillan@fcai.uncu.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Aneurismas cerebrales
Descriptores biomecánicos
Rotura de aneurismas cerebrales

RESUMEN

La rotura de aneurismas intracraneales representa una de las principales causas de discapacidad y mortalidad en adultos. Comprender sus causas resulta de interés por su impacto en la prevención, diagnóstico y planificación de intervenciones endovasculares. En este trabajo se emplean herramientas software para caracterizar las variables biomecánicas relacionadas con zonas estructuralmente sensibles de la pared ante la acción de una carga localizada. A tal efecto, se simula la fuerza ejercida por un microcatéter sobre el lumen en 613 sitios de carga, en la región circundante al cuello de un aneurisma lateral, extraído de la base de datos AneuriskWeb. El estudio se lleva a cabo mediante simulaciones numéricas con aproximantes de superficies de subdivisión de Loop con control de borde, bajo un abordaje variacional por el método de Galerkin. Los programas se implementaron en C/C++ y Octave. Los resultados muestran que la máxima densidad de energía interna es el descriptor más significativo para analizar los efectos de cargas localizadas. Además, se observa una relación entre la curvatura gaussiana y la respuesta mecánica del material..

Study of structurally sensitive zones of a cerebral aneurysm using biomechanical descriptors under Kirchhoff-Love theory

KEYWORDS

Cerebral aneurysms
Biomechanical descriptors
Cerebral aneurysms rupture

ABSTRACT

Cerebral aneurysm rupture represents one of the leading causes of disability and mortality in adults. Understanding their underlying causes is of significant interest due to its impact in endovascular interventions prevention, diagnosis and planning. In this work, software tools are employed to characterize the biomechanical variables related to structurally sensitive regions of the wall under the action of a localized load. To this end, the force exerted by a microcatheter on the lumen is simulated at 613 loading sites in the region surrounding the neck of a lateral aneurysm, extracted from the AneuriskWeb database. The study is conducted through numerical simulations using Loop subdivision surface approximants with boundary control, under a variational approach via the Galerkin method. Software were implemented in C/C++ and Octave. Results show that the maximum internal energy density is the most significant descriptor for analyzing the effects of localized loads. Furthermore, a relationship between Gaussian curvature and the mechanical response of the material is observed.

1. Introducción

Los aneurismas cerebrales son una patología caracterizada por una dilatación anormal de la pared de las arterias cerebrales, con una prevalencia de entre el 2% y el 5% de la población adulta a nivel mundial (Vlak et al., 2011). Las muertes relacionadas con la rotura de aneurismas cerebrales constituyen alrededor del 25% de todas las muertes por accidente cerebro vascular (Wardlaw y White, 2000). Al detectarse un aneurisma, los especialistas están sujetos a la incertidumbre de ocluirlo o no, ya que las intervenciones para ocluir el aneurisma conllevan un riesgo no despreciable de rotura intraoperatoria. Este riesgo puede incrementarse debido a las fuerzas externas aplicadas cerca del cuello del aneurisma por los instrumentos utilizados durante el procedimiento, como ser la rotura de la arteria, lesiones en la túnica íntima, complicaciones tromboembólicas o perforaciones del domo del aneurisma (Humphrey y Canham, 2000; Lee et al., 2011).

El estudio de este problema implica considerar una estructura multicapa de materiales compuestos, cada uno con un comportamiento mecánico diferente (Frösen, 2014; Savastano et al., 2018). También, existe una notable variabilidad en la estructura y comportamiento mecánico en diferentes regiones de un aneurisma, por la presencia de trombos, calcificaciones y cambios en el espesor (Laurence et al., 2021). Se ha observado que el domo y la zona de transición del saco aneurismático cercana al cuello tienden a ser más rígidos en comparación con otras áreas, debido a una reorganización de la estructura de la pared sana (Savastano et al., 2018).

Existen diversas formas de modelar la falla por fractura de las paredes arteriales. Las más populares introducen discontinuidades en el campo de desplazamientos, lo que implica la necesidad de remallar el dominio computacional a medida que la fractura se propaga (Camacho y Ortiz, 1996). Alternativamente, existen otros métodos que enriquecen el espacio de las funciones base mediante la inserción de discontinuidades utilizando el método de partición de la unidad (Babuška y Melenk, 1997; Moës et al., 1999; Fries y Belytschko, 2010; Natarajan et al., 2011). Los enfoques descritos presentan buenos resultados en el análisis de geometrías sencillas. Sin embargo, las extensiones de estos modelos a problemas tridimensionales complejos conllevan grandes desafíos por el aumento de la complejidad de los algoritmos, así

como los códigos necesarios para resolver las casuísticas asociadas.

Adicionalmente, en el caso de láminas delgadas el análisis de la interacción entre la fractura y la forma de la superficie sobre la que ésta se propaga presenta múltiples desafíos, tanto desde el punto de vista del modelado mecánico como de su resolución y análisis computacional (Li y Arroyo, 2017; Mitchell y Mitchell, 2020). Sin embargo, recientes avances en modelos de campo de fase y las actuales prestaciones computacionales permiten realizar estudios sistemáticos que antes eran impracticables (Gültekin et al., 2016; Li et al., 2018; Gültekin et al., 2019). Estos avances ofrecen la posibilidad de modelar la propagación de fisuras en diversas patologías, desde aneurismas (Humphrey y Holzapfel, 2012; Kim et al., 2012) hasta arteriosclerosis (Holzapfel et al., 2004; Chatzizisis et al., 2007), o incluso en la disección de aorta (Criado, 2011; Roccabianca et al., 2014) y el desgarramiento de tendones (Lee et al., 1988; Weiss y Gardiner, 2001; Sharma y Maffulli, 2005). Racionalizar la interrelación entre el mecanismo de fractura en materiales débilmente anisotrópicos y la geometría de la superficie, en combinación con grandes deformaciones, constituye actualmente un conjunto de problemas abiertos (Kamrin, K., 2017). En particular, la curvatura de Gauss, que describe la forma intrínseca de la superficie, puede influir de manera significativa en cómo se inicia la rotura y cómo se propaga (Vaziri y Mahadevan, 2008). Debido a esto, resulta de interés analizar las variables biomecánicas y geométricas observadas al someter a la pared arterial a cargas externas.

Dadas las características de la patología, puede utilizarse un modelo de láminas delgadas para describir su comportamiento mecánico. En particular, el modelo de láminas delgadas de Kirchhoff-Love considera que las deformaciones y tensiones son uniformes a lo largo del espesor. Es decir, se asume que no existen tensiones de corte, lo que permite describir la cinemática empleando únicamente deformaciones de membrana y de flexión.

En este trabajo, se modeló la aplicación de una carga localizada emulando la acción del microcatéter sobre la pared arterial en la región cercana al cuello de un aneurisma lateral. Se seleccionaron 613 puntos de carga diferentes, y se analizaron variables biomecánicas observadas en dichas simulaciones. En la sección 2 se presenta la base de datos utilizada y se hace una breve descripción del modelo de láminas delgadas geoméricamente no lineal, así como de la

carga aplicada, la implementación numérica y la consideración de espesor variable. En la sección 3 se analizan los resultados obtenidos para los sitios de carga considerados. Las conclusiones se detallan en la sección 4.

2. Materiales y métodos

Base de datos utilizada

La base de datos utilizada proviene del proyecto Aneurisk, realizado entre 2005 y 2008, y financiado por SIEMENS Medical Solutions en colaboración con varias instituciones médicas (Aneurisk-Team, 2012). La misma incluye 103 modelos geométricos de aneurismas intracraneales de 99 pacientes, obtenidos a partir de angiografías rotacionales 3D, de las cuales 23 imágenes médicas 3D están disponibles en la base de datos. Estas imágenes tienen una resolución espacial de 0.3 mm (256 x 256 x 256) y fueron segmentadas mediante un proceso semi-automatizado (Piccinelli et al., 2009) validado

por un experto. En particular se analiza el caso 0034, un aneurisma lateral ubicado en la arteria carótida interna extraído de una paciente femenina de 42 años de edad, ver Figura 1. Puede encontrarse una versión curada y organizada de todos los modelos geométricos de la base de datos en el repositorio de GitHub del software AneuSI (Muzi y Millán, 2025), utilizado para la extracción automática del aneurisma y su entorno a partir del modelo del árbol arterial.

Modelo elástico geoméricamente no lineal de láminas delgadas

La cinemática de deformación se describe mediante un modelo geoméricamente no lineal de láminas delgadas bajo la teoría de Kirchhoff-Love, la cual establece que las fibras normales a la lámina media se mantienen rectas y ortogonales durante la deformación, lo que implica despreciar la deformación por corte. El cuerpo de la lámina delgada "S" está dado por:

$$\mathcal{S} = \left\{ \Phi \subset \mathbb{R}^3 \mid \Phi = \varphi(\xi^\alpha) + \xi \mathbf{t}(\xi^\alpha), -\frac{h(\xi^\alpha)}{2} \leq \xi \leq \frac{h(\xi^\alpha)}{2}, (\xi^1, \xi^2) \in \mathcal{A} \right\} \quad (1)$$

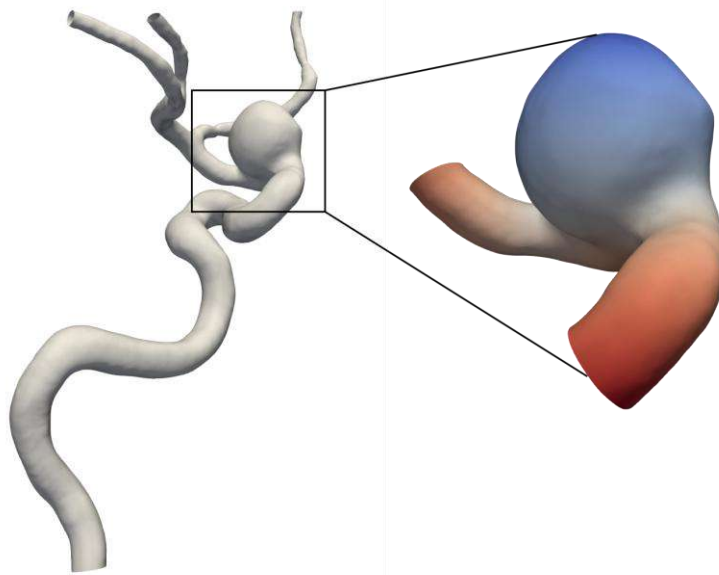


Figura 1. Modelo geométrico del caso C0034 de la base de datos AneuriskWeb, con el detalle del modelo aislado utilizado para realizar las simulaciones en este trabajo. Este caso corresponde a un aneurisma lateral ubicado en la arteria carótida interna

donde $\mathcal{A} \subset \mathbb{R}^2$ es el espacio paramétrico para la superficie media, siendo φ la función de mapeo en \mathbb{R}^3 .

Por lo tanto, vemos una configuración como un mapeo de un dominio paramétrico $\mathcal{A} \times [-h/2, h/2]$ en \mathbb{R}^3 . El dominio paramétrico se describe

mediante las coordenadas $\{\xi^1, \xi^2, \xi^3\}$ (donde identificamos ξ^3 en la dirección normal), cuya base dual correspondiente es $\{E^i\}$.

El elemento área de la superficie media deformada se define como $d\Omega = \underline{j} d\xi^1 d\xi^2$, donde $\underline{j} = \|\boldsymbol{\varphi}_{,1} \times \boldsymbol{\varphi}_{,2}\|$ y la normal unitaria es $\mathbf{t} = (\boldsymbol{\varphi}_{,1} \times \boldsymbol{\varphi}_{,2})/\underline{j}$. El tensor de deformación de membrana, que mide cambios en el tensor métrico sobre el plano, se define como

$$\varepsilon_{\alpha\beta} = \frac{1}{2}(\boldsymbol{\varphi}_{,\alpha} \cdot \boldsymbol{\varphi}_{,\beta} - \boldsymbol{\varphi}_{0,\alpha} \cdot \boldsymbol{\varphi}_{0,\beta}). \quad (2)$$

El tensor de deformación de flexión, que mide cambios en la segunda forma fundamental, está dado por

$$\rho_{\alpha\beta} = \boldsymbol{\varphi}_{,\alpha} \cdot \mathbf{t}_{,\beta} - \boldsymbol{\varphi}_{0,\alpha} \cdot \mathbf{t}_{0,\beta}. \quad (3)$$

Modelo de carga puntual

El trabajo externo que realiza la fuerza puntual del microcatéter se modela por una función tipo *Plateau* que decae en función de la distancia geodésica, expresada como:

$$\hat{q}(r) = \frac{\hat{C}}{2\pi\sigma^2} \frac{\exp\left[-\frac{1}{4}\left(\frac{r}{\sigma}\right)^4\right]}{1 + \exp\left[-\frac{1}{4}\left(\frac{r}{\sigma}\right)^4\right]}, \quad (4)$$

donde r representa la distancia radial, σ es un parámetro que controla el ancho de la función, y \hat{C} es una constante determinada de manera que la integral de $\hat{q}(r)$ sea igual a uno (Muzi *et al.*, 2021). Utilizando esta función sobre la superficie de la lámina, el radio r es reemplazado por la distancia geodésica d_G , y la carga aplicada es $\mathbf{q} = Q\hat{q}(d_G)\mathbf{t}_0$, donde Q es un valor de carga de 100 mmHg y $\sigma = 0.25$ mm.

Energía total

Para una lámina elástica, la energía potencial se expresa exclusivamente en función del mapeo ϕ a la superficie media, y se escribe como:

$$\begin{aligned} \Pi_{tot}[\boldsymbol{\varphi}] &= \Pi_{int}[\boldsymbol{\varphi}] - \Pi_{ext}[\boldsymbol{\varphi}] \\ &= \int_{\Omega_0} W(\varepsilon, \rho) d\Omega_0 + \int_{\Omega_0} \mathbf{q} \cdot (\boldsymbol{\varphi} - \boldsymbol{\varphi}_0) d\Omega_0, \end{aligned} \quad (5)$$

donde W es la densidad de energía de deformación por unidad de superficie y \mathbf{q} es la carga externa por unidad de área.

Implementación numérica

Para el cálculo de la energía total es necesario obtener la derivada segunda de las deformaciones de la lámina, lo que requiere emplear funciones base con continuidad C^1 para aplicar una discretización de Galerkin. En particular se emplean aproximantes de superficies de subdivisión de Loop con control de borde (Cirak y Long, 2011), lo que permite describir la superficie media de la configuración de referencia como

$$\boldsymbol{\varphi}_{0h}(\xi^1, \xi^2) = \sum_{a=1}^N B_a(\xi^1, \xi^2) \boldsymbol{\varphi}_{0a}, \quad (6)$$

donde $B_a(\xi^1, \xi^2)$ son funciones base de superficies de subdivisión, N es el número de nodos de la malla computacional y $\boldsymbol{\varphi}_{0a}$ la posición en el espacio del a -ésimo punto de control definiendo la superficie media de la configuración de referencia.

El espesor de la lámina se discretiza y varía según una función que depende de la distancia geodésica d_G desde cada punto hasta la curva que define el cuello del aneurisma (Muzi *et al.*, 2021). Este espesor varía de forma continua desde un valor de 300 μm en la arteria sana hasta 50 μm en el domo del saco aneurismático, en base a valores reportados en literatura especializada. El mismo criterio se utilizó para el módulo de elasticidad, donde se utilizaron valores de 2 y 4 MPa para la arteria sana y el aneurisma respectivamente, teniendo en cuenta la variación de las propiedades mecánicas del tejido enfermo. La energía total se expresa en función de las variables nodales $a = 1, 2, \dots, N$, que se minimiza respecto a los grados de libertad dados por la deformación usando el método de Newton-Raphson, combinado con un método de búsqueda lineal dirigida por gradientes. Esto se repite hasta alcanzar el criterio de convergencia, luego se selecciona otro punto de carga y se repite todo el proceso.

Para las simulaciones, se utilizó un entorno de herramientas *software* en C++, desarrollado por el grupo de Modelado Computacional en Ciencias Aplicadas e Ingeniería (MoCCAI, <https://icai.conicet.gov.ar/grupos/grupo-moccai>), para calcular las deformaciones finitas en láminas delgadas hiperelásticas, a partir de los supuestos de Kirchhoff-Love y la consideración de un espesor no uniforme. En total, se llevaron a cabo 613 experimentos, cada uno correspondiente a un punto de carga distinto. Los puntos de carga se seleccionaron de tal forma que se encuentran a una distancia geodésica al *ostium* de 0.5 a 1.5 mm, y garantizando una distancia

mínima de 0.165 mm entre puntos adyacentes, ver Figura 2, dando como resultado una "bufanda" de sitios distribuidos de forma aproximadamente uniforme.

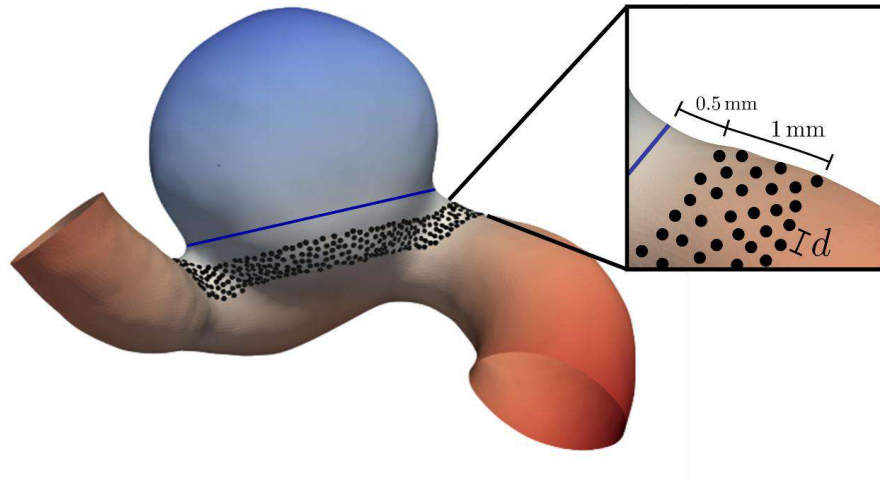


Figura 2. Detalle de los 613 puntos de carga. Estos se encuentran limitados en una región cercana al cuello del aneurisma formando una "bufanda", donde los puntos se encuentran a una distancia de entre 0.5 mm y 1.5 mm de la curva que define el cuello (azul). Cada punto representa un experimento individual, y está separado de puntos adyacentes por una distancia d mayor o igual a 0.165 mm. El mapa de colores indica la distancia geodésica al cuello del aneurisma.

3. Resultados y Discusión

Se analizaron diversos descriptores biomecánicos, incluyendo la densidad de energía elástica total, de membrana, de flexión y externa (en sus valores máximo, promedio y mínimo), la diferencia de curvatura gaussiana, y la magnitud del desplazamiento de la superficie media, así como el espesor local de la lámina y el aporte de la carga externa. El postproceso de los datos se realizó en el software Octave (Eaton et al., 2024), donde se ingresaron los resultados de las 613 simulaciones para identificar los puntos críticos. Estos puntos, que se destacan por tener los valores más altos de los descriptores antes mencionados, fueron seleccionados para un estudio detallado en ParaView (Ayachit, 2015).

La densidad de energía interna se identificó como el parámetro más influyente debido a su estrecha asociación con la energía requerida para la formación de fracturas. La densidad de energía interna combina la energía de membrana y la energía de flexión, proporcionando una medida integral de la energía almacenada en el material.

En la Figura 3 se observan los puntos de carga que poseen una alta acumulación de energía. La evaluación se realizó sobre el campo de curvatura de

Gauss del modelo de referencia, lo que proporciona un contexto adicional sobre cómo la variación en la curvatura puede afectar la distribución de esta energía y, en consecuencia, indicar la posible rotura de la pared.

En contraparte, en la Figura 4 se representan los puntos de carga que contienen una menor densidad de energía máxima. Estos resultados revelan una importante relación entre la geometría de la superficie y la respuesta mecánica del material. Se encontró que los puntos con menor densidad de energía interna se localizan en áreas con curvatura gaussiana negativa, mientras que aquellos con mayor densidad de energía interna se ubican en regiones con curvatura gaussiana igual a cero. Esta distribución sugiere que la alta acumulación de energía interna en zonas con curvatura cero puede ser indicativa de un mayor riesgo de fracturas, ya que esta acumulación de energía puede predisponer al material a fallos bajo condiciones de carga.

En contraste, el análisis del desplazamiento de la configuración deformada en comparación con la configuración de referencia fue desestimado como indicador mecánico confiable. La inspección visual de los resultados indica que estos desplazamientos están influenciados por movimientos de cuerpo rígido (rotaciones) del aneurisma, en contraposición con deformaciones relativas significativas del

material. Debido a ello, se considera que los desplazamientos de la malla no proporcionan una indicación precisa del estado mecánico del material, y en su lugar se recomienda utilizar información relacionada con las deformaciones relativas.

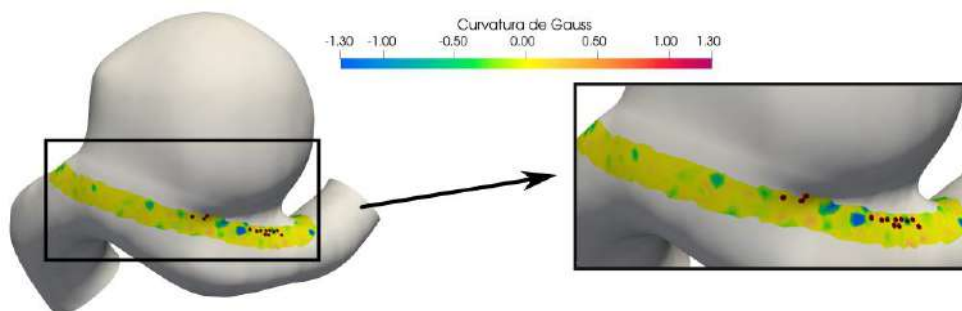


Figura 3. El mapa de colores corresponde a la curvatura de Gauss del modelo de referencia calculada en los 613 nodos. Los círculos rojos representan los 13 puntos de carga con mayores densidades de energía.

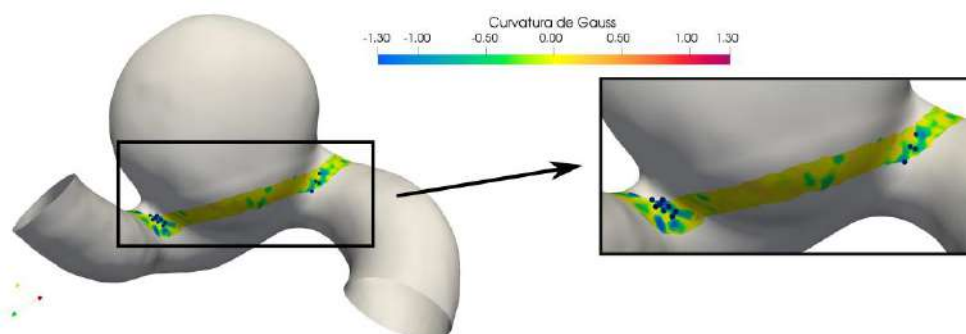


Figura 4. El mapa de colores corresponde a la curvatura de Gauss del modelo de referencia calculada en 613 puntos. Los círculos azules representan los 13 puntos de carga con menores densidades de energía interna

Por último, en las Figuras 5 y 6 se presenta una comparación entre los puntos de carga que exhiben la mayor y la menor densidad de energía interna. En la Figura 5, correspondiente al punto con mayor densidad, se identifica una concentración localizada de energía en una región específica del cuello del aneurisma, con una distribución puntual claramente definida, lo que se refleja en la zona más cálida del mapa de colores. Esta acumulación sugiere una respuesta estructural más severa ante la carga aplicada, lo que podría indicar una mayor susceptibilidad al daño en esa zona. En contraste, en la Figura 6, que representa el punto con menor densidad de energía interna, la respuesta es más difusa y de baja magnitud, sin zonas críticas claramente delimitadas. Esta comparación destaca la importancia de la posición del microcatéter en relación con el comportamiento mecánico de la

pared del aneurisma, ya que pequeñas variaciones en el punto de contacto pueden generar respuestas biomecánicas significativamente distintas.

A fin de complementar estos resultados, se llevó a cabo una simulación de dinámica de fluidos computacional, bajo el supuesto de pared rígida, sobre el caso C0034 de la base de datos. Esta simulación permite obtener el campo de esfuerzo cortante sobre la pared (WSS, por sus siglas en inglés), el cual es un factor hemodinámico que está vinculado con el crecimiento y desarrollo de aneurismas cerebrales (Shaaban y Duerinckx, 2000; Sforza et al., 2009). La magnitud del WSS se visualiza en la Figura 7, donde se observa un valor máximo localizado en la región proximal del cuello del aneurisma.

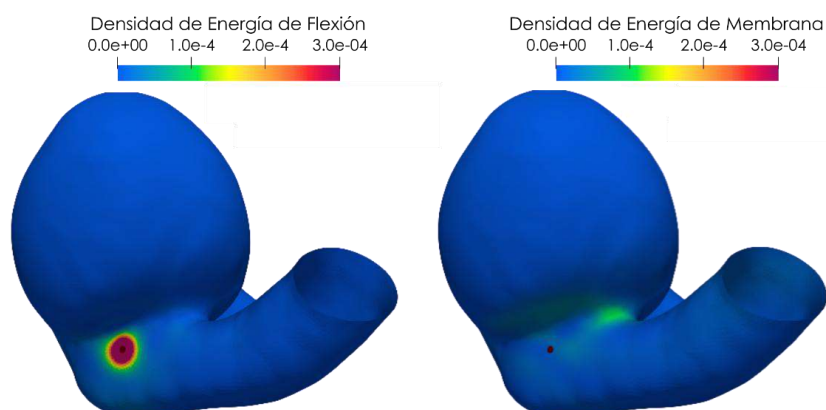


Figura 5. El mapa de colores indica los diferentes tipos de energía interna en el punto de carga, que posee la mayor densidad de energía interna. Este punto es representado por un círculo de color rojo. Los valores de energía están expresados en J/mm².

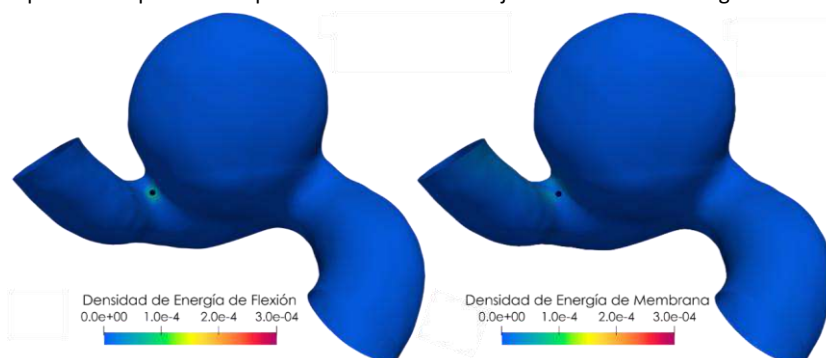


Figura 6. El mapa de colores indica los diferentes tipos de energía interna en el punto de carga que posee la menor densidad de energía interna. Este punto es representado por un círculo de color azul. Los valores de energía están expresados en J/mm².

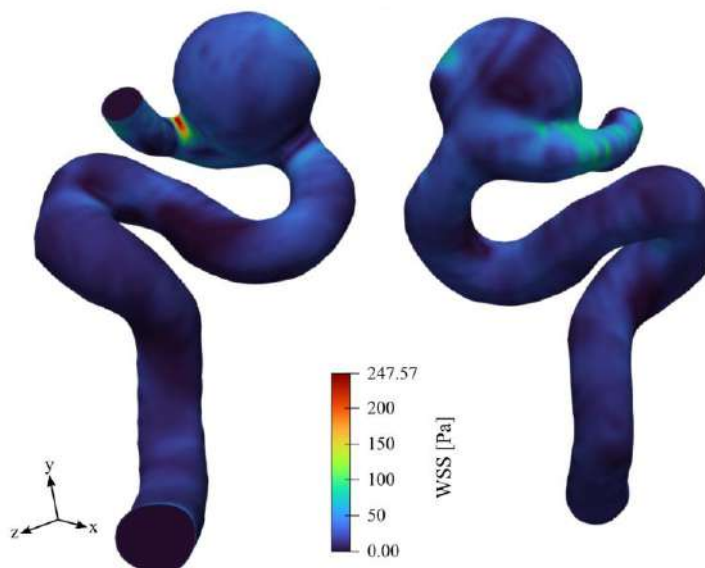


Figura 7. Magnitud del WSS del caso C0034 de la base de datos. Se observa un valor elevado en la región proximal del cuello.

Esta zona de WSS elevado coincide espacialmente con la región identificada previamente como estructuralmente sensible según la densidad de energía interna máxima de la Figura 6. Esta concordancia sugiere una correlación entre los esfuerzos hemodinámicos ejercidos sobre la superficie interna de la pared y la acumulación de energía mecánica en el material, lo cual refuerza la hipótesis de que el cuello representa una zona vulnerable. Aunque el enfoque del presente trabajo se centra en el modelado de la pared arterial y no incluye un análisis hemodinámico detallado, la coincidencia entre estas variables apoya la validez de los descriptores biomecánicos utilizados como predictores de zonas propensas a romper.

4. Conclusiones

Este trabajo presenta resultados sobre la selección de parámetros mecánicos relevantes para el análisis del fenómeno de rotura. Se aplicó una carga localizada de forma sistemática en distintas posiciones, emulando la acción de un microcatéter en puntos cercanos al cuello del aneurisma.

Los resultados obtenidos evidencian que la densidad de energía interna constituye el descriptor biomecánico más significativo para identificar zonas críticas en la superficie del aneurisma. Este parámetro, que integra los aportes de energía de membrana y de flexión, mostró una fuerte correlación con la geometría local, particularmente con regiones de curvatura gaussiana nula, donde se concentran los valores máximos. Además, se observó una coincidencia espacial entre las zonas de mayor densidad de energía interna y las regiones de mayor esfuerzo cortante (WSS) en simulaciones hemodinámicas, lo cual refuerza la hipótesis sobre la vulnerabilidad del cuello aneurismático. En contraste, el análisis del desplazamiento absoluto de la configuración deformada fue desestimado como un indicador confiable del estado mecánico, debido a su variabilidad ante movimientos globales del aneurisma - rotaciones, lo que sugiere la necesidad de utilizar descriptores basados en deformaciones relativas.

5. Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por los Proyectos de Fortalecimiento en Ciencia y Técnica 2025-2027 SIIP-UNCUYO 80020240400105UN y el Proyecto de Investigación 2025-2027 SIIP-UNCUYO 80020240100464UN.

6. Referencias

- Aneurisk-Team. (2012). AneuriskWeb project website. Emory University, Department of Mathematics and Computer Science. <http://ecm2.mathcs.emory.edu/aneuriskweb>. Accedido por última vez: 18 de julio de 2025.
- Ayachit, U. (2015). The paraview guide: a parallel visualization application. Kitware, Inc.
- Babuška, I., & Melenk, J. M. (1997). The partition of unity method. *International journal for numerical methods in engineering*, 40(4), 727-758.
- Camacho, G. T., & Ortiz, M. (1996). Computational modelling of impact damage in brittle materials. *International journal of solids and structures*, 33(20-22), 2899-2938.
- Chatzizisis, Y. S., Coskun, A. U., Jonas, M., Edelman, E. R., Feldman, C. L., & Stone, P. H. (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the american college of cardiology*, 49(25), 2379-2393.
- Cirak, F., & Long, Q. (2011). Subdivision shells with exact boundary control and non-manifold geometry. *International journal for numerical methods in engineering*, 88(9), 897-923.
- Criado, F. J. (2011). Aortic dissection: a 250-year perspective. *Texas heart institute journal*, 38(6), 694.
- Eaton, J. W., Bateman, D., Hauberg, S., & Wehbring, R. (2024). GNU Octave version 9.1.0 manual: A high-level interactive language for numerical computations. <https://www.gnu.org/software/octave/doc/v9.1.0/>
- Fries, T. P., & Belytschko, T. (2010). The extended/generalized finite element method: An overview of the method and its applications. *International Journal for numerical methods in engineering*, 84(3), 253-304.
- Frösen, J. (2014). Smooth muscle cells and the formation, degeneration, and rupture of saccular intracranial aneurysm wall—a review of current pathophysiological knowledge. *Translational stroke research*, 5(3), 347-356.
- Gültekin, O., Dal, H., & Holzapfel, G. A. (2016). A phase-field approach to model fracture of arterial walls: theory and finite element analysis. *Computer methods in applied*

- mechanics and engineering, 312, 542-566.
- Gültekin, O., Dal, H., & Holzapfel, G. A. (2018). Numerical aspects of anisotropic failure in soft biological tissues favor energy-based criteria: A rate-dependent anisotropic crack phase-field model. *Computer methods in applied mechanics and engineering*, 331, 23-52.
- Gültekin, O., Hager, S. P., Dal, H., & Holzapfel, G. A. (2019). Computational modeling of progressive damage and rupture in fibrous biological tissues: application to aortic dissection. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 18, 1607-1628.
- Holzapfel, G. A., Sommer, G., & Regitnig, P. (2004). Anisotropic mechanical properties of tissue components in human atherosclerotic plaques. *Journal of biomechanical engineering*, 126(5), 657-665.
- Humphrey, J. D., & Canham, P. B. (2000). Structure, mechanical properties, and mechanics of intracranial saccular aneurysms. *Journal of elasticity and the physical science of solids*, 61, 49-81.
- Humphrey, J. D., & Holzapfel, G. A. (2012). Mechanics, mechanobiology, and modeling of human abdominal aorta and aneurysms. *Journal of biomechanics*, 45(5), 805-814.
- Lee, J. Y., Seo, J. H., Cho, Y. D., Kang, H.-S., & Han, M. H. (2011). Endovascular treatment of wide-neck intracranial aneurysms using a microcatheter protective technique: results and outcomes in 75 aneurysms. *American journal of neuroradiology*, 32(5), 917-922.
- Kamrin, K. (2017). Cracks by design. *Nature Materials*, 16(1), 8-9.
- Kim, J. H., Avril, S., Duprey, A., & Favre, J. P. (2012). Experimental characterization of rupture in human aortic aneurysms using a full-field measurement technique. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 11, 841-853.
- Laurence, D. W., Homburg, H., Yan, F., Tang, Q., Fung, K. M., Bohnstedt, B. N., ... & Lee, C. H. (2021). A pilot study on biaxial mechanical, collagen microstructural, and morphological characterizations of a resected human intracranial aneurysm tissue. *Scientific reports*, 11(1), 3525.
- Lee, J. K., Yao, L., Phelps, C. T., Wirth, C. R., Czajka, J. O. H. N., & Lozman, J. (1988). Anterior cruciate ligament tears: MR imaging compared with arthroscopy and clinical tests. *Radiology*, 166(3), 861-864.
- Li, B., & Arroyo, M. (2017). Towards understanding the geometry effects on fracture in thin elastic shells. Preprint arXiv:1703.09371.
- Li, B., Millán, D., Torres-Sánchez, A., Roman, B., & Arroyo, M. (2018). A variational model of fracture for tearing brittle thin sheets. *Journal of the mechanics and physics of solids*, 119, 334-348.
- Mitchell, N., & Mitchell, N. (2020). Fracture in sheets draped on curved surfaces. *Geometric control of fracture and topological metamaterials*, 17-30.
- Moës, N., Dolbow, J., & Belytschko, T. (1999). A finite element method for crack growth without remeshing. *International journal for numerical methods in engineering*, 131-15.
- Muzi, N., & Millán D. (2025). AneuSI GitHub project <https://github.com/nmuzi/AneuSI> Accedido por última vez: 18 de julio de 2025.
- Muzi, N., Camussoni, F., Moyano, L. G., & Millán, D. (2021). Characterizing the biomechanics of an endovascular intervention in cerebral aneurysms using Kirchhoff-Love shells of nonuniform thickness. In *International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention* (pp. 39-52). Cham: Springer International Publishing.
- Muzi, N., Camussoni, F., Moyano, L. G., & Millán, D. (2022). Computational biomechanics for medicine. *MICCAI 2022*. Springer, Cham.
- Natarajan, S., Baiz, P. M., Bordas, S., Rabczuk, T., & Kerfriden, P. (2011). Natural frequencies of cracked functionally graded material plates by the extended finite element method. *Composite structures*, 93(11), 3082-3092.
- Piccinelli, M., Veneziani, A., Steinman, A., Remuzzi, A., & Antiga, L. (2009). A framework for geometric analysis of vascular structures: application to cerebral aneurysms. *IEEE Transactions on medical imaging*, 28(8):1141-1155.
- Roccabianca, S., Ateshian, G. A., & Humphrey, J. D. (2014). Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 13, 13-25.
- Savastano, L. E., Bhambri, A., Wilkinson, D. A., & Pandey, A. S. (2018). Biology of cerebral aneurysm formation, growth, and rupture. In *Intracranial aneurysms* (17-32). Academic Press.
- Sforza, D. M., Putman, C. M., & Cebal, J. R. (2009). Hemodynamics of cerebral aneurysms. *Annual review of fluid mechanics*, 41(1), 91-107.

- Shaaban, A. M., & Duerinckx, A. J. (2000). Wall shear stress and early atherosclerosis: a review. *American journal of roentgenology*, 174(6), 1657-1665.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *The journal of bone & joint surgery*, 87(1), 187-202.
- Tulamo, R., Frösen, J., Hernesniemi, J., & Niemelä, M. (2018). Inflammatory changes in the aneurysm wall: a review. *Journal of neurointerventional surgery*, 10(1), i58-i67.
- Vaziri, A., & Mahadevan, L. (2008). Localized and extended deformations of elastic shells. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(23), 7913-7918.
- Vlak, M. H., Algra, A., Brandenburg, R., & Rinkel, G. J. (2011). Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis. *The lancet neurology*, 10(7), 626-636.
- Wardlaw, J. M., & White, P. M. (2000). The detection and management of unruptured intracranial aneurysms. *Brain*, 123(2), 205-221.
- Weiss, J. A., & Gardiner, J. C. (2001). Computational modeling of ligament mechanics. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 29(3).



Liofilización de levaduras no-*Saccharomyces* pectinolíticas para la producción de starters enológicos

María Eugenia Sevillano^{1,2}, Vilma Inés Morata^{3,4}, María Carolina Martín^{3,4*}

1. Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO), Chacras de Coria M5528AHB, Mendoza, Argentina.
2. Grupo de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) / Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); Chacras de Coria M5528AHB, Mendoza, Argentina.
3. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria (FCAI), Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.
4. Grupo de Biotecnología Enológica, Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (ICAI), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) / Universidad Nacional de Cuyo (UNCUYO); San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.

*E-mail: [*mcmartin@fcai.uncu.edu.ar](mailto:mcmartin@fcai.uncu.edu.ar)

PALABRAS CLAVES

Liofilización
Aureobasidium pullulans
Actividad pectinolítica
Levaduras secas activas

RESUMEN

Se evaluó un protocolo de liofilización para la conservación y producción de un starter de *Aureobasidium pullulans* m11-2, una cepa autóctona de la región vitivinícola Oasis Sur de Mendoza (Argentina), con capacidades de producir enzimas pectinolíticas de interés enológico. La cepa fue cultivada en condiciones controladas, cosechada en fase exponencial y sometida a liofilización en presencia de distintas soluciones lioprotectoras. Su viabilidad y funcionalidad enzimática fueron determinadas durante 18 meses. Glutamato de sodio (2,4%) fue el lioprotector más eficaz, al permitir conservar tanto la viabilidad celular como la actividad pectinolítica tras períodos prolongados de almacenamiento a 4 °C. La actividad enzimática fue evaluada de forma cualitativa mediante la formación de halos de clarificación en placas, que se mantuvieron proporcionales al tamaño de las colonias. Dado que preservar la funcionalidad de levaduras no-*Saccharomyces* representa un desafío biotecnológico relevante, este trabajo presenta un protocolo estandarizado para la obtención de levaduras secas activas (starters) con actividad enzimática, aportando una alternativa útil para su uso industrial en procesos de vinificación.

Freeze-drying of pectinolytic non-*Saccharomyces* yeasts for enological starter production

KEYWORDS

Freeze-drying,
Aureobasidium pullulan
Pectinolytic enzymes
Active dry yeasts.

ABSTRACT

A freeze-drying protocol was evaluated for the preservation and production of a starter culture of *Aureobasidium pullulans* m11-2, an indigenous strain from the Oasis Sur wine region of Mendoza, Argentina, with the capacity to produce pectinolytic enzymes of enological interest. The strain was cultivated under controlled conditions, harvested at the exponential growth phase, and subjected to freeze-drying in the presence of different lyoprotectant solutions. Its viability and enzymatic functionality were assessed over 18 months. Sodium glutamate (2.4%) was the most effective lyoprotectant, allowing the preservation of both cell viability and pectinolytic activity during prolonged storage at 4 °C. Enzymatic activity was qualitatively evaluated by halo formation on agar plates, which remained proportional to colony size. Since preserving the functionality of non-*Saccharomyces* yeasts represents a relevant biotechnological challenge, this work presents a standardized protocol for obtaining active dry yeasts (starters) with enzymatic activity, providing a useful alternative for their industrial application in winemaking processes.

1. Introducción

La vinificación es un proceso microbiológico dinámico que involucra una amplia diversidad de géneros, especies y cepas de levaduras. Si bien la especie que se encarga de llevar a cabo la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*, estudios previos demuestran que existen otras levaduras en las primeras etapas de la vinificación (Barata et al., 2012). En los últimos años, ha crecido el interés en la utilización de levaduras no-*Saccharomyces* durante el proceso de vinificación para contribuir a mejorar la calidad del vino obtenido, debido a sus grandes potencialidades (Martín et al., 2024).

Dentro de este grupo de microorganismos se encuentra *Aureobasidium pullulans*, una de las especies más abundante en la superficie de la uva, en el mosto fresco y en etapas muy tempranas de fermentación (Merín et al., 2015; Pinto et al., 2015; Sternes et al., 2017). *A. pullulans* es un hongo euascomycete dimórfico, el cual presenta innumerables aplicaciones a nivel industrial. En vinificación tiene gran importancia por su capacidad de producir enzimas tales como pectinasas, celulasas, proteasas, lipasas, xilanasas, lacasas, amilasas, entre otras (Oskay, 2022). Particularmente, las pectinasas cumplen un rol fundamental en la degradación de la pectina presente en la pared celular de la uva, facilitando la extracción del jugo, optimizando el prensado, mejorando la clarificación y filtración del vino, y promoviendo la liberación de compuestos de color y sabor que se encuentran atrapados en la piel de la uva (Claus & Mojsov, 2018; Longhi et al., 2022; Río Segade et al., 2015).

En este contexto, diversas investigaciones han explorado el uso de cultivos iniciadores (starters) mixtos, que combinan cepas no-*Saccharomyces* con *S. cerevisiae*, con el fin de generar enzimas in situ y lograr vinos de mayor calidad (Binati et al., 2019; Buzzini Pietro et al., 2017; Y. Chen et al., 2022; Pietrafesa et al., 2020). Para ello, es necesario que los cultivos iniciadores se mantengan viables y en cantidad suficiente para que, al ser inoculados en los mostos, desempeñen adecuadamente sus funciones.

Una de las estrategias más utilizadas para conservar cepas microbianas y mantener sus actividades biológicas a largo plazo es la liofilización. Este proceso permite prolongar la vida útil de los microorganismos, posibilitando el almacenamiento de grandes volúmenes en forma de polvo durante más de un periodo de vendimia, sin pérdida de propiedades fermentativas y/u organolépticas, con

beneficios financieros y protección frente a la contaminación (Nikolaou et al., 2020). En vinificación, se aplica para la obtención de cultivos iniciadores mixtos de levaduras secas biológicamente activas (LSA) que deben conservar sus propiedades tecnológicas tras la preservación.

La liofilización consiste en la sublimación del hielo intracelular bajo vacío, luego de una congelación previa, lo que detiene el metabolismo microbiano y permite preservar los cultivos durante periodos que pueden extenderse entre 5 y 20 años, dependiendo de la cepa (Burguet-Lago et al., 2014; Merivaara et al., 2021). Sin embargo, la deshidratación puede inducir daños estructurales en la membrana celular, desnaturalización de proteínas y ADN, y reducción significativa en la viabilidad celular al momento de su rehidratación (Dimitrellou et al., 2016; Wang et al., 2020; Wang et al., 2020; Wolkers & Oldenhof, 2021).

Para minimizar estos efectos, se emplean estrategias como el control de parámetros térmicos y cinéticos, y el uso de lioprotectores, como azúcares y aminoácidos (Polo et al., 2017; Yang et al., 2019). Estos compuestos reducen el daño celular tanto durante la liofilización como en la fase de rehidratación, ayudando a conservar la actividad fisiológica de las células y su estabilidad a largo plazo (Shu et al., 2017; H. Wang et al., 2020). No obstante, aún no existe un lioprotector universalmente eficaz para todas las cepas, ya que su efectividad depende del tipo de microorganismo, por lo que resulta imprescindible evaluar la supervivencia celular en cada caso específico (Ávila et al., 2015; Burguet-Lago et al., 2014). Entre los compuestos que han demostrado propiedades protectoras se encuentra ciertos azúcares y polioles empleados en concentraciones del 1 al 10% (Han et al., 2018). Asimismo, extractos complejos como la leche, el extracto de levadura o el mosto de uva han sido propuestos como alternativas viables por su composición rica en proteínas, péptidos y otros nutrientes celulares (Ávila et al., 2015).

En este sentido, y considerando la importancia de conservar cultivos iniciadores viables y funcionales para su aplicación en vinificación, resulta fundamental estudiar el efecto de distintos agentes protectores durante la liofilización y su impacto sobre la viabilidad celular y la funcionalidad metabólica posterior. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diversos lioprotectores sobre cultivos puros de *A. pullulans* m11-2, con el fin de obtener levaduras secas activas mediante liofilización, y estudiar su estabilidad durante el almacenamiento a 4°C, corroborando

además la conservación de su actividad enzimática post-liofilización.

2. Materiales y métodos

Microorganismos y medios de cultivo

El microorganismo utilizado fue una levadura del género no-*Saccharomyces*, *Aureobasidium pullulans* m11-2, previamente aislada y seleccionada por nuestro grupo de trabajo, a partir de superficie de uvas Malbec provenientes de la región vitivinícola San Rafael, Mendoza, Argentina (Longhi et al., 2022). La cepa forma parte de la Colección de Cultivos "Biodiversidad San Rafael" de SCCM-AAM (Asociación Argentina de Microbiología). Para su cultivo se empleó caldo YPD (g/L: extracto de levadura, 10; peptona, 20; glucosa, 20; pH 4,5) y YPD agarizado cuando se requirió en medio sólido (g/L: agar, 20). Las incubaciones se realizaron en un baño termostático con agitación (Semedix, SHZ-88) a 28°C por 48-72 h a 100 rpm.

Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de la cepa en estudio se realizó a partir de cultivos desarrollados en medio YPD agarizado a 28°C después de 3 a 7 días de incubación. Para el análisis macroscópico, se evaluaron características de las colonias tales como forma, tamaño, borde, textura, color y presencia de pigmentos. La observación microscópica se llevó a cabo mediante la preparación de montajes simples: se tomó una porción de colonia con ansa estéril y se distribuyó sobre un portaobjeto con una gota de agua estéril, cubriéndose con cubreobjeto. Las preparaciones se observaron en microscopio óptico, utilizando aumentos de 40x y 100x, con el fin de examinar la morfología celular y la formación de estructuras reproductivas, tanto en su fase levaduriforme como micelial.

Soluciones lioprotectoras

Se prepararon soluciones acuosas de distintos lioprotectores utilizando agua destilada estéril: glutamato de sodio al 2,4%, extracto de levadura al 4%, fructosa al 10%, glucosa al 10%, leche descremada al 10% y mosto de uva variedad Bonarda (corregido a 18° Brix y pH 5,0). Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración mediante membranas Millipore de 0,22 µm de poro, a excepción de la leche, que se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min. Los tubos Falcon se sellaron con microfilm para asegurar una esterilidad prolongada durante el almacenamiento.

Liofilización

La cepa en estudio se cultivó en 20 mL de caldo YPD al 2% y se incubó a 28 °C durante 24 h o hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, las células se recolectaron mediante centrifugación a 3000 xg durante 20 min; el precipitado resultante se lavó una vez y se resuspendió en 1 mL de la solución lioprotectora. Dicha suspensión se fraccionó en viales o ampollas de 300 µL para su posterior liofilización. Los viales se colocaron inicialmente en freezer a -40 °C y, posteriormente, se sometieron a liofilización en un equipo Rificor S.H. (L-A-E50-CRT, Industria Argentina), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (temperatura de congelado de producto: -36°C; vacío: 0,022 mmHg; tiempo: 8 h). Una vez finalizado el proceso, los viales se cerraron en condiciones de vacío utilizando el sistema integrado del equipo de liofilización y se almacenaron a 4 °C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resistencia al proceso de liofilización

Inmediatamente después del proceso de liofilización, el material liofilizado fue resuspendido en 300 µL de una solución de sacarosa al 5% y se incubó a 35 °C durante 10 min. Posteriormente, se colocó en un agitador orbital a 65 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y, finalmente, se incubó a 28 °C durante 20 min.

La viabilidad celular (UFC/mL) se determinó mediante el método de diluciones seriadas y siembra en superficie en placas de Petri. Para evaluar la resistencia al proceso de liofilización, se definió un factor de sobrevida (FS) según la siguiente fórmula:

$$FS = 1 - \frac{\left(\frac{UFC}{mL_{inicial}} - \frac{UFC}{mL_{final}} \right)}{\frac{UFC}{mL_{inicial}}} \quad (1)$$

Alternativamente, los resultados fueron expresados como porcentaje de sobrevida, utilizando la siguiente ecuación:

$$\%Sobrevida = \left(\frac{\frac{UFC}{mL_{final}}}{\frac{UFC}{mL_{inicial}}} \right) * 100 \quad (2)$$

Evaluación de la viabilidad a lo largo del tiempo

Para analizar la estabilidad de la cepa liofilizada a lo largo del tiempo, se conservaron viales a 4 °C y, a intervalos definidos, se realizaron pruebas de viabilidad que consistieron en la rehidratación de la cepa m11-2 liofilizada, seguida de diluciones seriadas y siembras en superficie en placas de Petri con medio YPD. Posteriormente, las placas fueron

incubadas a 28 °C durante 48-72 h para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

Detección de actividad pectinolítica

La capacidad de la cepa para hidrolizar pectina se evaluó mediante el método de halos de clarificación de acuerdo a Merín et al. (2015). El cultivo se inoculó de forma puntual sobre un medio de pectina-agar (g/L: cloruro de calcio, 0,05; fosfato de potasio, 0,2; sulfato de magnesio, 0,8; sulfato de amonio, 1; sulfato de manganeso, 0,05; extracto de levadura, 1; pectina cítrica, 2; agar, 15; pH 4,5) y se incubó a 28°C durante 48-72 h. La actividad enzimática se evidenció por la aparición de halos claros alrededor de las colonias, observables sobre un fondo marrón-púrpura tras la adición de solución de Lugol.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las diferencias significativas entre los valores medios de cada tratamiento se evaluaron mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significancia de 0,05. El análisis de los datos se efectuó utilizando el software InfoStat (versión 2022).

3. Resultados y Discusión

Caracterización morfológica de la cepa A. pullulans m11-2

En la industria enológica, se requieren organismos capaces de producir enzimas líticas que faciliten la degradación de la pared celular vegetal. *Aureobasidium pullulans* ha sido ampliamente reconocido por su eficiencia en la producción de enzimas hidrolíticas (Longhi et al., 2022; Oskay, 2022). Aunque presenta fases de crecimiento similares a las levaduras, es un organismo multicelular con un ciclo dimórfico, lo que le confiere ventajas adaptativas y funcionales. Su presencia predominante en la superficie de la uva y en etapas tempranas de fermentación, junto con su capacidad para liberar enzimas al medio, lo posicionan como una herramienta biotecnológica prometedora en vinificación.

En el análisis macroscópico (Figura 1A), la cepa m11-2 desarrolló colonias de forma circular con márgenes irregulares y superficie lisas, viscosas y brillantes. Los diámetros oscilaron entre 2 y 5 mm, alcanzando hasta 9 mm tras 3 días de incubación en medio YPD a 28 °C. La coloración fue rosada amarillenta, intensificándose con el tiempo hacia tonos marrones oscuros o negruzcos. Este cambio cromático fue consistente con la producción de melanina, un pigmento asociado a la maduración del

micelio y a mecanismos de protección frente a condiciones ambientales adversas (Prasongsuk et al., 2018). Las estructuras radiales superficiales observadas se corresponden con hifas que no forman micelio aéreo, lo que concuerda con lo reportado con otras cepas de *A. pullulans* aisladas de frutas y suelos (Chen et al., 2024; Zalar et al., 2008).

Desde el punto de vista microscópico (Figura 1B y 1C), se observó la coexistencia de dos tipos morfológicos: conidios piriformes dispuestos homogéneamente, algunos en proceso de gemación (fase levaduriforme), e hifas septadas con conidióforos terminales e intercalares que generaban endoconidios (fase micelial). Esta capacidad dimórfica es una característica distintiva de *A. pullulans*, relacionada con su versatilidad metabólica y su habilidad para colonizar distintos nichos ecológicos (Gostinčar et al., 2014). La expresión simultánea de ambas formas en la cepa m11-2 refleja un estado de transición y adaptabilidad a las condiciones del medio de cultivo.

En conjunto, las características morfológicas observadas en la cepa m11-2 coinciden con las descripciones clásicas de *A. pullulans*, la cual se encuentra registrada en GenBank bajo el número de acceso PV659872.

Proceso de liofilización y conservación de la cepa A. pullulans m11-2

La liofilización, ampliamente utilizada para conservar cepas microbianas y mantener sus actividades biológicas a largo plazo, prolonga la vida útil de los microorganismos, permitiendo almacenar grandes volúmenes de material seco por más de un periodo de vendimia. Este método mantiene propiedades fermentativas y/u organolépticas, a la vez que ofrece ventajas financieras y reduce el riesgo de contaminación (Nikolaou et al., 2020). Aunque existen pocos estudios sobre la liofilización de levaduras vínicas, investigaciones previas han evaluado protocolos y la resistencia de cultivos mixtos de *Saccharomyces*, no-*Saccharomyces* y *Oenococcus oeni*, destacando la necesidad de ajustar las condiciones específicas para cada cepa (Bergenholtz et al., 2012; Bravo-Ferrada et al., 2018).

El efecto de la liofilización en *A. pullulans m11-2* se evaluó siguiente como referencia la investigación de Martín et al. (2017), en la cual se comparó el impacto de este proceso con el secado convencional a baja temperatura en levaduras vínicas. El porcentaje de viabilidad de la cepa liofilizada en presencia de distintos agentes protectores se muestra en la Figura 2.



Figura 1. Caracterización morfológica de la cepa *A. pullulans m11-2*. Morfología macroscópica observada luego de 3 días de incubación en medio YPD a 28 °C, seguida de 7 días de conservación a 4 °C (A). Morfología microscópica en su estadio levaduriforme (B), donde se observan conidios piriformes distribuidos homogéneamente, algunos de ellos en proceso de gemación (blastoconidios). Estado micelial observado por microscopía (C), con hifas septadas que contienen estructuras compatibles con enzoconidios formados de manera intercalar.

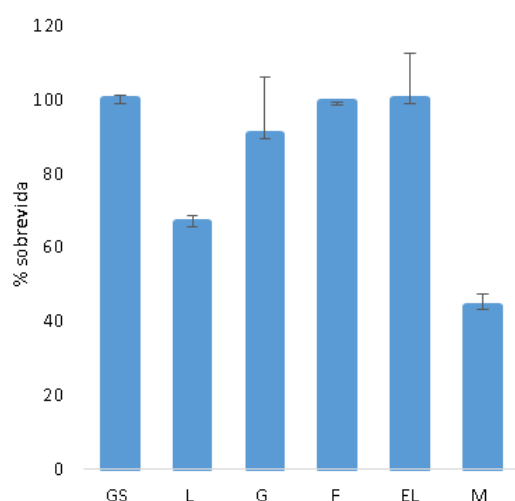


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de *A. pullulans m11-2* tras la liofilización con distintos lioprotectores: glutamato de sodio 2,4% (GS); leche descremada 10% (L); glucosa 10% (G); fructosa 10% (F); extracto de levadura 4% (EL); y mosto 18% (M). Los segmentos verticales indican desviación estándar (n=3).

De acuerdo con estos resultados, la cepa mostró buena adaptación a varios lioprotectores, como glutamato de sodio (2,4%), fructosa (10%) y extracto de levadura (4%), alcanzando un 100% de viabilidad tras la liofilización; en el caso de la glucosa (10%), el porcentaje fue del 90%. En los restantes tratamientos, la viabilidad fue significativamente más baja. En la Tabla 1 se presentan los recuentos celulares finales, los cuales fueron suficientemente elevados como para constituir un inóculo significativo por unidad de volumen. El agente más eficiente fue el glutamato de sodio, alcanzando un valor de $4,04 \times 10^7$ UFC/mL.

Estos resultados coinciden con los reportados por Martín et al. (2017), quienes observaron que las cepas no-*Saccharomyces* presentaron niveles de viabilidad significativamente superiores a los de *Saccharomyces* tras la liofilización. De manera similar, Bravo-Ferrada et al. (2018) reportaron una elevada resistencia a la liofilización en *Oenococcus oeni* en presencia de trehalosa como crioprotector. A pesar de observarse cambios fenotípicos menores en la superficie celular mediante microscopía de fuerza atómica, no se detectaron fenómenos de lisis ni disrupción de membrana, lo que sugiere una conservación estructural adecuada del microorganismo durante el proceso.

Asimismo, Han et al. (2021) obtuvieron altos porcentajes de sobrevivencia utilizando combinaciones de compuestos como leche, trehalosa y polietilenglicol para la preservación de cepas de biocontrol, lo que resalta la efectividad de azúcares, proteínas y polialcoholes como agentes protectores frente al estrés de secado.

Estabilidad de sobrevivencia en el tiempo

Considerando que la liofilización permite preservar la viabilidad de los cultivos durante años, se continuó el estudio de conservación de la cepa *A. pullulans m11-2* liofilizada, almacenada a 4 °C.

En primer lugar, con el objetivo de discriminar cuál de los lioprotectores evaluados ofrecía una mejor estabilidad, se analizaron las tasas de sobrevivencia tras 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Tal como se observa en la Figura 3, el glutamato de sodio al 2,4% resultó nuevamente el lioprotector más eficaz, superando el 90% de sobrevivencia, mientras que el resto de los tratamientos mostró una pérdida marcada en la viabilidad.

Tabla 1. Recuento de células viables (UFC/mL) antes y después de la liofilización en distintos lioprotectores para la cepa *A. pullulans m 11-2*.

Agente protector para la liofilización	Recuento inicial (UFC/mL)	Recuento final (UFC/mL)
Glutamato de Na 2,4%	$2,11 \times 10^7 \pm 2,90 \times 10^6$	$4,04 \times 10^7 \pm 2,02 \times 10^6$
Fructosa 10%	$3,29 \times 10^7 \pm 1,63 \times 10^6$	$3,49 \times 10^7 \pm 2,97 \times 10^6$
Mosto de uva	$5,82 \times 10^7 \pm 1,39 \times 10^7$	$2,77 \times 10^7 \pm 3,75 \times 10^6$
Extracto de levadura 4%	$1,34 \times 10^7 \pm 8,49 \times 10^5$	$1,46 \times 10^7 \pm 7,78 \times 10^5$
Glucosa 10%	$3,27 \times 10^7 \pm 9,90 \times 10^5$	$3,78 \times 10^7 \pm 1,44 \times 10^7$
Leche descremada 10%	$2,98 \times 10^7 \pm 6,79 \times 10^5$	$2,21 \times 10^7 \pm 1,56 \times 10^6$

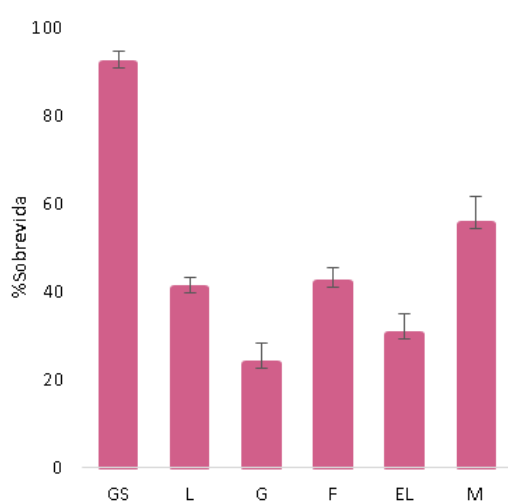


Figura 3. Porcentaje de sobrevivencia de la cepa *A. pullulans m11-2* liofilizada en los distintos lioprotectores: glutamato de sodio 2,4% (GS); leche descremada 10% (L); glucosa 10% (G); fructosa 10% (F); extracto de levadura 4% (EL); y mosto 18% (M), luego de 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Los segmentos verticales indican desviación estándar (n=3).

Posteriormente, se profundizó el estudio de viabilidad de la cepa almacenada con glutamato de sodio como lioprotector, dado su desempeño superior. La cepa *A. pullulans m11-2* se mantuvo viable hasta, al menos, 18 meses después del proceso ($2,30 \times 10^7 \pm 7,07 \times 10^6$ UFC/mL).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Rodríguez et al. (2019), quienes observaron que, a pesar de ciertas modificaciones fenotípicas generadas por el envejecimiento en cepas de *Aspergillus*, su potencial biotecnológico no se vio comprometido. Este tipo de estudios refuerza la

importancia de evaluar la estabilidad celular no solo inmediatamente después de la liofilización, sino también en función de su comportamiento tras períodos prolongados de almacenamiento.

Análisis cualitativo de la actividad enzimática

La capacidad pectinolítica de la cepa *A. pullulans m11-2* se evaluó cualitativamente mediante la formación de halos de clarificación alrededor de las colonias cultivadas en medio con pectina como única fuente de carbono (Figura 4). Los resultados obtenidos indicaron que, independientemente del lioprotector utilizado, la cepa liofilizada conservó su capacidad para degradar pectina.

La relación entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia (DH/DC) se mantuvo aproximadamente constante, con un valor de 3,0, tanto inmediatamente después del proceso de secado como luego de 6 meses de almacenamiento a 4 °C. Esto sugiere que la actividad enzimática pectinolítica no se vio afectada por la liofilización ni por el almacenamiento a mediano plazo.

Si bien se ha reportado que el proceso de liofilización conlleva inevitablemente una reducción en la actividad y función celular (Wang et al., 2020), los resultados obtenidos con la cepa *A. pullulans m11-2* indican una notable estabilidad funcional tras este tratamiento. Resultados similares fueron reportados por (Rodríguez et al., 2019), quienes observaron que cepas de *Aspergillus* también mantenían su actividad enzimática luego del proceso de liofilización, lo que resalta la necesidad de evaluar cómo se conserva la funcionalidad celular con el paso del tiempo.

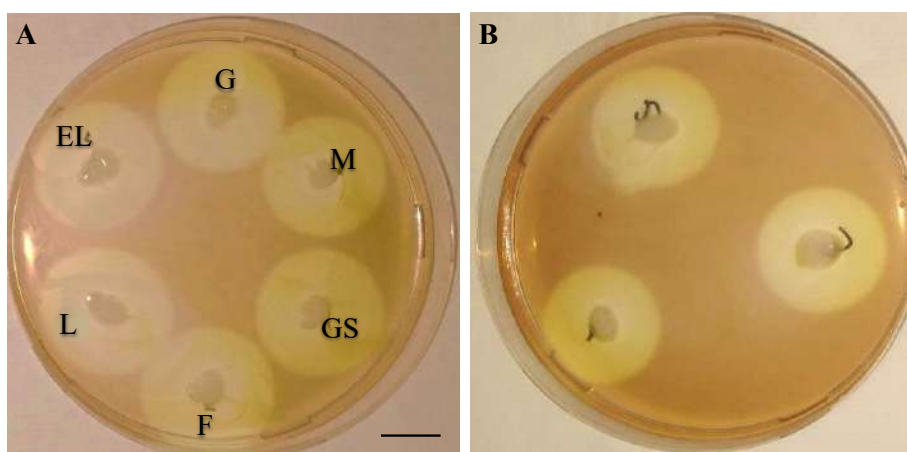


Figura 4. Actividad pectinolítica de *A. pullulans* m11-2 luego del proceso de liofilización (A), en presencia de diferentes lioprotectores: extracto de levadura (EL); glucosa (G); mosto (M); glutamato de sodio (GS); fructosa (F); leche descremada (L). Actividad pectinolítica observada tras 6 meses de conservación a 4 °C, utilizando glutamato de sodio como agente lioprotector y evaluada en 3 réplicas (B). Barra de escala: A-B = 10 mm.

4. Conclusiones

La cepa *A. pullulans* m11-2 fue conservada mediante liofilización utilizando glutamato de sodio al 2,4% como agente lioprotector, manteniendo tanto su viabilidad como su actividad pectinolítica durante al menos 18 meses de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados demuestran la eficacia de este protocolo de conservación para obtener levaduras secas activas viables y funcionales, y refuerzan su potencial como fuente enzimática para aplicaciones enológicas específicas.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero de SIIP-UNCUYO (número de subvención 06/L004-T1 y 06/L013-T1), PICT (MINCYT)-BID (número de subvención 2019-03446) y PIP-CONICET (número de subvención 2021-0074).

6. Referencias

- Ávila, L., Naranjo, J., & Higuera, J. (2015). Viabilidad de levaduras y bacterias conservadas por liofilización: efecto de agentes lioprotectores. *Revista Vector*, 10, 7–13.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 153, Issue 3, pp. 243–259). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Bergenholtz, Å. S., Wessman, P., Wuttke, A., & Håkansson, S. (2012). A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. *Cryobiology*, 64(3), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.01.002>
- Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E., & Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. *Food Research International*, 122, 432–442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
- Bravo-Ferrada, B. M., Gonçalves, S., Semorile, L., Santos, N. C., Brizuela, N. S., Elizabeth Tymczyszyn, E., & Hollmann, A. (2018). Cell surface damage and morphological changes in *Oenococcus oeni* after freeze-drying and incubation in synthetic wine. *Cryobiology*, 82, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.04.014>
- Burguet-Lago, N., Sierra-Prado, N., & Estrada, M. A. (2014). Evaluación de una formulación para la conservación de cepas de *Pseudomona aeruginosa*. In *Revista CENIC Ciencias Biológicas* (Vol. 45, Issue 1).
- Buzzini Pietro, Di Mauro Simone, & Turchetti Benedetta. (2017). Yeasts as starter cultures. In Barbara Speranza, Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo, & Milena Sinigaglia (Eds.), *Starter Cultures in Food Production* (First Edition, pp. 16–49). John Wiley & Sons, Ltd. www.lallemmand.com
- Chen, J., Lu, Y., Liu, L., Bai, R., Zhang, S., Hao, Y., Xu, F., Wei, B., & Zhao, H. (2024). Characteristic

- analysis and fermentation optimization of a novel *Aureobasidium pullulans* RM1603 with high pullulan yield. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 137(5), 335–343.
- Chen, Y., Jiang, J., Song, Y., Zang, X., Wang, G., Pei, Y., Song, Y., Qin, Y., & Liu, Y. (2022). Yeast Diversity during Spontaneous Fermentations and Oenological Characterisation of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for Potential as Wine Starter Cultures. *Microorganisms*, 10(7).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10071455>
- Claus, H., & Mojsov, K. (2018). Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. In *Fermentation* (Vol. 4, Issue 3). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/fermentation4030052>
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., & Kourkoutas, Y. (2016). Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393. *LWT*, 69, 468–473.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.063>
- Gostinčar, C., Ohm, R. A., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniquy, J., Ngan, C. Y., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I. V., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics*, 15(1).
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-549>
- Han, L., Pu, T., Wang, X., Liu, B., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2018). Optimization of a protective medium for enhancing the viability of freeze-dried *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 based on response surface methodology. *Cryobiology*, 81, 101–106.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.02.003>
- Han, P., Ni, L., Wei, Y., Jiang, S., Xu, F., Wang, H., & Shao, X. (2021). Optimization of the freeze-drying of marine yeast *Sporidiobolus pararoseus* ZMY-1 for its application in biocontrol of fungal infections. *Biological Control*, 161.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104707>
- Longhi, S. J., Martín, M. C., Merín, M. G., & Morata de Ambrosini, V. I. (2022). Yeast Multi-Enzymatic Systems for Improving Colour Extraction, Technological Parameters and Antioxidant Activity of Wine. *Food Technology and Biotechnology*, 60(4), 556–570.
<https://doi.org/10.17113/FTB.60.04.22.7777>
- Martín, M. C., Muñoz, F. A., & Morata de Ambrosini, V. I. (2017). Levaduras secas activas (LSA) autóctonas de la DOC San Rafael-Mendoza: Resistencia al proceso de liofilización.
- Martín, M. C., Prendes, L. P., Morata, V. I., & Merín, M. G. (2024). Biocontrol and Enzymatic Activity of Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts: Improvements in Winemaking. In *Fermentation* (Vol. 10, Issue 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/fermentation10040218>
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Coccolin, L., & De Ambrosini, V. I. M. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 815–823.
<https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140160>
- Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernandes, F. M., & Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 336, pp. 480–498). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>
- Nikolaou, A., Sgouros, G., Mitropoulou, G., Santarmaki, V., & Kourkoutas, Y. (2020). Freeze-dried immobilized kefir culture in low alcohol winemaking. *Foods*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/foods9020115>
- Oskay, M. (2022). Production, Partial Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans* P56 under Submerged Fermentation Using Agro-Industrial Wastes. *Current Microbiology*, 79(10). <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02991-6>
- Pietrafesa, A., Capece, A., Pietrafesa, R., Bely, M., & Romano, P. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* mixed starter cultures: Influence of microbial/physical interactions on wine

- p>characteristics.
- Yeast*
- , 37(11), 609–621.
-
- <https://doi.org/10.1002/yea.3506>
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905>
- Polo, L., Mañes-Lázaro, R., Olmeda, I., Cruz-Pio, L. E., Medina, Ferrer, S., & Pardo, I. (2017). Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1603–1614.
<https://doi.org/10.1111/jam.13465>
- Prasongsuk, S., Lotrakul, P., Ali, I., Bankeeree, W., & Punnapayak, H. (2018). The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. In *Folia Microbiologica* (Vol. 63, Issue 2, pp. 129–140). Springer Netherlands.
<https://doi.org/10.1007/s12223-017-0561-4>
- Río Segade, S., Pace, C., Torchio, F., Giacosa, S., Gerbi, V., & Rolle, L. (2015). Impact of maceration enzymes on skin softening and relationship with anthocyanin extraction in wine grapes with different anthocyanin profiles. *Food Research International*, 71, 50–57.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.012>
- Rodriguez, R., Santos, C., Simões, M. F., Soares, C., Santos, C., & Lima, N. (2019). Polyphasic, including maldi-tof ms, evaluation of freeze-drying long-term preservation on *aspergillus* (Section *nigri*) strains. *Microorganisms*, 7(9).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7090291>
- Shu, G., Zhang, B., Hui, Y., Chen, H., & Wan, H. (2017). Optimization of cryoprotectants for *Streptococcus thermophilus* during freeze-drying using Box-Behnken experimental design of response surface methodology. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(4), 256–263.
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-07-960>
- Sternes, P. R., Lee, D., Kutyna, D. R., & Borneman, A. R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience*, 6(7).
<https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040>
- Wang, G. Q., Pu, J., Yu, X. Q., Xia, Y. J., & Ai, L. Z. (2020). Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science*, 103(4), 3066–3075. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17685>
- Wang, H., Tong, X., Yuan, Y., Peng, X., Zhang, Q., Zhang, S., Xie, C., Zhang, X., Yan, S., Xu, J., Jiang, L., Qi, B., & Li, Y. (2020). Effect of Spray-Drying and Freeze-Drying on the Properties of Soybean Hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/9201457>
- Wolkers Willem, & Oldenhof Harriëtte. (2021). Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. In Willem F. Wolkers & Harriëtte Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Fourth Edition).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1>
- Yang, K., Zhu, Y., Qi, Y., Zhang, T., Liu, M., Zhang, J., Wei, X., Fan, M., & Zhang, G. (2019). Analysis of proteomic responses of freeze-dried *Oenococcus oeni* to access the molecular mechanism of acid acclimation on cell freeze-drying resistance. *Food Chemistry*, 285, 441–449.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.120>
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38.
<https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>



La mecatrónica en la formación básica: innovación en el laboratorio para aprender física en ingeniería y tecnicatura en mecatrónica

Lautaro Morel Penco¹; Cristina Cayetano^{1*}

1. Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL), Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), Concordia, Entre Ríos, Argentina

*E-mail: [*cristina.cayetanoarteaga@uner.edu.ar](mailto:cristina.cayetanoarteaga@uner.edu.ar)

PALABRAS CLAVES

Mecatrónica
Formación
Dispositivos
Estudiantes

RESUMEN

Los estudiantes que ingresan a Ingeniería y Tecnicatura en Mecatrónica lo hacen con altas expectativas sobre su futuro profesional, pero suelen frustrarse al ver que las aplicaciones prácticas aparecen recién en los años avanzados. Este trabajo propone una innovación en el Ciclo Básico, integrando contenidos de Física I y II con el diseño de dispositivos didácticos basados en Arduino. Se desarrollaron actividades prácticas como la representación gráfica de la carga y descarga de un capacitor mediante un microcontrolador ATmega32U4, permitiendo visualizar fenómenos físicos en tiempo real. Esta propuesta busca que los estudiantes sean protagonistas del proceso, al diseñar, programar y experimentar, lo que favorece su aprendizaje y motivación. La accesibilidad actual de estas tecnologías permite escalar la implementación y reemplazar prácticas demostrativas pasivas por talleres activos. Para evaluar el impacto, se utilizó la metodología TRL (Technology Readiness Level) y una encuesta breve para conocer la percepción de los alumnos respecto a los contenidos y su relación con la mecatrónica. Los resultados fueron positivos, demostrando la efectividad de este enfoque y sugiriendo su posible aplicación en otras asignaturas del Ciclo Básico.

Mechatronics in early engineering education: laboratory-based innovation for teaching physics in engineering and technical programs

KEYWORDS

Mechatronics
Education
Devices
Students

ABSTRACT

Students entering Mechatronics Engineering and Technical degree often have high expectations about their professional future, but become discouraged when they realized that practical applications are addressed only in advanced years. This work proposes an educational innovation in the Basic Cycle, integrating contents of Physics I and II with the design of didactic devices using Arduino. Practical activities were developed, such as the graphical representation of the charging and discharging cycles of a capacitor using an ATmega32U4 microcontroller, allowing real-time visualization of voltage variations. This approach encourages students to take an active role by designing, programming, and experimenting with physical phenomena and their mechatronic applications, enhancing their motivation and learning. The increasing accessibility of these technologies makes it feasible to scale up the number of kits for classroom use, moving away from passive demonstrations toward hands-on experimentation. To evaluate the outcomes, we applied the Technology Readiness Level (TRL) methodology and conducted a short survey to assess students' comprehension and their perception of the integration between physics and mechatronics. The results show a successful implementation, supporting the idea of extending this teaching strategy to other courses within the Basic Cycle of Mechatronics programs..

1. Introducción

La carrera de Ingeniería en Mecatrónica representa una propuesta innovadora para estudiantes del litoral argentino, en un contexto donde los avances tecnológicos demandan profesionales altamente capacitados para enfrentar los desafíos de la Industria 4.0. Sin embargo, uno de los problemas recurrentes en las carreras tecnológicas es la baja motivación de los estudiantes en los primeros años, debido a la escasa presencia de contenidos aplicados o vinculados con el quehacer profesional.

Diversos estudios indican que el involucramiento activo en experiencias prácticas tempranas favorece la retención del conocimiento y fortalece la identidad profesional en formación (Díaz et al., 2019; Torres y Méndez, 2020). No obstante, en muchos programas académicos, las aplicaciones tecnológicas suelen introducirse en etapas avanzadas de la formación, dificultando el vínculo temprano con el perfil de egreso.

En el caso de la carrera de Ingeniería en Mecatrónica de la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), dictada en la Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL), se observó la necesidad de incorporar estrategias didácticas que integren conocimientos de física con herramientas tecnológicas propias del campo de estudio, tales como microcontroladores y entornos de programación.

En este sentido, la incorporación de prácticas basadas en el paradigma de la educación 4.0, enmarcado en la Revolución Industrial 4.0 (IR4.0), permite articular contenidos conceptuales con aplicaciones reales utilizando tecnologías como Arduino, Internet de las Cosas (IoT), TICs e Inteligencia Artificial (Mecatrónica educativa, 2021).

No obstante, aún persisten desafíos vinculados a la falta de experiencias institucionalizadas que consoliden este enfoque en el Ciclo Básico de las carreras técnicas.

El objetivo de este trabajo es presentar una propuesta de innovación educativa que integra contenidos de Física I y II mediante el desarrollo de dispositivos mecatrónicos con Arduino, promoviendo el aprendizaje activo. Se plantea como hipótesis que el uso de herramientas tecnológicas en etapas tempranas favorece la comprensión conceptual y la motivación de los estudiantes hacia la carrera.

2. Materiales y métodos

La propuesta se llevó a cabo en el marco de las materias Física I y Física II de la carrera de Ingeniería

en Mecatrónica, en la Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL) de la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), en Concordia, Entre Ríos. Estas asignaturas pertenecen al Ciclo Básico de la carrera, Física I en el segundo cuatrimestre del primer año y Física II en el primer cuatrimestre del segundo año.

La propuesta surgió a partir de una necesidad detectada por el equipo docente del área de Física para fortalecer las actividades experimentales que permitan el desarrollo de competencias del saber hacer en estudiantes de mecatrónica. Se convocó a estudiantes becarios para diseñar y desarrollar prototipos en base a las actividades prácticas planificadas de la cátedra. En 2023 se ejecutó el primer proyecto piloto en Física I, y en 2024 se aplicó un segundo proyecto en Física II. Ambos fueron aprobados institucionalmente como prácticas formativas orientadas por los principios de la educación 4.0, priorizando la vinculación de los contenidos curriculares con herramientas tecnológicas reales.

Implementación del enfoque y desarrollo de prototipos y material didáctico

Se describe a continuación la experiencia desarrollada en 2024 con estudiantes de física II que realizaron trabajos prácticos de laboratorio, organizados en grupos de estudiantes. Los estudiantes diseñaron y ensamblaron prototipos didácticos utilizando placas Arduino UNO, montadas sobre placas protoboard, con el objetivo de visualizar procesos físicos en tiempo real.

La actividad consistió en visualizar en tiempo real el ciclo de carga y descarga de un capacitor electrolítico utilizando una placa Arduino UNO con microcontrolador ATmega32U4. El circuito se diseñó conectando la entrada analógica A0 al cátodo (polo positivo) del capacitor, y el ánodo al GND común de la placa Arduino y la fuente de alimentación. Esta disposición permitió medir el voltaje a través del capacitor durante su carga y descarga mediante la conversión analógica-digital del pin A0.

El voltaje fue visualizado a través del monitor serial y el gráfico (plotter) del entorno de desarrollo Arduino IDE, permitiendo observar el comportamiento exponencial del fenómeno físico.

Para la visualización del ciclo de carga y descarga de un capacitor, se utilizó el conversor analógico-digital (ADC) integrado en el microcontrolador ATmega328P presente en la placa Arduino UNO. Este ADC tiene una resolución de 10 bits, lo que permite medir señales analógicas entre 0 V y 5 V y obtener un valor digital entre 0 y 1023. Esta capacidad fue

aprovechada para registrar el voltaje del capacitor a través del pin A0 y luego graficarlo en tiempo real mediante el monitor serial y el "Serial Plotter" del entorno Arduino IDE.

El circuito fue alimentado con una fuente externa de tensión continua regulable, y no se utilizaron sensores adicionales, ya que la propia placa Arduino fue suficiente para adquirir las señales requeridas. La decisión de trabajar sin sensores adicionales respondió a criterios de simplicidad, bajo costo y disponibilidad de recursos en el laboratorio.

Para mejorar la interpretación del fenómeno, se incorporaron resistencias de distintos valores al circuito. Esto permitió modificar la constante de tiempo del sistema RC y observar cómo varía la velocidad del proceso, facilitando así la comprensión del modelo teórico. Para la programación se utilizó el entorno Arduino IDE, ya que los estudiantes de la cátedra poseen conocimientos básicos en programación orientada a microcontroladores, adquiridos previamente en otras materias del plan de estudios.

Evaluación de resultados

Para analizar el impacto del proyecto en el aprendizaje se aplicó una encuesta a los estudiantes que participaron en la actividad, diseñada con base en escalas de percepción utilizadas en educación y adaptación del modelo de satisfacción del cliente (Dawes et al., 2020). Las preguntas incluyeron:

- ¿Comprendiste mejor el tema físico abordado gracias a esta práctica?
- ¿Pudiste relacionar el contenido de Física con la carrera de Mecatrónica?
- ¿Sentiste mayor motivación al utilizar herramientas tecnológicas reales?

- ¿Creés que este tipo de actividades debería repetirse en otras materias?
- Los resultados de la encuesta se presentan en la sección 3.

Análisis de madurez tecnológica mediante la metodología TRL

Para evaluar el nivel de desarrollo técnico de los prototipos diseñados por los estudiantes, se utilizó la metodología TRL (Technology Readiness Level), un sistema de evaluación desarrollado originalmente por la NASA que permite clasificar tecnologías desde su concepción inicial (TRL 1) hasta su implementación operativa en entornos reales (TRL 9) (Olechowski et al., 2020).

3. Resultados y Discusión

La implementación del enfoque propuesto fue evaluada a través de una encuesta aplicada a los estudiantes que participaron del segundo taller (año 2024), en el marco de la materia Física II. El objetivo fue conocer su percepción respecto a la utilidad pedagógica de la actividad, la comprensión conceptual lograda y la motivación generada por el uso de tecnologías propias de la mecatrónica.

Participaron de la encuesta 12 estudiantes. Los resultados muestran que, antes de la actividad, el 50% evaluaba su comprensión del ciclo de carga y descarga de un capacitor como moderada, mientras que un 25% la calificaba como alta, y un 16,7% como muy alta. Solo el 8,3% la consideraba baja (Figura 1). Tras la práctica, el 91,7% de los estudiantes afirmó que la actividad con Arduino les ayudó a comprender mejor el fenómeno físico (Figura 2), y el 100% coincidió en que este tipo de recursos mecatrónicos incentivan el aprendizaje (Figura 3).

¿Cómo calificarías tu comprensión del ciclo de carga y descarga de un capacitor antes de esta actividad?
12 respuestas

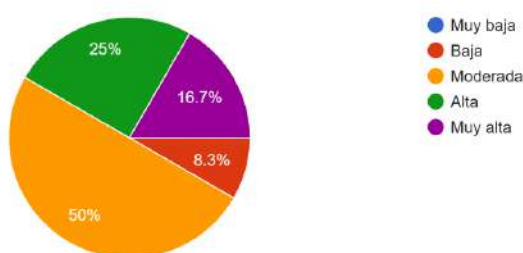


Figura 1. Nivel de comprensión del ciclo de carga y descarga de un capacitor antes de la actividad

¿Consideras que la actividad con el Arduino te ayudó a comprender mejor el comportamiento del capacitor?

12 respuestas

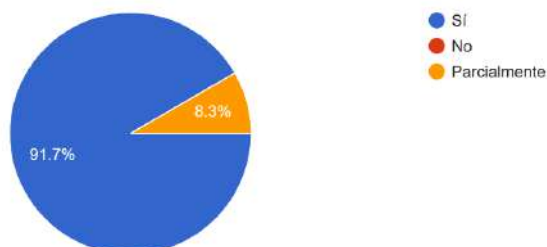


Figura 2. Impacto percibido de la actividad con Arduino en la comprensión del fenómeno

¿Crees que este tipo de actividades donde se utilizan recursos específicos de la mecatronica, como los microcontroladores incentivan el aprendizaje de la materia?

12 respuestas



Figura 3. Opinión de los estudiantes sobre el uso de recursos mecatrónicos en el aprendizaje

Respecto a la satisfacción general, los niveles fueron altos: un 41,7% calificó la actividad con 8 puntos sobre 10, mientras que un 25% le asignó un 9 y otro

25% un 10 (Figura 4). Finalmente, el 91,7% de los encuestados consideró que esta práctica debería incluirse en cursos futuros (Figura 5).

¿Cómo calificarías tu satisfacción general con esta actividad?

12 respuestas

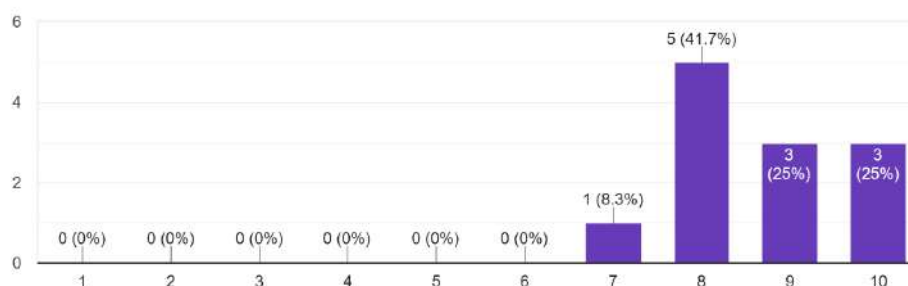


Figura 4. Nivel de satisfacción general de los estudiantes con la actividad propuesta.

¿Crees que esta actividad debería ser incluida en futuros cursos?
12 respuestas

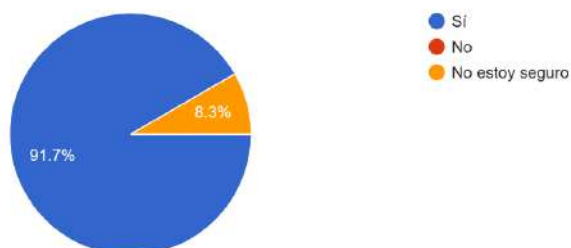


Figura 5. Valoración de los estudiantes sobre la inclusión futura de la actividad en otras materias.

En cuanto a los resultados observados durante las actividades prácticas, se logró un funcionamiento estable y replicable del circuito experimental montado en protoboard, utilizando únicamente componentes básicos: un capacitor, dos resistencias, una fuente de alimentación regulable y una placa Arduino UNO.

La programación desarrollada por los propios estudiantes permitió visualizar en tiempo real la curva de carga y descarga a través del monitor serial del entorno Arduino IDE. Además, los distintos grupos experimentaron con valores de resistencias para observar cómo varía la constante de tiempo del sistema RC, logrando relacionar las expresiones teóricas con los resultados empíricos. La inclusión de esta etapa de experimentación enriqueció la práctica y fortaleció la comprensión del fenómeno.

Desde el punto de vista de la madurez tecnológica, los prototipos alcanzaron un nivel TRL 6 ("demostración en entorno relevante"), lo que demuestra que los dispositivos desarrollados poseen una integración funcional adecuada, capacidad de operación autónoma y posibilidad de ser utilizados como recurso didáctico en el aula.

A continuación, se presentan algunas imágenes de los prototipos desarrollados por los estudiantes durante la actividad:

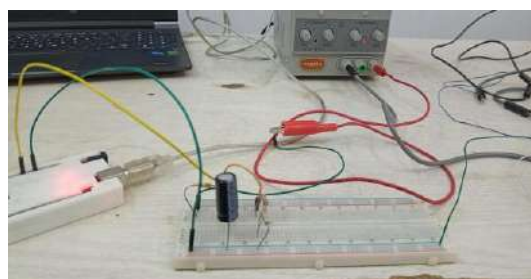


Figura 6. Prototipo montado sobre protoboard: capacitor, resistencias, cableado y entrada A0.

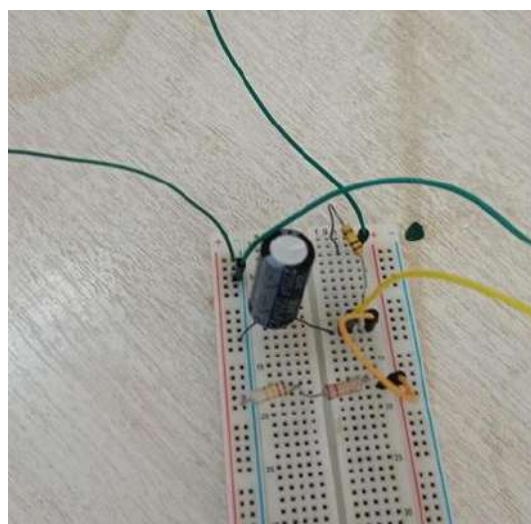


Figura 7. Vista superior del circuito montado por estudiantes

Estos resultados indican una recepción altamente positiva y respaldan la hipótesis planteada sobre los beneficios de introducir herramientas mecatrónicas en las etapas tempranas del aprendizaje.

Discusión y análisis del nivel de madurez tecnológica (TRL)

Los prototipos desarrollados durante los talleres fueron evaluados según la metodología Technology Readiness Level (TRL), alcanzando un nivel 6: "Demostración tecnológica: Sistema de ingeniería validado en condiciones relevantes a las reales operativas, aunque aún a nivel prototipo."

Este resultado evidencia que los dispositivos no solo funcionaron adecuadamente, sino que su integración y desempeño en el entorno educativo simularon con fidelidad una aplicación práctica real. La utilización de componentes accesibles como el microcontrolador ATmega32U4, la programación en entorno Arduino y el diseño funcional logrado por los grupos de estudiantes, demuestran una apropiada transferencia de conocimientos y habilidades prácticas.

Estos resultados validan el enfoque propuesto y motivan su réplica en otras cátedras del Ciclo Básico. Además, sugieren que la incorporación temprana de experiencias tecnológicas puede contribuir a mejorar la retención estudiantil, fomentar el pensamiento crítico y consolidar la identidad profesional desde el inicio de la formación.

4. Conclusiones

La implementación de actividades prácticas con enfoque mecatrónico en Física II demostró ser una estrategia efectiva para fortalecer el aprendizaje en el Ciclo Básico de la carrera de Ingeniería y Tecnicatura en Mecatrónica. Los resultados obtenidos en las encuestas reflejan un alto grado de comprensión conceptual, motivación y satisfacción por parte de los estudiantes, validando la hipótesis de que el uso de tecnologías aplicadas en etapas tempranas de la formación mejora la experiencia educativa.

El uso de microcontroladores como el ATmega32U4 y la plataforma Arduino permitió desarrollar prototipos funcionales que alcanzaron un nivel 6 en la escala TRL, lo que evidencia una sólida integración entre teoría y práctica. Esta experiencia no solo favorece la comprensión de fenómenos físicos abstractos, sino que también contribuye a la construcción temprana de una identidad profesional vinculada a la mecatrónica.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Facultad de Ciencias de la Alimentación y a la Universidad Nacional de Entre Ríos por permitir el desarrollo del proyecto dentro del marco académico correspondiente. Asimismo, se reconoce al Laboratorio de Física por brindar el espacio, los recursos técnicos y el apoyo logístico necesario para la realización de las actividades. Finalmente, se agradece la participación activa y comprometida de los estudiantes que formaron parte de esta experiencia educativa.

6. Referencias

- Dawes, J., Stocchi, L., & Dall'Olmo-Riley, F. (2020). Over-time variation in individuals' customer satisfaction scores. *International Journal of Market Research*, 62(3), 262–271.
- González-Islas, J. C., Godínez-Garrido, G., González-Rosas, A., & Ortega-Marín, B. A. (2021). Mecatrónica educativa: soporte de la enseñanza-aprendizaje de educación básica en Hidalgo. *Publicación Semestral Pádi*, 9(Especial), 110–117.
- Kucuk, L., Añais, L. I., Ruíz Díaz, J. E., & Soberano, J. M. (2022). Robótica como recurso educativo. Aportes para las prácticas docentes orientadas al desarrollo de la lateralidad en niños. XVII Congreso de Tecnología en Educación & Educación en Tecnología. UTN – FRBA.
- Olechowski, A. L., Eppinger, S. D., Joglekar, N., & Tomaschek, K. (2020). Technology readiness levels: Shortcomings and improvement opportunities. *Systems Engineering*, 23(4), 395–40.



Estudio de la remoción de contaminantes acuosos con hueso calcinado y arena de Monte Hermoso

Cecilia Morgade^{*1,2}, Bruno E. Mancinelli¹, Cynthia M. Luna Coronado¹ y Sandra Ulacco¹

- 1 Universidad Tecnológica Nacional Facultad Regional Bahía Blanca (UTN FRBB). 11 de Abril 461, B8000 Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina
- 2 Universidad Nacional del Sur (UNS) Av. Alem 1253, B8000 Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

*E-mail: cmorgade@frbb.utn.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Hueso calcinado
Arena
Contaminantes acuosos

RESUMEN

La contaminación del agua por arsénico (As), fluoruros (F^-), nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+) es un problema de salud pública global. El presente estudio propone el uso de polvo de hueso calcinado de vaca y arena como adsorbentes de bajo costo para implementar una solución de potabilización accesible en zonas rurales y vulnerables. En los ensayos de remoción, el hueso calcinado fue notablemente más eficiente que la arena, logrando hasta un 79.92% de remoción de F^- y un 62.50% de As en muestras sin competencia iónica. Esta eficiencia mantuvo un desempeño destacado (68.50% para F^- y 55.72% para As) aún en presencia de más de un contaminante en simultaneo. Como limitación, sin embargo, ambos materiales, tanto hueso como arena, aportaron nitratos (NO_3^-) al medio. Se concluye que el hueso calcinado es una alternativa eficaz y accesible para la remoción de As y F^- , siendo necesaria la implementación de un tratamiento reductor complementario para la eliminación del nitrato residual y la realización de estudios adicionales para optimizar la remoción de NH_4^+ .

Study of the removal of aqueous contaminants with calcined bone and sand from Monte Hermoso

KEYWORDS

Calcinated bone
Sand
Aqueous contaminants

ABSTRACT

Water contamination by arsenic (As), fluorides (F^-), nitrates (NO_3^-), and ammonium (NH_4^+) is a global public health problem. This study proposes the use of calcined cow bone powder and sand as low-cost adsorbents to implement an accessible water purification solution in rural and vulnerable areas. In removal tests, calcined bone was significantly more efficient than sand, achieving up to 79.92% removal of F^- and 62.50% of As in samples without ionic competition. This efficiency maintained outstanding performance (68.50% for F^- and 55.72% for As) even in the presence of more than one contaminant simultaneously. As a limitation, however, both materials, bone and sand, contributed nitrates (NO_3^-) to the environment. It is concluded that calcined bone is an effective and accessible alternative for the removal of As and F^- , requiring the implementation of a complementary reducing treatment for the elimination of residual nitrate and the performance of additional studies to optimize the removal of NH_4^+ .

1. Introducción

La contaminación y el acceso a agua potable en los últimos tiempos se volvió una de las mayores problemáticas a las que nos enfrentamos mundialmente, y si bien han sido propuestos

diversos métodos para descontaminar, aún estamos muy lejos de considerarlo un problema resuelto.

El arsénico (As), el flúor (F^-), los nitratos (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) son contaminantes frecuentes del agua, de origen natural o antropogénico, que representan una amenaza para la salud humana y ambiental.

Es sabido, que la exposición prolongada al As a través del consumo de agua y alimentos contaminados puede causar cáncer y lesiones cutáneas, asociándose también a enfermedades cardiovasculares y diabetes. Por otra parte, la exposición intrauterina y en la primera infancia se han relacionado con efectos negativos en el desarrollo cognitivo y un aumento de la mortalidad en jóvenes adultos (Monroy-Torres et al., 2018; Puntoriero et al., 2014).

La presencia de flúor, si bien en determinadas concentraciones es efectiva en la prevención de la caries dental, niveles elevados de exposición alteran la formación del esmalte y eventualmente la formación ósea, causando fracturas y lesiones graves. La contaminación por flúor produce principalmente fluorosis dental y/o esquelética que se observa en quienes han estado expuestos a altos niveles altos de este elemento, siendo un problema particularmente grave en la infancia. (Espósito et al., 2013; Neira et al., 2010).

Altas concentraciones de nitratos producen metahemoglobinemia en lactantes, este síndrome, más conocido como el “niño azul”, consiste en la formación de una molécula de hemoglobina más oxidada con mayor afinidad por el oxígeno, haciendo que su liberación a los tejidos sea menor y provocando la cianosis periférica característica de esta patología. (Donoso et al., 2018).

La presencia de ion amonio en el agua puede ser debida a la descomposición de materia orgánica, a residuos industriales, aguas residuales y/o fertilizantes agrícolas, entre otros. Si bien solo tiene efectos tóxicos si se ingiere en altas dosis, pudiendo producir intolerancia a la glucosa y disminuyendo la sensibilidad a la insulina, su presencia interfiere con un adecuado proceso de potabilización formando mono, di y tricloraminas e incrementa las concentraciones de nitritos y nitratos además de incorporar sabores y olores desagradables al agua. (Asyraf et al., 2015)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un límite máximo de 10 microgramos por litro (10 µg/L) de arsénico en el agua potable, 1,5 mg/L para flúor, y 50 mg/L para nitratos. Si bien para el ion amonio no ha establecido límites específicos, considera que valores por encima de 1,5 mg/L y 35 mg/L afectan sensorialmente el agua causando olor y sabor. Por su parte el código alimentario argentino establece los mismos valores límite para arsénico, flúor y nitratos y agrega un valor de 0.2 mg/L para el ion amonio.

Diferentes tecnologías como ósmosis inversa, resinas de intercambio iónico, electroquímica, adsorción con alúmina, materiales ferrosos o bioadsorbentes han sido estudiadas y aplicadas para la remoción de los contaminantes mencionados. Sin embargo, aún el problema no está resuelto, siendo particularmente más importante en sectores más humildes y alejados a sitios urbanos de potabilización. (Didar-UI Islam, 2023; Rathore et al., 2017; S. Dey et al., 2021)

El presente trabajo, se enfoca en dar una posible solución accesible y reproducible pensada particularmente para los sectores más vulnerables con respecto al acceso al agua potable.

La propuesta radica en utilizar polvo de hueso calcinado de vaca y arena como materiales removedores de los contaminantes mencionados y posiblemente de otros. La elección de los mismos radica en que representan materiales fácilmente accesibles y económicos para la mayor parte de la población. Con respecto al hueso, la calcinación mejora sus propiedades y minimiza efectos indeseados como color u olor desagradable (Valenzuela, et al., 2011).

El estudio inicia con la preparación y caracterización de los materiales y el análisis de la capacidad adsorptiva de los mismos con respecto a los contaminantes mencionados (As, F⁻, NO³⁻ y NH⁴⁺) con el fin de evaluar la posible construcción de un dispositivo que pueda ser utilizado para la solución de la problemática descrita, particularmente en zonas rurales, alejadas de los centros de potabilización.

2. Materiales y métodos

Las muestras de agua para el trabajo se prepararon en laboratorio a partir de agua tridestilada, óxido arsenioso (As₂O₃), marca Anedra y concentración 200 ppb, fluoruro de sodio (NaF), Cicarelli 5 ppm, nitrato de sodio (NaNO₃), Mallinckodt 80 ppm y fluoruro de amonio (NH₄F) Carlo Erba 40 ppm de amonio.

Como adsorbentes se utilizaron carbón de hueso de fémur de vaca (Valenzuela et al., 2011) y arena entera de Monte Hermoso.

El hueso se preparó a partir de fémur de novillo de aproximadamente 36 meses dada su menor cantidad de cartílago en comparación con otras piezas como costillas o escápulas. Fue seleccionado además porque su estructura compacta y concavidad central

permiten un pulverizado más eficiente. El tratamiento inicial consistió en hervir los huesos en agua a presión atmosférica durante cuatro horas para eliminar tejidos blandos adheridos. Posteriormente fueron secados por un período de una semana, triturados y tamizados hasta el tamaño de partícula deseado, aproximadamente 1,5 mm. Las muestras obtenidas se calcinaron en mufla a una temperatura de 500 °C, siguiendo las recomendaciones extraídas de estudios previos como valor óptimo para la obtención de carbón óseo de alta calidad (Kaseva, 2006).

La arena extraída de un pozo a 15 cm de la superficie fue caracterizada para conocer su granulometría y las densidades de los diferentes agregados, determinaciones realizadas en el Laboratorio de Ingeniería Civil de la UTN FRBB. En la misma se estudió la concentración de hierro por espectroscopia en un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), Shimadzu Simultáneo 9000 según Norma EPA 200.7 y la proporción en porcentaje en masa de material magnético con un imán de Neodimio. También se realizaron difracción de rayos x (DRX) de la porción fina. Los patrones de difracción de rayos X en polvo (PXRD) se recolectaron utilizando un difractómetro XRD Malvern-Panalytical Empyrean III equipado con un filtro de Ni y un detector PIXcel3D. Este instrumento utiliza la fuente de radiación Cu K α 1 (1,5406 Å) operada a 45 kV y una corriente de emisión de 40 mA. Los datos se recopilaban utilizando una rendija de divergencia de 0,5°, un tamaño de paso de 0,013° y un tiempo de conteo de 80 s por paso en una ventana de 2 θ de 20° a 70°. Tanto para arena como para hueso se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM, equipo LEO EVO 40 XVP) con detector de electrones secundarios. Mediante un Sistema de Microanálisis de Rayos x por Energía Dispersiva (EDS) marca Oxford X-max 50 adosado al microscopio. Se hicieron espectros en diversas micro áreas y se realizó el mapeo de elementos en cada zona seleccionada. Además, se realizó un análisis semicuantitativo de los elementos

presentes. Es importante considerar que el C no fue considerado dentro de la cuantificación, ya que el valor se ve afectado al sumar el C proveniente del grafitado.

Las concentraciones de arsénico producto de la remediación (ecuación 1) se realizaron con un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), Shimadzu, las de flúor por el Método de electrodo selectivo de iones 4500 - F - SM y las de nitrato y amonio mediante una técnica de destilación por arrastre de vapor (técnica Bremner).

El porcentaje de remediación se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\frac{(C_{mst} - C_{mt}) \times 100}{C_{mst}} \quad (1)$$

Donde: C_{mst}: concentración muestra sin tratar; C_{mt}: concentración muestra tratada.

3. Resultados y Discusión

En cuanto a los resultados de caracterización realizados, es importante aclarar que en el caso de la arena no fue posible determinar los valores de densidad relativa y aparente por la presencia de sales higroscópicas y elevada porosidad característica de las arenas de origen marino. Además, la disolución de sales en el agua de ensayo pudo haber modificado su densidad y tensión superficial, afectando las mediciones de volumen desplazado. Partiendo de este conocimiento se reporta que los estudios de remediación se hicieron con arenas sometidas a desecación x 96 horas en mufla a 500°C.

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de los elementos encontrados en las partículas de arena y hueso estudiados, que pasaron por el tamiz N° 200 (75 µm) así como fotografías de las mismas.

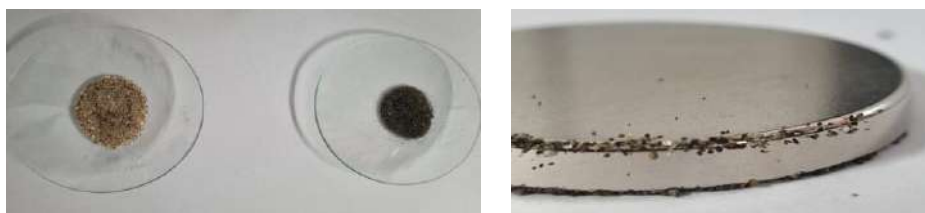




Figura 1. A la izquierda, muestra de arena entera y partículas de arena magnetizables adheridas al imán sobre respectivos vidrios de reloj donde se pesaron; a la derecha imagen ampliada de arena adherida a imán de Neodimio.

Tabla 1. Caracterización química elemental de partículas tamizadas de arena y hueso calcinado.

Caracoles (Círculo rojo)			Partículas negras y grises (Círculo azul y verde)		Partículas rojizas (Círculo violeta)		
Arena			O	50,09	O	47,5	
			Na	4,36	Na	1,17	
			Mg	0,85	M	0,48	
	O	58,73	Al	9,72	Al	5,74	
	Na	0,65	Si	26,86	Si	37,3	
	Al	0,14	K	2,66	K	5,19	
	Si	0,18	Ca	1,82	Ca	0,24	
	Ca	40,31	Ti	0,52	Ti	0,11	
			Mn	0,18	Fe	2,3	
			Fe	2,93			
Hueso	Partículas negras (Círculo azul)		Partículas grises (Círculo verde)				
	O	48,66	O	46,97			
	Na	1,02	Na	0,79			
	Mg	0,72	Mg	0,76			
	Al	0,26	Al	0,24			
	Si	0,56	Si	0,38			
	P	16,57	P	17,18			
	S	0,16	S	0,29			
	Ca	31,88	K	0,12			
	Fe	0,18	Ca	33,26			

La Tabla 2 muestra los porcentajes de remoción obtenidos con cada material para muestras preparadas con sólo un contaminante (muestras sin competencia) como para muestras con tres

contaminantes en forma simultánea, arsénico, flúor y nitratos (muestras con competencia). La muestra de amonio se estudió solamente como contaminante aislado y sólo con hueso.

Tabla 2. Porcentajes de remoción de contaminantes en muestras sin y con competencia iónica.

Muestras sin competencia			
	Hueso	Arena	Hueso y Arena
As	62,50	13,59	58,70
F ⁻	79,92	3,21	79,92
NO ₃ ⁻	-86,49	-6,31	-8,11
NH ₄ ⁺	11,52		
Muestras con competencia			
	Hueso	Arena	Hueso y Arena
As	55,72	29,35	61,19
F ⁻	68,55	4,40	68,55
NO ₃ ⁻	-78,90	-12,84	-6,42

Las determinaciones de hierro en arena y de material magnetizable (Figura 1) arrojan valores de 1,35% y 24,7% respectivamente. Los compuestos magnetizables en arena principalmente Magnetita (Fe_3O_4): óxido de hierro con propiedades magnéticas. Esas diferencias pueden atribuirse a fricción electrostática ya que el movimiento del imán sobre la arena puede generar cargas electrostáticas, las cuales son capaces de atraer partículas no magnéticas muy finas, como cuarzo o arcillas, especialmente si estas tienen bajo peso o si están muy próximas al imán. En la composición tanto de arena como de hueso se repiten casi todos los elementos a excepción del titanio y el manganeso que solo se encuentran en la arena. Naturalmente en la conchilla la proporción de calcio resulta tan importante como en el hueso.

De la Tabla 2 puede concluirse que la remoción de iones en las muestras sin competencia, el hueso muestra un comportamiento marcadamente superior al de la arena tanto para As como para F-. La combinación de ambos materiales no mejora la remoción de As ni de F- pero muestra una disminución del aporte de nitratos por el hueso respecto a la muestra sin arena. Los resultados muestran que el NH_4^+ es pobremente adsorbido por el hueso. Por su parte, en las muestras con competencia disminuye la capacidad de retención de contaminantes del hueso pero mejora para la arena.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos evidencian que el hueso calcinado constituye un material eficiente para la remoción de arsénico y flúor en soluciones contaminadas, superando notablemente a la arena en capacidad adsorbente. En particular, en condiciones sin competencia de contaminantes, se observó un desempeño superior del hueso tratado térmicamente, mientras que, en presencia simultánea de arsénico, flúor y nitratos, su eficacia se mantuvo destacada. Sin embargo, tanto el hueso calcinado como la arena demostraron aportar nitratos al medio acuoso durante el proceso de remediación, lo cual representa una limitación importante. Por lo tanto, se sugiere la incorporación de un tratamiento reductor complementario para eliminar este contaminante residual.

Respecto a la remoción de amonio, los ensayos realizados exclusivamente con hueso calcinado indican su potencial como agente de tratamiento, aunque se requieren estudios adicionales para evaluar su eficacia en presencia de múltiples

contaminantes. En conjunto, los resultados respaldan el uso del hueso calcinado como una alternativa accesible y eficaz para la remediación de aguas con contaminantes inorgánicos, especialmente en contextos donde se busca aplicar tecnologías de bajo costo.

5. Agradecimientos

Los investigadores agradecen el apoyo de esta investigación de la Universidad Tecnológica Nacional – Facultad Regional Bahía Blanca. PID MAINNB0010061.

6. Referencias

- Dey, S. *, Haripavan, N., Basha, S.R. & Babu, G.V. (2021) Removal of ammonia and nitrates from contaminated water by using solid waste bio-adsorbents. *Current Research in Chemical Biology*.
- Donoso, R., & Cortés, S. (2018). Exposición a nitratos en agua y su relación con disfunción de la glándula tiroides: revisión sistemática ¿Existen riesgos para la salud de la población? *Revista médica de Chile*, 146(2), 223-231.
- Espósito, M., Sequeira Mario E., Paoloni J., Blanco M. & Amiotti, N. (2013) Concentraciones de flúor y otros elementos, en aguas del sur de la llanura pampeana, Argentina. *Agua subterránea, recurso estratégico*. Tomo II, VIII Congreso Argentino de Hidrogeología y VI Seminario Latinoamericano sobre Temas Actuales de la Hidrología Subterránea.
- Kamal, M. Z., Md. Hashim, D., & Zin, M. S. (2015). The effect of the ammonium concentration in the groundwater. *People: International Journal of Social Sciences*, 1(1), 313–319.
- Kaseva, M. E. (2006). Optimization of regenerated bone char for fluoride removal in drinking water: A case study in Tanzania. *Journal of Water and Health*, 4(1), 139–147.
- Monroy-Torres, R., & Espinoza-Pérez, J. A. (2018). Factores que intensifican el riesgo toxicológico en comunidades expuestas al arsénico en agua. *Ciencia UAT*, 12(2), 148-157.
- Neira M, Gore F, Bruné M, Espina C, Rodríguez L & Pronczuk J. (2010) Salud infantil y

- medio ambiente: iniciativas de la Organización Mundial de la Salud. Bol Pediatr.;50(Supl. 1):4-10. Accessed October 16, 2025. <https://boletindepediatria.org/boletin/article/view/535>
- Puntoriero, M. L., Volpedo, A. V., & Fernández Cirelli, A. (2014). Riesgo para la población rural en zonas con alto contenido de arsénico en agua. *Acta toxicológica argentina*, 22(1), 15-22.
- S.M. Didar-UI Islam. (2023) Electrochemical remediation of arsenic and fluoride from water: A review of the current state and future prospects, *Environmental Technology & Innovation*, Volume 31, 103148, ISSN 2352-1864,
- Valenzuela, L., Ramírez-Hernández, J., Sol, J. A., & Reyes, J. A. (2011). Alternativas para la eliminación doméstica de flúor en el agua de consumo humano. *Información Tecnológica*, vol.22, n.2 [citado 2025-10-15], pp.23-32.
- Vineet Kumar Rathore and Prasenjit Mondal. (2017) Competitive Adsorption of Arsenic and Fluoride onto Economically Prepared Aluminum Oxide/Hydroxide Nanoparticles: Multicomponent Isotherms and Spent Adsorbent Management. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2017, 56 (28), 8081-8094.

Evaluación de la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* bioacidificadora para la elaboración de vinos Malbec

Sofia Pastorino Aubry¹ y Luciana Paola Prendes^{1,2*}

1. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.
2. Grupo de Biotecnología Enológica, Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria (ICAI- UNCuyo-CONICET); San Rafael M5600APG, Mendoza, Argentina.

*E-mail: lpprendes@fcai.uncu.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Bioacidificación
Cinética fermentativa
Ácido málico
Grado alcohólico

RESUMEN

La elaboración de vinos con menor grado alcohólico y mayor acidez representa un desafío para la industria vitivinícola. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cinética fermentativa y los parámetros fisicoquímicos de vinos Malbec fermentados con una cepa *Saccharomyces cerevisiae* bioacidificadora respecto a una cepa *S. cerevisiae* tradicional para determinar su viabilidad e impacto en la elaboración. Se empleó mosto Malbec de Luján de Cuyo (Mendoza) y 2 cepas de *S. cerevisiae* comerciales: Zymaflore™ KLIMA (Laffort, Francia), capaz de producir etanol y ácido málico; y Zymaflore™ FX10 (Laffort, Francia), productora principalmente de etanol. Como resultado, tanto KLIMA como FX10, completaron la fermentación en nueve y siete días, respectivamente. Los vinos obtenidos con KLIMA mostraron menor grado alcohólico (13,87% v/v) que FX10 (14,3% v/v), mayor acidez total (7,78 g/L) que FX10 (6,62 g/L), menor pH (3,77) que FX10 (3,82), y menor acidez volátil (0,50 g/L) que FX10 (0,62 g/L). Además, KLIMA mostró mayores concentraciones de ácido láctico (0,52 g/L) y glicerol (13,18 g/L) que FX10 (0,03 g/L; 9,31 g/L, respectivamente) mediante análisis de FT-IR. Los resultados demuestran que la cepa bioacidificadora estudiada representa una alternativa viable para elaborar vinos Malbec más frescos y equilibrados, acordes a las demandas actuales.

Evaluation of fermentation with bioacidifying *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Malbec wines

KEYWORDS

Bioacidification,
Fermentation kinetics
Malic acid
Alcohol content

ABSTRACT

The production of wines with lower alcohol content and higher acidity represents a challenge for the wine industry. The objective of this study was to investigate the fermentation kinetics and physicochemical parameters of Malbec wines fermented with a bioacidifying *Saccharomyces cerevisiae* strain compared to a traditional *S. cerevisiae* strain to determine its viability and impact. Malbec must from Luján de Cuyo (Mendoza) and two commercial *S. cerevisiae* strains were used: Zymaflore™ KLIMA (Laffort, France), capable of producing ethanol and malic acid; and Zymaflore™ FX10 (Laffort, France), which mainly produces ethanol. As a result, both KLIMA and FX10 completed fermentation in nine and seven days, respectively. The wines obtained with KLIMA showed a lower alcohol content (13.87% v/v) than FX10 (14.3% v/v), higher total acidity (7.78 g/L) than FX10 (6.62 g/L), lower pH (3.77) than FX10 (3.82), and lower volatile acidity (0.50 g/L) than FX10 (0.62 g/L). In addition, KLIMA showed higher concentrations of lactic acid (0.52 g/L) and glycerol (13.18 g/L) than FX10 (0.03 g/L; 9.31 g/L, respectively) by FT-IR analysis. The results demonstrate that the bioacidifying strain studied represents a viable alternative for producing fresher and more balanced Malbec wines, in line with current demands.

1. Introducción

En la actualidad, existe una demanda en el mercado por bebidas con menor contenido alcohólico e incluso por alternativas sin alcohol (Bucher et al., 2018), lo que se ha reflejado en un aumento superior al 7% en el volumen de estas bebidas en los 10 principales mercados globales en 2022 (Afonso et al., 2024). Esto se debe, principalmente, a la evolución de los hábitos de consumo hacia estilos de vida más saludables (Bucher et al., 2018).

Por otra parte, las principales regiones vitivinícolas están experimentando los efectos del cambio climático, siendo especialmente afectadas las áreas de clima cálido y seco (Keller, 2023), debido al aumento de las temperaturas que junto con los cambios en la distribución de las precipitaciones afectan de manera directa la producción agrícola (Vion et al., 2024; Kontoudakis et al., 2011). Actualmente, es cada vez más frecuente cosechar uvas con un alcohol potencial superior al 14% v/v (van Leeuwen & Darriet, 2016) debido a que se prioriza la madurez fenólica y aromática, lo que resulta en mostos con alta concentración de azúcar y baja acidez (Mira de Orduña, 2010; Kontoudakis et al., 2011).

Para lograr un equilibrio adecuado entre azúcar, alcohol y acidez, existen diversas estrategias que incluyen prácticas vitícolas, así como prefermentativas, posfermentativas y microbiológicas.

Dentro de las alternativas microbiológicas, se pueden emplear cepas comerciales no-*Saccharomyces* que presentan menor rendimiento en etanol ya que, en presencia de oxígeno, derivan parte del consumo de azúcares hacia la respiración (Crabtree-negativas), aunque existen dificultades para su aplicación en fermentaciones industriales (Martín Guindal, 2023). Esto ocurre porque no son capaces de completar la fermentación alcohólica por sí solas, por lo que es necesario realizar co-inoculaciones o inoculaciones secuenciales con cepas de *S. cerevisiae* (Mestre Furlani et al., 2017). Es una alternativa interesante por su impacto en la composición, el perfil aromático y el sabor del vino (Mestre Furlani et al., 2017), permitiendo aprovechar los beneficios de una fermentación espontánea sin los riesgos que supone el desarrollo sin control de estas levaduras iniciadoras (Catelén, 2022).

El uso de *S. cerevisiae* seleccionadas con poder bioacidificante, que metabolizan menores cantidades de ácido málico durante la fermentación (en condiciones normales varía entre 10 y 25%) (Ribéreau-Gayon et al., 2003a), representa una herramienta relevante en el contexto actual. Estas levaduras no solo permiten conservar niveles más altos de acidez en los vinos (Hidalgo Togores, 2010), sino que también poseen metabolismos alternativos que les permiten producir pequeñas cantidades de ácido málico. Este comportamiento se traduce en una menor eficiencia en la conversión de azúcar en etanol y puede emplearse para elaborar vinos de menor graduación alcohólica. Además, la capacidad de conservar y producir ácido málico no solo aporta frescura a nivel sensorial por sus efectos en el pH y acidez total, sino que también contribuye a la estabilidad física, química y microbiológica del vino.

Este estudio se enfoca en la comparación de la cinética fermentativa de una cepa bioacidificadora de *S. cerevisiae* respecto a una *S. cerevisiae* tradicional y en el análisis de las características fisicoquímicas de los vinos Malbec obtenidos, con el fin de evaluar la factibilidad de su aplicación en vinificación.

2. Materiales y métodos

Uvas para la elaboración

El ensayo se realizó a partir de uvas Malbec (*Vitis vinifera* L.) provenientes de viñedos comerciales ubicados en Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina. Los racimos se cosecharon manualmente con un contenido de sólidos solubles de 24 °Brix.

Microorganismos empleados y preparación de inóculo

Se utilizaron dos cepas comerciales de *S. cerevisiae*, Zymaflore™ KLIMA (Laffort, Francia) y Zymaflore™ FX10 (Laffort, Francia). La cepa KLIMA, que promete reducir el grado alcohólico de los vinos hasta un 0,5% v/v y reforzar su acidez, fue considerada como la cepa bioacidificadora. La cepa FX10 es una levadura fructofílica con alta tolerancia al alcohol y resistente en un amplio rango de temperaturas por lo que ofrece una alta seguridad fermentativa. Las levaduras se rehidrataron utilizando una dosis de 20 g/hL en agua a 37-38 °C, en un volumen equivalente

a 10 veces su peso, junto con 20 g/hL de Superstart®, tal como se indica en las fichas técnicas del producto.

Elaboración del vino

El experimento consistió en dos tratamientos (A=Zymaflore™ KLIMA y B= Zymaflore™ FX10), con tres réplicas cada uno. Los racimos se despallaron, manteniendo los granos enteros, y se añadió bisulfito de amonio en solución acuosa (NH₄HSO₃) en una dosis de 6 g/100 kg de uva como antiséptico y antioxidante. La uva despallada se colocó en seis bins plásticos nuevos y limpios de 570 L, llenándolos hasta dos tercios de su capacidad con aproximadamente 400 L de mosto en cada uno.

Tras la adición de las levaduras, la temperatura y la densidad del mosto de cada bin se midieron dos veces al día, a intervalos de 12 horas entre cada registro. Antes de cada registro, se efectuaron bazuques para favorecer la extracción de compuestos polifenólicos y la homogeneización de temperatura, concentración de azúcar y distribución de microorganismos. En el tercer día de fermentación, se adicionó Nutristart® (Laffort, Francia) en una dosis de 25 g/hL.

Los datos de densidad del mosto en el tiempo durante el proceso de fermentación alcohólica permitieron graficar la cinética fermentativa. La velocidad fermentativa se calculó a intervalos diarios como el valor absoluto de la diferencia de azúcar consumida entre un día y el anterior. Los valores de azúcares se obtuvieron a partir de la densidad utilizando la tabla proporcionada en la resolución OIV-OENO 466-2012 de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2012).

Al alcanzar una densidad inferior a 0,994 g/mL, momento en el que se dio por finalizada la fermentación alcohólica, el vino permaneció durante cinco días adicionales en los bins, en contacto con los sólidos y cubiertos por una capa de hielo seco para inertizar. El vino no fue sometido a fermentación maloláctica, por lo que se realizó el sulfitado con metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅) hasta alcanzar un valor de 30 mg/L de SO₂ libre.

Análisis fisicoquímico del mosto y vino

Se utilizaron los métodos de análisis detallados en el Manual de Técnicas Analíticas para mostos y vinos

del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), aprobados por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) (Nazralla et al., 2009).

El contenido de sólidos solubles en mosto se determinó con el índice de refracción con un refractómetro de mano de 0 - 32 °Brix (Arcano Green). El contenido de azúcar (g/L) y alcohol potencial (% v/v a 20 °C) se determinaron conforme a la tabla proporcionada en la resolución OIV-OENO 466-2012 (OIV, 2012).

Contenido en azúcares $\left(\frac{g}{L}\right) \times 0,05943 =$

Grado alcohólico volumétrico potencial $\left(\% \frac{v}{v} \text{ a } 20\text{ °C}\right)$ (1)

También se determinaron en el mosto la acidez total, pH, anhídrido sulfuroso libre y nitrógeno fácilmente asimilable.

En lo que concierne al vino terminado, se realizaron determinaciones inmediatamente después del final de la fermentación, incluyendo la cuantificación de azúcares reductores, alcohol etílico, pH, acidez total y acidez volátil. Como medida derivada, se calculó la tasa de conversión de azúcares en etanol a partir de la relación entre el azúcar fermentable y el porcentaje de etanol producido (Mestre Furlani et al., 2017):

Tasa de conversión de azúcares = $\frac{Az.inicial - Az.final}{Alcohol}$ (2)

donde Az. inicial corresponde al contenido de azúcar del mosto (g/L); Az. final corresponde al contenido de azúcar final (g/L), se consideró igual a 0 a fines prácticos según la tabla de la resolución OIV-OENO 466-2012 (OIV, 2012); Alcohol corresponde al contenido de etanol (% v/v).

Adicionalmente, se utilizó el autoanalizador WineScan™ de FOSS bajo el principio FT-IR, conforme a la Resolución OIV-OENO 390-2010 (OIV, 2010), para cuantificar de manera simultánea diversos compuestos orgánicos (ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, glicerol, fructosa, glucosa, ácido glucónico, ácido tartárico y polifenoles totales mediante el índice de Folin-Ciocalteu).

Análisis estadístico de los datos

Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) paramétrico en función del cumplimiento de los

supuestos de homogeneidad de varianzas, normalidad e independencia, seguido del post-test de Tukey. Cuando los supuestos no se cumplieron, se aplicó un análisis de varianza no paramétrico seguido del post-test de Kruskal-Wallis. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software InfoStat (v2013).

3. Resultados y Discusión

Parámetros fisicoquímicos del mosto

Previo a la inoculación de las levaduras, se determinaron los parámetros fisicoquímicos de los mostos correspondientes a ambos tratamientos (FX10 y KLIMA). En promedio, los mostos presentaron 24,15 °Brix, un alcohol potencial de 14,24% v/v y un contenido de azúcares de 217,62 g/L. El pH fue de 3,66, la acidez total de 4,81 g/L (expresada en ácido tartárico), el anhídrido sulfuroso libre de 5 mg/L y el nitrógeno fácilmente asimilable de 223 mg/L.

Cinética fermentativa y temperatura

Con el objetivo de conocer y comparar la cinética de fermentación de las cepas de levaduras estudiadas, FX10 y KLIMA, se evaluó la cinética fermentativa a través de la evolución de la densidad a lo largo del tiempo. En la Figura 1, se observa que hubo diferencias estadísticamente significativas entre las densidades de las cepas FX10 y KLIMA a partir del día 2, siendo FX10 la que mostró valores de densidad inferiores en cada día evaluado. En el tratamiento con la cepa FX10, se observó una disminución significativa de la densidad el día 4 en comparación con el día previo (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey). En el tratamiento con KLIMA, este descenso pronunciado ocurrió en el día 5 en comparación con el día previo (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey). En ambos casos, este comportamiento podría atribuirse a la adición de nutrientes realizada en el tercer día (25 g/hL de Nutristart®), para favorecer el crecimiento de las levaduras y la correcta finalización de la fermentación. Las diferencias entre ambos tratamientos se mantuvieron hasta el día 6. La fermentación alcohólica finalizó en el día 7 para la cepa FX10, mientras que en KLIMA concluyó en el día 9, lo que evidencia una cinética fermentativa más lenta.

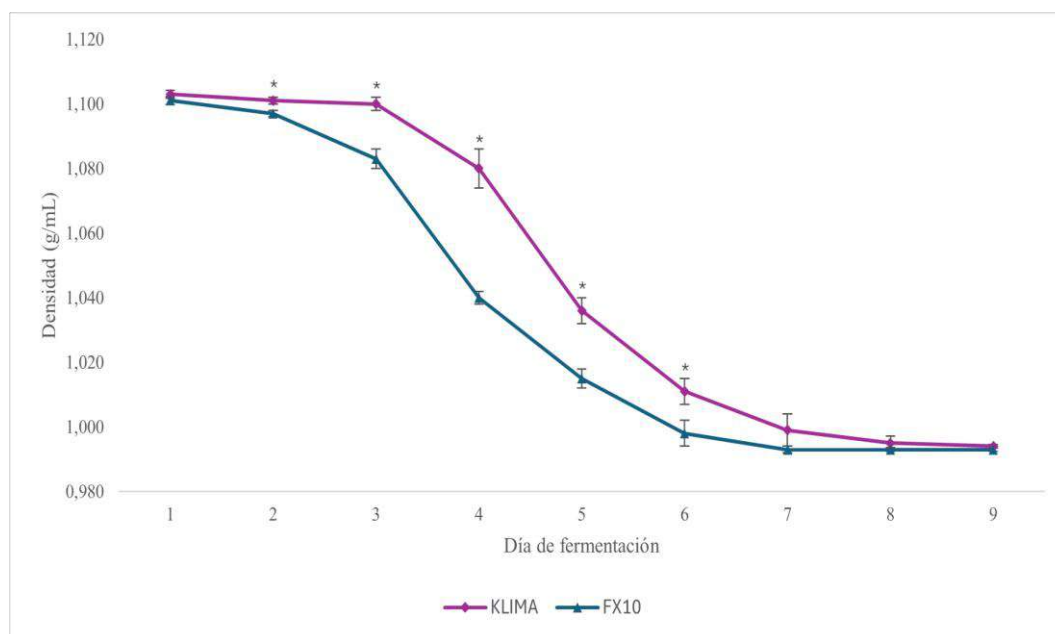


Figura 1. Evolución de la densidad promedio (g/mL) durante la fermentación alcohólica (días) de las cepas KLIMA y FX10. Las barras corresponden a la desviación estándar, se indican con * los días donde existe una diferencia significativa según ANOVA ($p < 0,05$).

Asimismo, se puede observar la velocidad fermentativa en la Figura 2. La cepa FX10 presentó una fase inicial de adaptación al medio durante los días 1 - 2, en la que la velocidad fermentativa fue baja ($10,83 \pm 4,07$ g/L/día). Entre los días 3 - 4 se alcanzó la máxima velocidad fermentativa ($109,93 \pm 5,78$ g/L/día), seguida de una disminución

progresiva hasta la finalización de la fermentación. Por el contrario, KLIMA mostró una cinética más lenta, con velocidades mínimas en los días 1-2 y 2-3 ($5,07 \pm 5,26$ y $2,70 \pm 2,92$ g/L/día, respectivamente) lo que podría indicar una fase de latencia más prolongada.

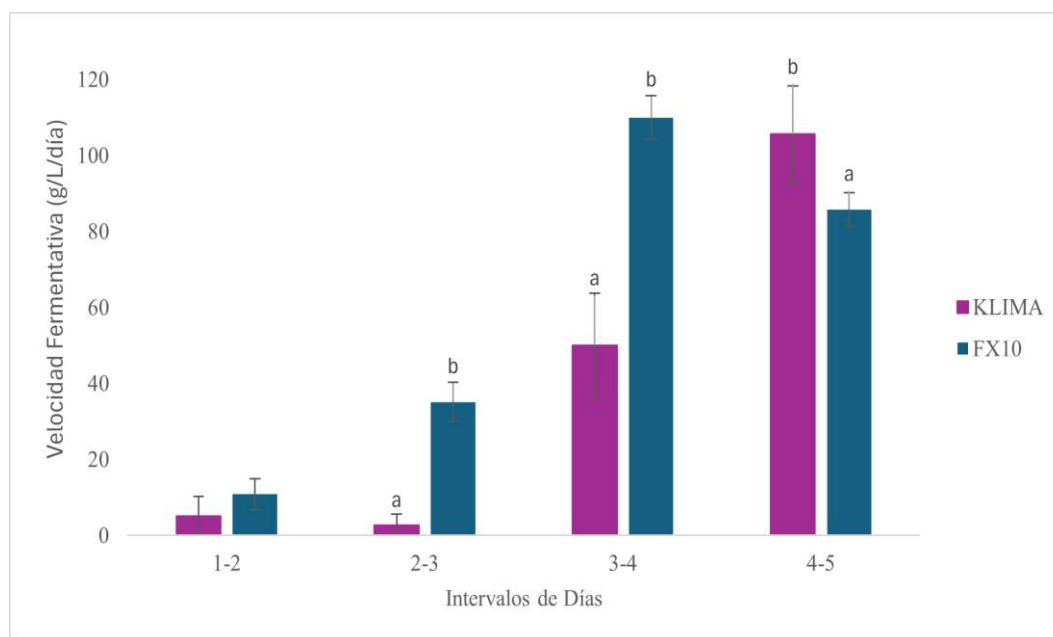


Figura 2. Velocidad fermentativa por intervalos diarios de las cepas KLIMA y FX10, expresada como la reducción de la concentración de azúcar promedio (g/L) por día. Las barras corresponden a la desviación estándar. Letras distintas (a, b) indican diferencias significativas (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey).

La etapa de máxima velocidad fermentativa, que ocurrió entre los días 4 - 5 ($105,67 \pm 12,56$ g/L/día), se alcanzó un día más tarde en comparación con FX10. El análisis estadístico no reflejó diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas por cada uno de los tratamientos (ANOVA, $p > 0,05$), si bien fueron alcanzadas en días distintos, lo que sugiere que ambas cepas poseen una capacidad comparable para alcanzar velocidades máximas de fermentación.

El proceso de fermentación del vino fue monitoreado hasta que se constató su finalización al alcanzar densidades menores a $0,994$ g/mL. La duración total de la fermentación mostró diferencias entre las cepas, con KLIMA finalizando en 9 días y FX10 en 7 días, aunque ambas completaron el proceso exitosamente.

Las diferencias observadas en la duración y la cinética de la fermentación reflejan tanto la

capacidad de adaptación y multiplicación de cada cepa como las particularidades de su metabolismo. La cepa FX10 presentó una fermentación más rápida y homogénea, mientras que KLIMA mostró una cinética más lenta, con un retraso en la fase exponencial y una etapa de desaceleración más prolongada antes de completar la fermentación alcohólica. Estas variaciones podrían atribuirse a su actividad metabólica: FX10 dirige su metabolismo principalmente hacia la conversión de azúcares en etanol, mientras que KLIMA redirige parte de los intermediarios del metabolismo hacia la síntesis de ácido málico, favoreciendo la bioacidificación del medio.

Por otra parte, en la figura 3 se observa que FX10 mostró un incremento progresivo de la temperatura a lo largo del proceso, alcanzando su máximo en el día 4 ($26,37^{\circ}\text{C} \pm 0,40$). Este comportamiento contrasta con KLIMA, que inicialmente mantuvo temperaturas más moderadas, pero alcanzó un pico

térmico superior en el día 5 ($29,23^{\circ}\text{C} \pm 0,32$), coincidiendo con una intensa actividad fermentativa que provocó una marcada disminución en la densidad.

En el día 5 se aplicó hielo seco (solo en el tratamiento KLIMA) para prevenir un aumento excesivo de la temperatura, aunque ésta se mantenía dentro del rango recomendado para la fermentación de vinos tintos (Hidalgo Togores, 2010).

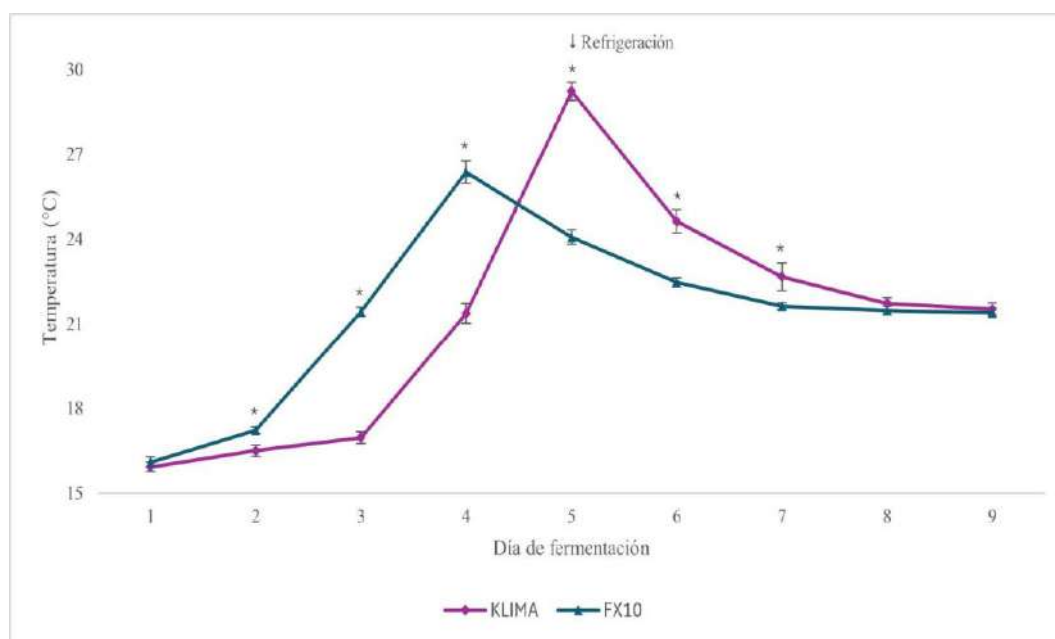


Figura 3. Evolución de la temperatura promedio ($^{\circ}\text{C}$) durante la fermentación alcohólica (días) de las cepas KLIMA y FX10. Las barras corresponden a la desviación estándar, se indican con * los días donde existe una diferencia significativa según ANOVA ($p < 0,05$).

Para ambas cepas, se encontró una correlación positiva entre la temperatura promedio y la velocidad fermentativa (KLIMA, $r = 0,52$, $p = 0,0091$; FX10, $r = 0,56$, $p = 0,0040$), lo que indica que un aumento en la velocidad fermentativa generaría un incremento en la temperatura. Este resultado es coherente, dado que una mayor velocidad fermentativa implica una mayor actividad metabólica de las levaduras y, al tratarse de reacciones exotérmicas, la liberación de calor explica el incremento de la temperatura observado (Hidalgo Togores, 2010). En la etapa final de fermentación (días 8 y 9), las temperaturas en ambos tratamientos se estabilizaron en valores cercanos a $21-22^{\circ}\text{C}$, sin diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $p > 0,05$), reflejando la disminución de la actividad metabólica de las levaduras.

Parámetros fisicoquímicos del vino terminado

Los resultados muestran que el contenido medio de etanol fue mayor en el tratamiento FX10, con un promedio de $14,3 \pm 0,1$ % v/v; mientras que el tratamiento KLIMA alcanzó un promedio de $13,87 \pm 0,06$ % v/v (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey) (Tabla 1). Este resultado es consistente con la caracterización de la cepa FX10 como levadura de alto rendimiento alcohólico, mientras que la cepa KLIMA presentó una producción inferior relacionada con su capacidad de desviar parte de los azúcares hacia la síntesis de metabolitos distintos al etanol. Esta disminución del 0,43% v/v se aproxima a lo indicado en la ficha técnica de KLIMA, que reporta reducciones de hasta 0,5% v/v.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de las cepas FX10 y KLIMA al finalizar la fermentación alcohólica y su comparación entre tratamientos.

Parámetro	KLIMA	FX10	p-valor*
Alcohol (% v/v)	13,87 ± 0,06	14,3 ± 0,1	0,0029
Acidez Total (g/L de ácido tartárico)	7,78 ± 0,03	6,62 ± 0,02	<0,0001
Acidez Volátil (g/L de ácido acético)	0,50 ± 0,01	0,63 ± 0,03	0,0015
pH	3,77 ± 0,02	3,82 ± 0,01	0,0101

* p-valor corresponde a ANOVA.

Respecto al alcohol potencial, para el mosto inoculado con FX10 se obtuvo un valor de $14,22 \pm 0,11$ % v/v, que no difirió significativamente del alcohol realmente obtenido ($14,3 \pm 0,1$ % v/v) (ANOVA, $p > 0,05$). Por el contrario, el alcohol potencial calculado para el mosto inoculado con KLIMA ($14,25 \pm 0,04$ % v/v) resultó significativamente mayor que el alcohol realmente obtenido ($13,87 \pm 0,06$ % v/v) (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey). Esto se debe a las rutas metabólicas alternativas de KLIMA que reducen la eficiencia de conversión en alcohol. Por lo tanto, la estimación del alcohol potencial antes de la fermentación alcohólica resulta más compleja al utilizar KLIMA, ya que las tablas y factores de corrección suelen basarse en cepas con alta eficiencia en la producción de etanol. Al finalizar la fermentación, la concentración de azúcares reductores fue mínima ($1,80 \pm 0$ g/L) para ambas cepas, lo que confirma que el proceso se completó y el vino se consideró seco.

En relación a la tasa de conversión de azúcares en etanol, las cepas evaluadas presentan tasas más bajas en comparación con valores teóricos, que se sitúan entre 16 a 17 g/L por cada 1% v/v de etanol producido dependiendo de las condiciones del medio y del tipo de levadura (Hidalgo Togores, 2010). Los valores promedio se situaron en 15,70 g/L % v/v $\pm 0,02$ para KLIMA y 15,21 g/L % v/v $\pm 0,02$ para FX10, mostrando diferencias significativas entre cepas (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey). Resultados similares fueron reportados por Mestre Furlani et al. (2017), quienes observaron en *S. cerevisiae* BSc114 una tasa de conversión de 16,04 g/L % v/v, valor próximo al teórico y consistente con lo esperado para estas cepas. Estos resultados indican que la cepa KLIMA presentó una tasa de conversión de azúcares en etanol superior al de FX10, lo cual indica que consume más azúcar por unidad de alcohol producido e implica diferencias en la eficiencia relativa de conversión de azúcares en etanol entre las cepas estudiadas. Este comportamiento era esperable, dado que KLIMA se caracteriza por

desviar parte del azúcar hacia otras rutas metabólicas y su capacidad para preservar la acidez, lo que reduce su eficiencia en la producción exclusiva de etanol. Esta característica podría resultar beneficiosa para su aplicación en mostos con elevada concentración de azúcar, ya que permitiría obtener vinos con menor graduación alcohólica y mayor frescura.

Por otra parte, la cepa KLIMA presentó una acidez total de $7,78 \pm 0,03$ g/L, significativamente superior a la observada en FX10 ($6,62 \pm 0,02$ g/L) (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey) (Tabla 1). Este resultado confirma que KLIMA permite conservar e incluso aumentar la acidez durante la fermentación alcohólica, promoviendo una mayor acidificación del medio en comparación con FX10.

Respecto a la acidez volátil, FX10 presentó un valor promedio de $0,63 \pm 0,03$ g/L, significativamente superior al registrado para KLIMA ($0,50 \pm 0,01$ g/L) (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey) (Tabla 1). La acidez volátil puede generarse como subproducto de la fermentación alcohólica de *S. cerevisiae*, también es un producto del metabolismo de bacterias acéticas y lácticas (Vilela et al., 2010). Si bien ambas cepas produjeron niveles aceptables de acidez volátil, este parámetro está directamente asociado a la calidad de los vinos, dado que concentraciones elevadas repercuten de manera negativa en la misma (Ribéreau-Gayon et al., 2003b). La menor producción registrada para la cepa KLIMA constituye una ventaja tanto sensorial como enológica.

En cuanto al pH, los valores también difirieron significativamente entre tratamientos (ANOVA, $p < 0,05$, Tukey) (Tabla 1), siendo el vino fermentado con la cepa KLIMA ($3,77 \pm 0,02$) ligeramente más ácido que el fermentado con FX10 ($3,82 \pm 0,01$). Esta disminución del pH es coherente con la mayor acidez total observada en KLIMA respecto a FX10, lo que confirma su capacidad para conservar o incluso aumentar la acidez durante la fermentación alcohólica. Como consecuencia, la acidificación del

medio contribuye favorablemente a la estabilidad microbiológica, a la eficacia del uso de anhídrido sulfuroso y a la percepción de frescura del vino. Adicionalmente, se realizó un análisis fisicoquímico complementario de los vinos elaborados con las cepas FX10 y KLIMA con el autoanalizador

WineScan™ de FOSS bajo el principio FTIR. Para este análisis, se trabajó con una muestra por tratamiento obtenida de la homogeneización de las tres réplicas, por lo que no fue posible realizar un análisis estadístico. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del análisis fisicoquímico complementario con autoanalizador de las cepas KLIMA y FX10.

Parámetro	KLIMA	FX10
Ácido málico (g/L)	2,57	2,81
Ácido láctico (g/L)	0,52	0,03
Fructosa (g/L)	1,53	1,78
Glucosa (g/L)	0,17	0,64
Ácido cítrico (g/L)	0,65	0,63
Índice Folin-Ciocalteu	45,93	42,92
Ácido glucónico (g/L)	0,00	0,00
Glicerol (g/L)	13,18	9,31
Ácido tartárico (g/L)	1,49	1,52
Fructosa + Glucosa (g/L)	1,70	2,42

Respecto al contenido de ácido málico, obteniéndose valores de 2,81 g/L para FX10 y 2,57 g/L para KLIMA. Aunque ambos tratamientos presentaron concentraciones similares, se esperaba un contenido más elevado para KLIMA debido a su capacidad de biosíntesis de ácido málico a partir de rutas metabólicas secundarias. La menor concentración observada podría explicarse, al menos en parte, por la temperatura máxima alcanzada por KLIMA durante la fermentación: en el día 5 se registraron temperaturas elevadas ($29,23^{\circ}\text{C} \pm 0,32$), las cuales, según Su et al. (2014), podrían favorecer la degradación del ácido málico por cepas termotolerantes como *S. cerevisiae*. En este contexto, es relevante señalar que KLIMA fue el único tratamiento en el que se aplicó refrigeración y refleja la importancia de controlar la temperatura para no comprometer el potencial de bioacidificación.

Estudios previos han demostrado que ciertas cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* pueden producir hasta 3 g/L de ácido málico y reducir el pH del vino hasta en 0,5 unidades en comparación con cepas consumidoras de este ácido (Vion et al., 2023). En la misma línea, Yeramian et al. (2007) aislaron cepas de *S. cerevisiae* y encontraron que solo 10 de un total de 282 fueron capaces de producir ácido L(-)-málico en concentraciones de entre 0,5 y 1 g/L durante la fermentación alcohólica. Según estos autores, las levaduras sintetizan ácido málico L(-) a través de la

vía del fumarato, catalizada por la enzima fumarasa citosólica o mitocondrial, o a través del ácido oxalacético, catalizada por la enzima malato deshidrogenasa. Además, se observó que la producción de ácido málico se vio favorecida por temperaturas entre 18 y 25 °C, así como por mostos con pH elevado y bajas concentraciones de azúcar, ácido málico inicial y nitrógeno fácilmente asimilable (Yeramian et al., 2007).

Por otra parte, el tratamiento con KLIMA presentó una concentración más elevada de ácido láctico (0,52 g/L) en comparación con FX10 (0,03 g/L). Este resultado es coherente con la mayor acidez total observada en KLIMA respecto a FX10. La mayor concentración de ácido láctico podría estar asociada al metabolismo de la levadura o a una fermentación maloláctica parcial realizada por bacterias ácido lácticas en paralelo a la fermentación alcohólica. La primera posibilidad resulta poco probable, ya que *S. cerevisiae* solo produce trazas de ácido láctico durante la fermentación debido a la ineficiencia de las enzimas lactato deshidrogenasas en las mitocondrias (Vicente et al., 2022). La segunda posibilidad resulta más probable, ya que también explicaría la menor concentración de ácido málico en KLIMA, al haber sido parcialmente metabolizado por bacterias lácticas. Es posible que estas bacterias, presentes en la vendimia y capaces de alcanzar poblaciones de 102 células/mL durante la fermentación alcohólica (Hidalgo Togores, 2010), se

hubieran desarrollado antes de que finalizara la fermentación y comenzado a degradar el ácido málico, previo al sulfitado e inertización final. Finot (2018) obtuvo resultados similares, observando que los vinos elaborados con levaduras bioacidificadoras presentaron mayor acidez total y niveles más altos de ácido láctico al final de la fermentación en comparación a levaduras convencionales.

Respecto a la concentración de glicerol, fue mayor en KLIMA (13,18 g/L) frente a FX10 (9,31 g/L). Estos resultados coinciden con los reportados por Pascual et al. (2017), quienes observaron que los vinos fermentados con una cepa bioacidificadora presentaban un menor contenido de alcohol y una mayor concentración de glicerol, concluyendo que la levadura redirige parte del flujo metabólico de los azúcares hacia la producción de glicerol.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que el impacto de KLIMA sobre la acidez del vino no se limita exclusivamente a la acumulación de ácido málico. Por el contrario, su contribución parece responder a un equilibrio más complejo de ácidos orgánicos, lo cual debe ser considerado al evaluar su utilidad tecnológica en mostos con baja acidez inicial.

En cuanto a los azúcares reductores (expresados como fructosa + glucosa), se observaron valores bajos, con 2,42 g/L en FX10 y 1,70 g/L en KLIMA. Los resultados confirman que la fermentación alcohólica fue completa, obteniéndose vinos secos (<4 g/L) (Instituto Nacional de Vitivinicultura, 2012).

4. Conclusiones

La cepa *S. cerevisiae* bioacidificadora evaluada (Zymaflore™ KLIMA) en las vinificaciones a escala piloto realizadas con la variedad Malbec, presentó una cinética fermentativa más lenta en comparación con la cepa de *S. cerevisiae* tradicional productora principalmente de etanol (Zymaflore™ FX10). La cepa bioacidificadora se caracterizó por una mayor fase de latencia y una etapa de desaceleración más prolongada; no obstante, estas diferencias no afectaron su capacidad para completar la fermentación, la cual finalizó en nueve días, frente a los siete días requeridos por la cepa tradicional. En particular, el control de la temperatura durante la fermentación con KLIMA resulta un factor clave para preservar su potencial bioacidificador.

En cuanto a la composición final de los vinos, el tratamiento con la cepa bioacidificadora alcanzó un menor grado alcohólico ($13,87 \pm 0,06$ % v/v) en comparación con la cepa tradicional ($14,3 \pm 0,1$ % v/v), lo que confirma su potencial para la elaboración de vinos con menor graduación alcohólica. Asimismo, también mostró una acidez total superior ($7,78 \pm 0,03$ g/L) y un pH más bajo ($3,77 \pm 0,02$) respecto a la cepa tradicional ($6,62 \pm 0,02$ g/L y $3,82 \pm 0,01$, respectivamente), lo que confirma su capacidad de preservar e incrementar la acidez durante la fermentación alcohólica. Cabe destacar que la cepa bioacidificadora presentó, además, valores más bajos de acidez volátil ($0,50 \pm 0,01$ g/L) en comparación con la cepa tradicional ($0,63 \pm 0,03$ g/L), lo que representa una ventaja adicional no reportada previamente, debido al impacto negativo que este parámetro puede tener sobre la calidad del vino.

En términos de ácidos orgánicos, ambas cepas mostraron concentraciones similares de ácido málico (2,57 g/L y 2,81 g/L para la cepa bioacidificadora y la tradicional, respectivamente). Sin embargo, los vinos elaborados con la cepa bioacidificadora mostraron mayores concentraciones de ácido láctico (0,52 g/L) y glicerol (13,18 g/L), compuestos que contribuyen positivamente a la calidad sensorial del vino, sugiriendo que la capacidad de acidificación podría responder a un metabolismo más complejo que involucra no sólo a la producción de ácido málico.

5. Agradecimientos

A la Bodega Alta Vista y a Adrián Meyer, por su colaboración en la realización del ensayo y por proporcionar los materiales necesarios para la elaboración y el análisis fisicoquímico de los vinos. Al Laboratorio MAG SRL, por llevar a cabo los análisis mediante el autoanalizador FT-IR FOSS.

6. Referencias

- Afonso, S. M., Inês, A., & Vilela, A. (2024). Bio-dealcoholization of wines: Can yeast make lighter wines? *Fermentation*, 10(1), 36.
- Bucher, T., Deroover, K., & Stockley, C. (2018). Low-alcohol wine: A narrative review on consumer perception and behaviour. *Beverages*, Volumen 4(4), 82.
- Catelén, M. J. (2022). Combinación de estrategias pre-fermentativas y fermentativas para

- reducir el contenido de alcohol y el pH en vinos Malbec. Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>
- Finot, M. (2018). Testing the effect of yeast strain (CY3079 vs. Ionys WF, Scottlabs) and fermentation temperature on chemistry and flavor of Chardonnay. King Family Vineyards.}
- Hidalgo Togores, J. (2010). Tratado de Enología, Tomo I (2da ed.). Ediciones Mundi-Prensa.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. (2012). Resolución Nº 61/2012. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.
- International Organisation of Vine and Wine. (2010). Resolution OIV-OENO 390/2010: Guidelines on infrared analysers in enology. OIV.
- International Organisation of Vine and Wine. (2012). Resolution OIV-OENO 466/2012: Modification of the method of evaluation by refractometry of the sugar concentration in grapes, musts, concentrated grape musts and rectified concentrated grape musts. OIV.
- Keller, M. (2023). Climate change impacts on vineyards in warm and dry areas: Challenges and opportunities. *American Journal of Enology and Viticulture*, 74(2), 0740033.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 230–238.
- Laffort. (2024). Catálogo Laffort 2024. Recuperado de https://laffort.com/wp-content/uploads/Catalogues/CT_ES_Laffort_2024.pdf
- Martín Guindal, A. (2023). Estrategias de uso de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas (Tesis doctoral). Universidad de La Rioja, España.
- Mestre Furlani, M. V., Maturano, Y. P., Combina, M., Mercado, L. A., Toro, M. E., & Vazquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: A strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS Yeast Research*, 17(2), fox010.
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855.
- Nazralla, J. J. B., Paladino, S. C., Vila, H. F., & Lucero, C. C. (2009). Manual de técnicas analíticas para mostos y vinos. Ediciones INTA.
- Pascual, O., Pons-Mercadé, P., Gombau, J., Ortiz-Julien, A., Heras, J., Fort Marsal, M. F., Canals, J.-M., & Zamora, A. (2017). Study of the effectiveness of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* selected for the production of wines with higher acidity and lower alcoholic strength. *BIO Web of Conferences*, 9, 02002.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003a). Tratado de enología. Tomo I: Microbiología del vino – Vinificaciones (1ª ed.). Ediciones Hemisferio Sur-Mundi-Prensa.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2003b). Tratado de enología. Tomo II: Química del vino – Estabilización y tratamientos (1ª ed.). Ediciones Hemisferio Sur-Mundi-Prensa.
- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y.-Y., & Li, H. (2014). The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2395–2413.
- Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y.-Y., & Li, H. (2014). The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2395–2413.
- van Leeuwen, C., & Darriet, P. (2016). The impact of climate change on viticulture and wine quality. *Journal of Wine Economics*, 11(2), 150–167.
- Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726.
- Vilela, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R., Chaves, S., Sousa, M., & Côrte-Real, M. (2010). The impact of acetate metabolism

- on yeast fermentative performance and wine quality: Reduction of volatile acidity of grape musts and wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 271–280.
- Vion, C., Muro, M., Bernard, M., Richard, B., Valentine, F., Yeramian, N., Masneuf-Pomarède, I., Tempère, S., & Marullo, P. (2023). New malic acid producer strains of *Saccharomyces cerevisiae* for preserving wine acidity during alcoholic fermentation. *Food Microbiology*, 112, 104209.
- Vion, C., Yeramian, N., Hranilovic, A., Masneuf-Pomarède, I., & Marullo, P. (2024). Influence of yeasts on wine acidity: New insights into *Saccharomyces cerevisiae*. *OENO One*, 58(4).
- Yeramian, N., Chaya, C., & Lepe, J. (2007). L-(–)-Malic acid production by *Saccharomyces* spp. during the alcoholic fermentation of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(5), 912–919.



Crosc compilación Python de VHDL para promover el aprendizaje de Hardware Reconfigurables

Jaime Alberto Parra-Plaza^{1*}

1. Grupo de Investigación en Bionanoelectrónica, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

*E-mail: jaimealberto.parra@gmail.com

PALABRAS CLAVES

Crosc compilación
Hardware reconfigurable
Lenguaje de descripción de hardware
Python

RESUMEN

Los dispositivos de hardware reconfigurable han revolucionado la forma en que se diseñan sistemas electrónicos a la medida y han permitido lograr soluciones que aprovechan al máximo recursos limitados como la batería o el espacio. Sin embargo, lograr la experticia en estos dispositivos es un reto tanto para la industria como para la academia. Si bien actualmente existen herramientas que proveen la posibilidad de diseños en alto nivel, la eficiencia lograda en la solución final con este método no es la más conveniente, de allí que sea aún necesario trabajar en buena medida con diseños en bajo nivel, particularmente con lenguajes de descripción de hardware, los cuales han mostrado ser particularmente difíciles de aprender para muchos estudiantes en ingeniería electrónica. En este artículo se presentan los resultados de una investigación cuyo objetivo fue la creación de una herramienta de crosc compilación que permite a los alumnos describir sus sistemas hardware en el lenguaje de alto nivel Python. La herramienta genera una versión VHDL apropiada para sintetizar un procesador a la medida con uso óptimo de recursos. Los resultados indican mejoras en la tasa de aprendizaje en términos de interés, motivación y asimilación, siguiendo el modelo de estilos de aprendizaje de Kolb.

Python cross-compilation of VHDL to foster learning of Reconfigurable Hardware

KEYWORDS

Cross-compilation
Reconfigurable hardware
Hardware description language
Python

ABSTRACT

Reconfigurable hardware devices have revolutionized the way custom electronic systems are designed, enabling solutions that maximize the use of limited resources, such as the battery life of portable devices or the space available in functional blocks that must operate in a macro system with significant area constraints. However, achieving expertise in the management of these devices is a challenge for both industry and academia. While tools currently exist that provide high-level design capabilities, the efficiency achieved in the final solution with this method is not optimal. Therefore, it is still necessary to work largely with low-level designs, particularly with hardware description languages, which have proven particularly difficult to learn for many electronic engineering students. This paper presents the results of a research project aimed at creating a cross-compilation tool that allows students to describe their hardware systems in a high-level language such as Python. The tool generates a VHDL version suitable for synthesizing a custom processor with optimal resource utilization. The results indicate an improvement in the learning rate given in terms of interest, motivation and assimilation, following Kolb's learning styles model.

1. Introducción

La electrónica constituye uno de los pilares de la sociedad actual. Gracias a ella, ha sido posible automatizar un sinnúmero de procesos y lograr potencias de cómputo cada vez mayores con dispositivos que son consistentemente más pequeños y más rápidos.

En el caso particular de la electrónica digital, el dispositivo estrella fue, y todavía lo es en gran medida, el microprocesador. Gracias a él, los ingenieros han podido crear sistemas cuyo poder de cómputo supera con creces a los grandes y monumentales equipos de cómputo que hace tan

solo unas pocas décadas ocupaban salas enteras y costaban millones de dólares (O'Regan, 2021).

Sin embargo, las prestaciones de los microprocesadores actuales, y por ende su costo, exceden por mucho las necesarias para gran cantidad de soluciones en donde, si bien se requiere cierto poder de cómputo, éste es sólo una fracción del disponible en un microprocesador convencional. Para cubrir ese segmento se han propuesto diferentes alternativas, tales como los microcontroladores o el hardware a la medida. No obstante, y dado que el cambio generacional entre una solución y la siguiente versión se mide actualmente en meses o incluso en semanas, cuando antes era en años, surgió hace algunas décadas un fuerte competidor en este segmento: los dispositivos de hardware reconfigurable (Blokdyk, 2018). El hardware reconfigurable constituye en principio el sueño hecho realidad de todo diseñador de sistemas digitales. En un dispositivo se tiene un arreglo de compuertas lógicas que inicialmente tienen una capacidad omnipotente de conectarse unas con otras en cualquier configuración arbitraria, de allí que también se conozca como FPGA por la sigla en inglés de arreglo de compuertas programable en campo, una de las estructuras reconfigurables más populares en este tipo de dispositivos (ver Figura 1).

Una FPGA está constituida por un conjunto de CLBs o bloques lógicos configurables, que son pequeños arreglos de circuitos digitales típicos, tales como un grupo de compuertas AND, OR y XOR, junto con algunos dispositivos de memoria como latches y flip-flops. Entre los CLB discurren, a manera de autopistas, líneas de conexión que pueden seleccionarse a voluntad para que conecten un CLB en particular con otro. Si bien este nivel de detalle es apropiado para el diseñador mismo de los FPGA, el ingeniero digital usa el dispositivo como una caja negra e interactúa con ella a través de una herramienta de configuración de alto nivel (Nicolescu y Mosterman, 2018).

De esta manera, el diseñador puede ensayar diferentes configuraciones circuitales para que cuando eventualmente logre una que satisfaga los requerimientos de diseño, decidir si procede a fabricarlo en una pastilla de silicio dedicada o, en el caso de que sólo se requieran algunas unidades, dejar que el propio diseño logrado en la FPGA sea a la vez el dispositivo de trabajo. Si bien la cantidad de reconfiguraciones que se puede hacer en la práctica no es infinita, sí son suficientes para que un diseñador avezado logre obtener resultados en un tiempo prudencial. Lograr la experticia en el diseño digital usando FPGA requiere el dominio de un

conjunto variado de técnicas y herramientas y una en particular se muestra particularmente retadora para los estudiantes de ingeniería que entran al mundo del diseño de sistemas digitales. Es en este punto en donde la necesidad del presente proyecto entra en escena. El proyecto, denominado Py2HDL ofrece a los alumnos una herramienta tecnológica que permite abordar el aprendizaje del diseño de sistemas en hardware reconfigurable de una forma más afín a los postulados de las ciencias pedagógicas en cuanto a la forma en que el aprendizaje deviene en el ser humano. Py2HDL permite a los alumnos adquirir incrementalmente las destrezas necesarias para comprender y dominar el lenguaje VHDL partiendo de un lenguaje más accesible como es Python, junto con un conjunto de dinámicas basadas en el modelo de aprendizaje de Kolb.

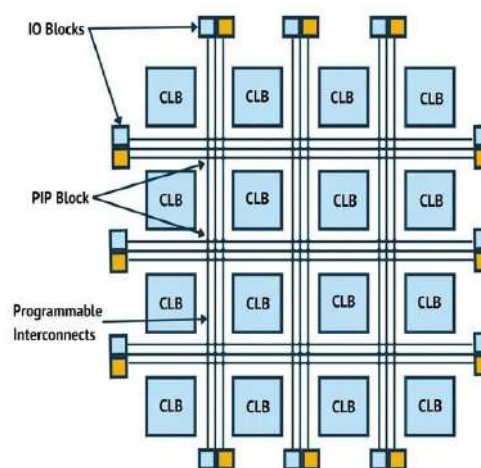


Figura 1. Estructura interna de un dispositivo de hardware reconfigurable.

2. Materiales y métodos

Entorno de desarrollo para FPGA

La complejidad de las FPGA actuales es tal que literalmente están constituidas por cientos de miles de compuertas lógicas, por lo que abordar un diseño a ese nivel es impensable. Es por ello que los fabricantes de las mismas ofrecen herramientas de cómputo muy elaboradas que se encargan de manejar el dispositivo a nivel de compuerta, al tiempo que ofrecen al diseñador una interfaz que le permite interactuar con el dispositivo a nivel de sistema (ver Figura 2).

Por otra parte, al igual que un microprocesador es útil en la medida en que se conectan periféricos a él, por ejemplo teclados, pantallas, interfaces de comunicación, etc., de la misma manera, en la

práctica, el diseño con dispositivos FPGA se hace empleando tarjetas de desarrollo, elaboradas ya sea por los mismos fabricantes o por terceros. Estos módulos de desarrollo contienen periféricos para que la comunicación con la FPGA sea más cómoda.

Periféricos típicos son por ejemplo un conjunto de interruptores y pulsadores a manera de entrada, arreglos de LEDs o pantallas LCD a manera de salida y diversas interfaces de comunicación como ethernet, USB o bluetooth (ver Figura 3).

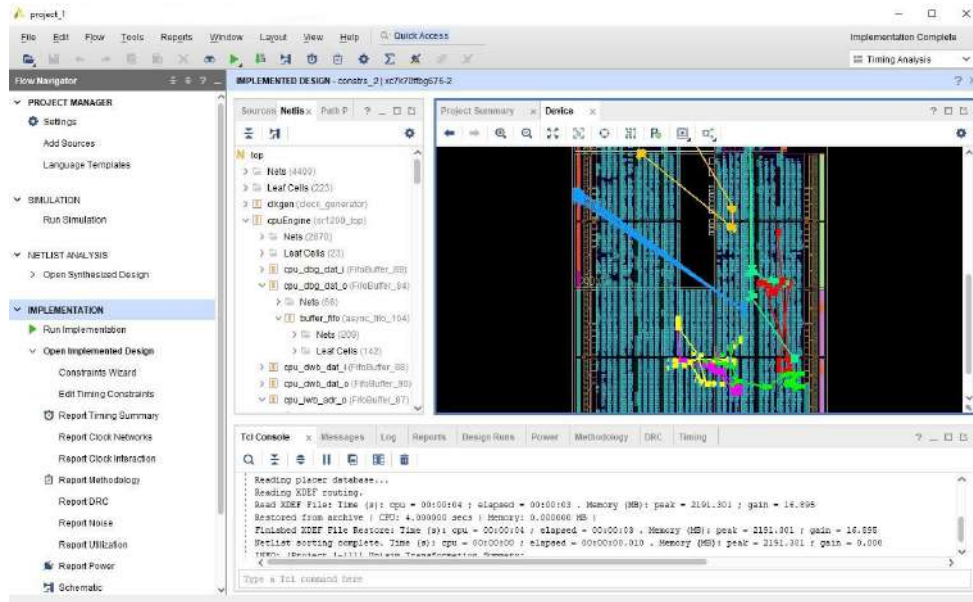


Figura 2. Interfaz típica de un entorno de desarrollo para hardware reconfigurable

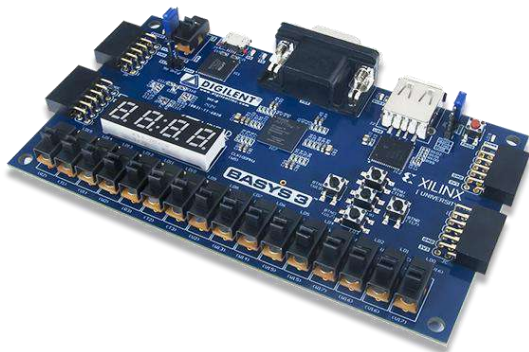


Figura 3. Tarjeta de desarrollo típica para interactuar con un dispositivo de hardware reconfigurable.

Lenguajes de descripción de hardware

Así como una FPGA es compleja en su estructura circuital, es tanto o más compleja cuando está en operación como un sistema lógico secuencial. Basta sólo con pensar en la interacción simultánea de sus miles de celdas lógicas para darse una idea de la magnitud comportamental que puede obtenerse. Dado el paralelismo extremo que aparece, emplear simples métodos de diseño como tablas de verdad o máquinas de estado es sólo posible para diseños muy simples. Para diseños medianos a grandes, se hace indispensable un nivel de abstracción mucho mayor. Es por ello que los fabricantes y los

diseñadores digitales acogieron en un momento dado una opción que en principio se usó para la documentación de dispositivos tipo VLSI, pero que se ha popularizado y ha encontrado su nicho en el mundo del hardware reconfigurable: los lenguajes de descripción de hardware o HDL (Pedroni, 2016).

Un lenguaje de programación convencional describe las operaciones que realiza un microprocesador ya sea real o virtual de forma secuencial. Lenguajes típicos son C, C++, Java o Python. Por su parte, un HDL es un lenguaje que describe la forma en que un circuito digital está estructurado. Si bien su apariencia, en términos de sintaxis, puede llegar a hacerlo similar a un lenguaje de programación, su propósito y uso son bastante diferentes. Estas diferencias suelen ser pasadas por alto por los estudiantes que recién inician a usar el lenguaje e incluso por diseñadores con más experiencia. Esto se debe en gran medida al hecho de que nuestro cerebro, al menos en su parte consciente, comprende mucho más fácilmente los procesos que son secuenciales. Aquéllos que son concurrentes, por su propia definición, requieren ser analizados como si se tomara una foto o instantánea de un momento particular (Jasinski, 2016).

A pesar de que se han propuesto diversos lenguajes de descripción de hardware, hay dos que sobresalen

y son por mucho los más populares en el mundo del diseño digital: VHDL y Verilog. En el caso de Latinoamérica, la preferencia es por el primero de ellos y ese es el lenguaje que se empleó en el presente proyecto. Se procede ahora a analizar brevemente el HDL en sí. Para una introducción más detallada a los conceptos fundamentales del lenguaje, consultar (Parra-Plaza, 2020). VHDL es un lenguaje que se basa en la definición de bloques lógicos estructurales. Cada bloque está compuesto ya sea por descripciones explícitas de operaciones lógicas combinacionales o por descripciones en alto nivel de comportamientos secuenciales. El lenguaje es altamente jerárquico y permite anidar estructuras a cualquier nivel de profundidad que se desee. Las únicas operaciones nativas son las operaciones lógicas booleanas tradicionales. Los demás constructos se realizan por operaciones de decisión, mediante el clásico if, y por operaciones de iteración, al hacer uso explícito de la retroalimentación de variables, que en el caso de VHDL se designan más apropiadamente como señales, para indicar su naturaleza física. Esta mezcla, que en principio es muy conveniente para el diseñador experimentado, constituye, según los análisis que el autor ha realizado, una de las fuentes de mayor confusión en el momento en que el aprendiz intenta comprender apropiadamente el funcionamiento de un sistema descrito en VHDL (Parra-Plaza, 2015). Considere por caso el fragmento de código presentado en la Figura 4.

```

if pol='1' then      ①②③④
    a <= buf1;      ① ③
else
    a <= not buf1;  ② ④
end if;

if act='1' then      ①②③④
    res <= a or b;   ① ④
else
    res <= a and b;  ②③
end if;

```

Figura 4. Fragmento de código en VHDL ilustrando los problemas de concurrencia.

En principio se observa que en términos de sintaxis este código es parecido a cualquier otro lenguaje convencional de programación. Si se analiza de esa forma, es decir como si la ejecución fuese secuencial, línea por línea, se tiene que pasaría por el primer if, a partir del cual la variable a toma algún valor y, cuando se ingresa al segundo if, ese valor de a se usaría para asignar un valor subsecuente a la variable res. Sin embargo, este no es el caso en el lenguaje

VHDL. Dado que él no describe instrucciones a ser ejecutadas, sino que describe hardware, se debe analizar como si ambos if se están ejecutando en paralelo. De esta manera, las variables a y res, en tanto que señales, dada su naturaleza física, están cambiando simultáneamente. Esta forma de comprender el funcionamiento de un código en VHDL es bastante retardadora y el diseñador debe hacer un ejercicio constante de recordar esta característica, en tanto la asimile y la haga parte de su experticia (Parra-Plaza, 2012).

Croscompilación software

El primer paso en el proceso de diseño de un sistema digital es lograr una descripción apropiada del mismo que satisfaga los diferentes requerimientos funcionales, comportamentales y físicos (Parra-Plaza, 2016). En el caso del presente proyecto, esta actividad culmina cuando se tiene un código Python que describe esa funcionalidad. Se eligió Python como lenguaje de descripción de alto nivel porque satisface la mayoría de características que el autor y su equipo definieron para tal propósito (Parra-Plaza, 2023), teniendo en la cuenta además que el presente proyecto articula con otros proyectos en un macroproyecto destinado a promover el aprendizaje significativo mediante herramientas tecnológicas, en el cual Python se emplea transversalmente (Parra-Plaza, 2018). Es claro que los fabricantes de FPGA son conscientes de la necesidad de disponer de lenguajes y herramientas de descripción de alto nivel, pero las que se ofrecen actualmente, tales como SystemC (Black et al., 2009) o Amaranth (Amaranth Project, 2023), están aún muy ligadas al hardware y requieren que el diseñador describa explícitamente estructuras como el reloj del sistema o el número de bits de cada variable. Esas características son indeseables a la luz de la filosofía que guía este proyecto y eso reafirma la decisión de emplear Python en su forma nativa, sin requerir ningún tipo de modificación ni en su sintaxis ni en su procesamiento (Parra-Plaza, 2019).

En informática se habla de dos conceptos base con respecto a los lenguajes de programación: lenguajes de alto nivel y lenguajes de bajo nivel o de máquina. Los primeros se emplean por los diseñadores humanos para concebir un código, llamado fuente, que representa la funcionalidad del sistema a diseñar, los segundos los usa el hardware en sí mismo para ejecutar el código de máquina y ejecutar las instrucciones que implementan el diseño especificado. La labor de traducir un código fuente a un código máquina se denomina compilación. En el presente proyecto se emplea un concepto distinto, pero relacionado con el mismo, la croscompilación,

la cual consiste en tomar un código fuente en un lenguaje de alto nivel y traducirlo a otro código fuente en otro lenguaje de alto nivel (Kleitzi, 2011). Para el caso presente, el código fuente es Python y el código destino es VHDL. Considérese como ejemplo un diseño simple, el de un comparador, que realiza la comparación entre dos valores y genera por salida el mayor de ellos. El código fuente de Python se muestra en la Figura 5. Se basa en una función que toma dos parámetros, a y b, y determina mediante una comparación directa si se debe devolver el valor del primero o del segundo parámetro. Para mostrar el uso de variables locales, una de ellas se emplea para almacenar el valor a devolver. Igualmente, por fuera de la función, es permitido generar código que invoque a la función, capture su respuesta y la exhiba en pantalla. Este código externo a las funciones se usará más adelante por parte de la herramienta para procesos de validación y verificación funcional y comportamental.

```
1 # sample file for pyhdl: if simple
2
3 def comp(a, b):
4     temp = b
5     if a > b:
6         temp = a
7     return temp
8
9 x = comp(5, 4)
10 print x
11
```

Figura 5. Código fuente del comparador.

Tras la compilación cruzada, la herramienta, que en adelante se identificará como Py2HDL, genera el archivo comp.vhd, el cual contiene el código VHDL para la función Python comp. Este archivo se compone de varios bloques de descripción, así que se analizará parte por parte. En primer lugar se tiene la entidad, la cual describe la interfaz del sistema digital con su entorno, indicando, además de su nombre, sus señales de entrada y de salida (ver Figura 6). Obsérvese la presencia del genérico N el cual define la cantidad de bits que tendrán las distintas señales. Este valor es generado automáticamente por el croscompilador teniendo en la cuenta la capacidad en periféricos de la tarjeta de desarrollo destino. Cada tarjeta posee cierto número de interruptores, los cuales se suelen emplear para ingresar datos hacia la FPGA. Py2HDL reconoce esta información y la usa para calcular cuántos bits puede asignar a cada señal, de tal manera que cada señal quede representada y que se maximice la cantidad de bits a usar. Igualmente, se tiene la presencia de otras señales distintas a las señales originales de datos a y b. Estas señales (start, clock, reset, ready, result), conocidas como señales de control, son necesarias para el correcto funcionamiento del

hardware y para sincronizar sus procesos en los tiempos adecuados. Como se indicó anteriormente, los lenguajes de alto nivel usados por los fabricantes exigen al diseñador manejar directamente estas señales. Py2HDL intencionalmente oculta estos detalles específicos de hardware al estudiante en sus primeros encuentros con las FPGA. Posteriormente estarán disponibles para que él los asuma, en la medida en que sea procedente, siguiendo los estilos de aprendizaje de Kolb (Kolb y Kolb, 2017).

La funcionalidad VHDL asociada a la función Python comp se describe en la arquitectura, cuyo encabezado, indicando los estados que tendrá el sistema secuencial, se muestra en la Figura 7. El nombre de los estados se genera basándose en el tipo de sentencias y en los números de línea presentes en el archivo fuente para facilitar la asignación entre ellos con fines de depuración o mejora. Por ejemplo, la asignación "temp = b", que ocurre en la línea 4 del código Python, se relaciona con el estado "assign4", la condición "if a > b", que ocurre en la línea 5, se realiza en el estado "if5", y así sucesivamente. Las variables locales se asignan a señales con el número adecuado de bits según la definición de los parámetros.

```
1 library ieee;
2 use ieee.std_logic_1164.all;
3 use ieee.numeric_std.all;
4
5 entity comp is
6     generic(N : integer := 4);
7     port(start : in std_logic;
8         clock : in std_logic;
9         reset : in std_logic;
10        a : in signed(N-1 downto 0);
11        b : in signed(N-1 downto 0);
12        result : out signed(N-1 downto 0);
13        ready : out std_logic);
14 end comp;
15
```

Figura 6. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (entidad).

```
16 architecture arch of comp is
17     type state is (idle, assign4, if5, assign6, return7, finish);
18     signal currentState, nextState : state;
19     signal temp : signed(N-1 downto 0);
20
```

Figura 7. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (señales).

La implementación de la funcionalidad se realiza mediante un procesador hecho a la medida o custom, el cual está diseñado como una ruta de datos o datapath junto con una máquina de estados de tipo Moore que hará las veces de controlador. La ruta de datos se encarga de rastrear las asignaciones en el momento oportuno, teniendo en la cuenta los cambios en las variables del archivo fuente (véase la

Figura 8). La máquina de estados es síncrona. Utiliza un reloj maestro y un reinicio síncrono para gestionar los cambios de estado. Py2HDL inserta automáticamente un estado inactivo inicial, llamado idle, en el que la máquina permanece hasta que sea activada por la señal de inicio (véase la Figura 9).

```
21 begin
22   -- datapath
23   process(clock, currentState)
24   begin
25     if (clock'event and clock = '1') then
26       if (currentState = assign4) then
27         temp <= b;
28       end if;
29       if (currentState = assign6) then
30         temp <= a;
31       end if;
32       if (currentState = return7) then
33         result <= temp;
34       end if;
35     end if;
36   end process;
37
```

Figura 8. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (ruta de datos).

```
38   -- state register
39   process(clock, reset)
40   begin
41     if (reset = '1') then
42       currentState <= idle;
43     elsif (clock'event and clock = '1') then
44       currentState <= nextState;
45     end if;
46   end process;
47
```

Figura 9. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (registro de estado).

La evolución de la máquina de estados depende del cálculo del siguiente estado (véase la Figura 10). Para ello se tienen en la cuenta en la lista de sensibilidad todas las señales capaces de generar eventos. Se puede insertar un estado de finalización adicional si el diseñador desea que la máquina permanezca en este estado, para efectos de probar el comportamiento del hardware. El enfoque estándar es dejar que la máquina vuelva al estado inactivo para que esté disponible inmediatamente para un nuevo cálculo.

Cuando el valor a devolver es estable, el módulo informa a su entorno dicho evento para que otros módulos actúen de conformidad. Esto se hace activando una señal de bandera, "ready", creada automáticamente por Py2HDL (ver Figura 11).

```
48   -- next-state logic
49   process(currentState, start, temp)
50   begin
51     case currentState is
52       when idle =>
53         if (start = '1') then
54           nextState <= assign4;
55         else
56           nextState <= idle;
57         end if;
58       when assign4 =>
59         nextState <= if5;
60       when assign6 =>
61         nextState <= return7;
62       when return7 =>
63         nextState <= finish;
64       when if5 =>
65         if (a > b) then
66           nextState <= assign6;
67         else
68           nextState <= return7;
69         end if;
70       when finish =>
71         nextState <= finish;
72     end case;
73   end process;
74
```

Figura 10. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (lógica del estado siguiente).

```
75   -- output logic
76   ready <= '1' when (currentState = finish) else '0';
77 end arch;
78
```

Figura 11. Código VHDL de destino generado por Py2HDL para el comparador (lógica de salida).

Simulación comportamental

Previo a implementar el diseño en hardware, conviene realizar una simulación del mismo. A diferencia de una solución software, en donde una simulación funcional es suficiente, una solución hardware requiere una simulación comportamental, en la cual se evalúe que el diseño no sólo realice la función asignada, sino también que la haga en los tiempos tanto absolutos como relativos necesarios. Un simulador muy apreciado para VHDL es ModelSim, el cual, aunque pasa por algunos cambios al haber sido adquirido por una nueva empresa, continúa siendo un referente en el mundo VHDL. El simulador requiere disponer de dos archivos: El primer archivo es el archivo de descripción y el segundo es un banco de pruebas o testbench que instruye al simulador con respecto a los valores que debe asignar a cada señal de entrada y a los tiempos en que debe hacerlo. Para una comprensión más detallada del proceso de simulación ver (Parra-Plaza, 2021).

Py2HDL genera un archivo TB que contiene el banco de pruebas para un diseño dado. El contenido de este archivo se genera a partir de las instrucciones Python que detecte por fuera de funciones, en particular llamados a las funciones e instrucciones print. El archivo compTB.vhd incluye las pruebas de alto nivel realizadas en la función comp. Crea señales para todos los puertos en comp.vhd, junto con

constantes y señales que simulan valores y variables para las pruebas de alto nivel. Por ejemplo, probar $x = \text{comp}(5, 4)$ requiere la creación de la señal x y de las constantes 5 y 4. Py2HDL ordena las constantes incrementalmente para facilitar su inspección. También añade valores para el periodo de la señal de reloj y asigna todas las señales a una instancia de la función (ver Figura 12).

```
1 library ieee;
2 use ieee.std_logic_1164.all;
3 use ieee.numeric_std.all;
4
5 entity compTB is
6 end compTB;
7
8 architecture tb_arch of compTB is
9     constant T : time := 20 ns; -- clk period = 50 MHz
10    constant N : integer := 4;
11    signal TB_start : std_logic;
12    signal TB_clock : std_logic;
13    signal TB_reset : std_logic;
14    signal TB_a : signed(N-1 downto 0);
15    signal TB_b : signed(N-1 downto 0);
16    signal TB_result : signed(N-1 downto 0);
17    signal TB_ready : std_logic;
18    constant S4 : signed(N-1 downto 0) := to_signed(4, N);
19    constant S5 : signed(N-1 downto 0) := to_signed(5, N);
20    signal x : signed(N-1 downto 0);
21
22 begin
23     -- instantiate the circuit under test
24     uut: entity work.comp (arch)
25         generic map (N=>N)
26         port map (start=>TB_start, clock=>TB_clock, reset=>TB_reset, a=>TB_a, b=>TB_b, result=>TB_result, ready=>TB_ready);
27
```

Figura 12. Código VHDL de banco de pruebas generado por Py2HDL para el comparador (señales y componente).

Py2HDL genera una señal de reloj similar a la del hardware real y activa la señal de reset durante el primer periodo de reloj para un inicio predictivo limpio (ver Figura 13). Las pruebas siguen una secuencia de asignaciones que se asimilar a las pruebas de alto nivel: se dan valores a los argumentos, se genera la señal de inicio y se permite que se establezca, se pasa el control al módulo y se programa el evento de retorno detectando el valor de la señal listo, el resultado se asigna a la señal de prueba y se deja estable durante varios ciclos de reloj para que esté disponible a otros módulos (ver Figura 14).

```
28 -- clock generation
29 process
30 begin
31     TB_clock <= '1';
32     wait for T/2;
33     TB_clock <= '0';
34     wait for T/2;
35 end process;
36
37 -- reset
38 TB_reset <= '1', '0' after T;
39
```

Figura 13. Código VHDL de banco de pruebas generado por Py2HDL para el comparador (reloj y reset).



Figura 14. Resultado de la simulación para el comparador.

Síntesis hardware

Disponer sólo del archivo vhd que describa la funcionalidad del diseño no es suficiente para su implementación final. Para ello, la herramienta de desarrollo debe realizar un proceso denominado síntesis, el cual consiste en asignar recursos o bloques lógicos de la FPGA a cada constructo que logre identificar en la descripción dada en VHDL (Rushton, 2011). Para poder hacer eso es indispensable que la herramienta conozca cuál es la tarjeta de desarrollo sobre la cual se hará la implementación, de tal manera que pueda asociar los diferentes periféricos de entrada y de salida con las señales internas correspondientes. Para una comprensión más detallada del proceso de síntesis ver (Parra-Plaza, 2022).

Py2HDL presta su ayuda en la síntesis durante dos momentos clave. Primero, selecciona sólo las construcciones VHDL que tengan sentido en hardware. VHDL tiene múltiples propósitos, algunos de los cuales tienen más relación con procesos de simulación y de documentación que con implementación en hardware. Py2HDL elige un subconjunto de VHDL, denominado VHDL sintetizable, para que la herramienta de síntesis realice apropiadamente su trabajo. Segundo, crea un archivo de tipo XHC. Este archivo instruye a la herramienta de síntesis para que realice un mapeado entre los recursos externos a la FPGA y las señales internas de la misma.

Para el presente proyecto, la tarjeta de desarrollo empleada es una Nexys4, ampliamente utilizada en la academia por sus buenas prestaciones y bajo costo. El archivo comp.xhc es la asignación física para el caso del comparador. Py2HDL determina qué señales deben proporcionarse para uso externo y calcula la cantidad de bits disponibles para cada una en función del hardware de destino. Py2HDL asigna la señal de reloj al oscilador de cristal presente en la placa y le indica que genere una señal simétrica. También asigna las señales de reinicio (reset) e inicio (start) a los pulsadores, la señal de listo (ready) al LED más alto y la señal de resultado (result) al LED más bajo requerido (ver Figura 15).

```
1 # Mapping CLOCK to OSC
2 set_property LOC E3 [get_ports clock]
3 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports clock]
4 create_clock -add -name sys_clk_gen -period 10.00 -waveform {0 5} [get_ports clock]
5
6 # Mapping RESET to BTM0
7 set_property LOC V10 [get_ports reset]
8 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports reset]
9 # Mapping START to BTM0
10 set_property LOC F15 [get_ports start]
11 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports start]
12 # Mapping ready to LED<15>
13 set_property LOC P2 [get_ports ready]
14 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports ready]
15
16 # Mapping result[0] to LED<0>
17 set_property LOC T8 [get_ports {result[0]}]
18 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {result[0]}]
19 # Mapping result[1] to LED<1>
20 set_property LOC V9 [get_ports {result[1]}]
21 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {result[1]}]
22 # Mapping result[2] to LED<2>
23 set_property LOC R8 [get_ports {result[2]}]
24 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {result[2]}]
25 # Mapping result[3] to LED<3>
26 set_property LOC T6 [get_ports {result[3]}]
27 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {result[3]}]
28
```

Figura 15. Código XHC de asignación física generado por PyHDL para el comparador (señales del sistema).

Con respecto a las señales de parámetros, Py2HDL calcula la cantidad de bits que cada una puede contener en función de las variables Python de alto nivel y de la cantidad de recursos disponibles en el hardware. Para ello inicia con las señales de salida, las cuales son mapeadas hacia el conjunto de LEDs, teniendo en la cuenta además que, según el tipo de operaciones que detecte en el código fuente, asignará un ancho de bits igual o duplicado al de las

señales de entrada. Posteriormente realiza una labor similar con las señales de entrada. Esto puede conllevar a que se recalcule la cantidad de bits en las salidas si detecta que la asignación inicial impide una asignación completa de las entradas. La versión actual de Py2HDL privilegia los escenarios de aprendizaje más que su uso por diseñadores más experimentados, por lo cual el LED más significativo se ha empleado para señalar la finalización en la ejecución del código. Esto con miras a detectar posibles bucles infinitos. Para el caso de la placa Nexys4, la asignación detallada de recursos hardware se muestra en la Figura 16.

```
29 # Mapping a to SW<0>
30 set_property LOC U9 [get_ports {a[0]}]
31 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {a[0]}]
32 # Mapping a to SW<1>
33 set_property LOC U8 [get_ports {a[1]}]
34 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {a[1]}]
35 # Mapping a to SW<2>
36 set_property LOC R7 [get_ports {a[2]}]
37 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {a[2]}]
38 # Mapping a to SW<3>
39 set_property LOC R6 [get_ports {a[3]}]
40 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {a[3]}]
41 # Mapping b to SW<4>
42 set_property LOC R5 [get_ports {b[0]}]
43 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {b[0]}]
44 # Mapping b to SW<5>
45 set_property LOC V7 [get_ports {b[1]}]
46 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {b[1]}]
47 # Mapping b to SW<6>
48 set_property LOC V6 [get_ports {b[2]}]
49 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {b[2]}]
50 # Mapping b to SW<7>
51 set_property LOC V5 [get_ports {b[3]}]
52 set_property IOSTANDARD LVCMOS33 [get_ports {b[3]}]
53
```

Figura 16. Código XHC de asignación física generado por PyHDL para el comparador (señales del diseñador).

Una vez la herramienta sintetiza el diseño, crea un archivo en código objeto de configuración que puede ser descargado a la placa de hardware. Al momento en que esta descarga finaliza, la configuración ya permanece en la tarjeta hardware indefinidamente hasta que sea remplazada por alguna nueva configuración. En estas condiciones, la tarjeta ya actúa como un sistema independiente, y la ejecución del diseño ya es posible. La Figura 17 muestra el resultado tras pulsar la señal de inicio cuando los argumentos proporcionados son los valores 5 y 2 (binarios 0101 y 0010).

Como segunda prueba, se cambiaron los valores a 5 y 7 (binarios 0101 y 0111). El patrón de los LEDs muestra el cambio en el resultado. El LED más alto indica que el resultado es estable y que está disponible para su uso seguro (véase la Figura 18). Para mayor comodidad al momento de evaluar un diseño determinado, Py2HDL le permite al diseñador generar una secuencia de pruebas en lote. Si en el código fuente se detecta la presencia de varias

instrucciones print, Py2HDL generará automáticamente un bloque contador que actuará como un pequeño temporizador de tal manera que, una vez el resultado de la primera prueba esté disponible, se le dé tiempo al diseñador de inspeccionarlo visualmente y corroborar si es correcto o no y determinar si procede continuar las pruebas o regresar al proceso de diseño. En la versión actual de Py2HDL este valor de temporizado se fijó en 2 segundos, lo cual es suficiente para comprobar la mayoría de resultados en un primer vistazo.

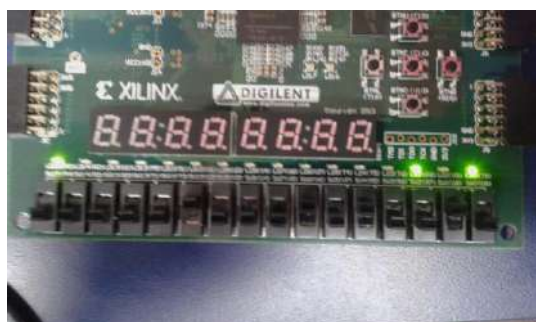


Figura 17. Ejecución de hardware para la prueba del comparador (argumentos: a=5, b=2).



Figura 18. Ejecución de hardware para la prueba del comparador (argumentos: a=5, b=7).

Varias otras pruebas fueron realizadas con diseños de mediana y alta complejidad. Éstos incluyen comparadores de tres y más valores, divisor, calculador de raíz cuadrada, detector de clave de acceso y una versión del juego de picas y famas (Parra-Plaza, 2013). Las limitaciones están dadas por la propia naturaleza del dispositivo. Por ejemplo, las operaciones matemáticas actúan sobre operadores enteros y la cantidad de entradas y de salidas depende de las que puedan alojarse en el conjunto de pulsadores, interruptores y LEDs de que disponga la tarjeta. Más que verlos como limitantes, es un reconocimiento del tipo de aplicaciones para las cuales una FPGA es conveniente. Para soluciones que requieran cálculos en punto flotante, un microprocesador sería una mejor elección; y para

soluciones que involucren también señales analógicas, un buen candidato podría ser un dispositivo del tipo PSoc (Van Ess, 2014).

La Figura 19 ilustra el resultado al ejecutar el código que extrae la raíz cuadrada de una variable num, para el caso en que num tiene un valor de 82 (binario 1010010), el cual se puede observar en la disposición de los interruptores. Al finalizar la ejecución, indicada por la activación del LED más significativo, el resultado se observa en los cuatro LEDs menos significativos, que contienen el valor binario 1001, correspondiente al valor decimal 9, el cual es la raíz entera más cercana a la raíz cuadrada de 82.



Figura 19. Ejecución de hardware para la prueba de raíz cuadrada (argumento: num=82).

3. Resultados y Discusión

Es posible para determinar el impacto que el empleo intencional de la herramienta de croscompilación podría tener en la mejor asimilación del contenido conceptual y en el desarrollo de habilidades de diseño en hardware reconfigurable y así ulteriormente en el aprendizaje, se realizaron diferentes pruebas a grupos de alumnos. En todos los casos, cada alumno interactuó con Py2HDL en diversas circunstancias, obedeciendo a los estilos de aprendizaje de Kolb (2017). En particular, el modelo de Kolb describe cuatro estilos de aprendizaje, denominados Divergente, Asimilador, Convergente y Acomodador, los cuales a su vez derivan de un Ciclo de Aprendizaje Experiencial, cuyas etapas son la Experiencia Concreta, la Observación Reflexiva, la Conceptualización Abstracta y la Experimentación Activa. Para el caso del presente proyecto, se hizo énfasis en el uso de la herramienta para las dos primeras etapas.

En esencia, Kolb adhiere al concepto constructivista (Doyle y Zakrajsek, 2013) en cuanto a que el aprendizaje deviene en una construcción, en esencia en la formación de redes neuronales específicas en el cerebro del aprendiz, para soportar la

comprensión y elaboración del concepto o habilidad que se está aprendiendo. Como tal, el constructivismo privilegia una primera aproximación práctica al objeto de estudio, antes que un discurso conceptual, en contravía con muchas tendencias largamente usadas en el sector educativo. Fieles a ese concepto, en esta investigación se ofrece al estudiante una aproximación al diseño en hardware reconfigurable partiendo de una aplicación que le permite experimentar de primera mano el diseño hardware en VHDL (objetivo), partiendo de un conocimiento ya adquirido como es el lenguaje Python (punto de partida). De esta manera, se busca despertar las asociaciones pertinentes que favorezcan una inserción más natural a los conceptos más abstractos del hardware, siguiendo los postulados de una de las vertientes más conocidas del constructivismo, el aprendizaje significativo (Ausubel et al, 1978).

Las actividades se desarrollaron simultáneamente por los alumnos, para lo cual se establecieron tres grupos, cada uno de 25 alumnos: A) grupo control: alumnos que no usaron Py2HDL, B) alumnos que usaron Py2HDL en su versión estándar, C) alumnos que usaron Py2HDL en su versión minimalista. Ésta es una versión que deliberadamente oculta al alumno elementos de la plataforma que no sean pertinentes para su momento. En primera instancia, la interfaz que se ofrece es absolutamente elemental, al estilo del conocido buscador Google, una pantalla en donde solo hay una casilla para escribir código Python y un botón de ejecución, distinto a la versión estándar de la herramienta que es más afín a un IDE (entorno de desarrollo) convencional.

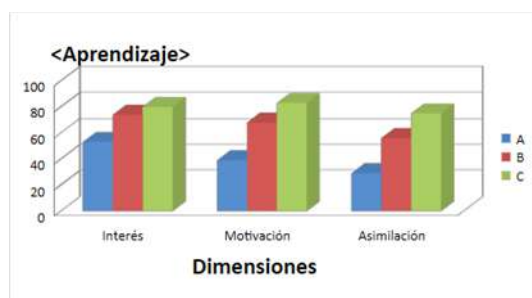


Figura 20. Métricas de aprendizaje para los primeros grupos considerados.

La Figura 20 muestra los resultados de las medidas de aprendizaje realizadas, los valores son el promedio por cada grupo y están dados en porcentajes, donde el 100% es el valor perfecto de la categoría. Se tomaron tres aspectos: interés, motivación y asimilación (Parra-Plaza, 2017). El interés se midió como el tiempo promedio que permanecía el alumno en una sesión de trabajo, la motivación es el número de ejercicios que realizó de

los disponibles en la sesión y la asimilación se determinó como la cantidad de respuestas correctas que obtuvo el alumno en una prueba de suficiencia realizada un mes después de haber estudiado el tema.

Se observa que el empleo de la herramienta como vehículo de interacción para desarrollar habilidades de diseño genera mejorías con respecto al enfoque convencional de dar la teoría y luego ir a sesiones de laboratorio, contrastando los valores para los grupos A y B. A su vez, se observa cómo el empleo de la interfaz minimalista evidenció mejorías posteriores, tal como indica los mayores valores del grupo C con respecto al grupo B. La diferencia más notable se da en la asimilación, en donde la menor distracción y stress que produce esta interfaz hace que la retención y aplicación ulterior de conocimientos más que se duplique con respecto a la forma convencional de instrucción, incluso siendo ésta mediada tecnológicamente.

Con miras a establecer en qué medida el uso de las etapas en el modelo de Kolb puede beneficiar aun más el proceso, se incluyó un cuarto grupo (D). En este grupo se realizó la etapa de Observación Reflexiva. Para ello, Py2HDL fue dotado de un módulo adicional que se beneficia de una aplicación de inteligencia artificial para establecer un diálogo con el aprendiz en cuanto a la experiencia vivida en las sesiones con el entorno de diseño. De nuevo, este diálogo se buscó que fuera también enfocado a un minimalismo, para lo cual la aplicación IA se alimentó con material adecuado para un diálogo simple pero reflexivo al respecto (Parra-Plaza, 2019).

Con esta novedad se obtuvo la distribución que se indica en la Figura 21. Se observa que los resultados para el grupo D superan a todos los otros grupos. Este resultado sugiere que la mediación tecnológica aunada a paradigmas o modelos de aprendizaje coherentes con esta mediación son una alianza que beneficia tanto los procesos mismos de enseñanza como el desempeño a lograr por los alumnos.

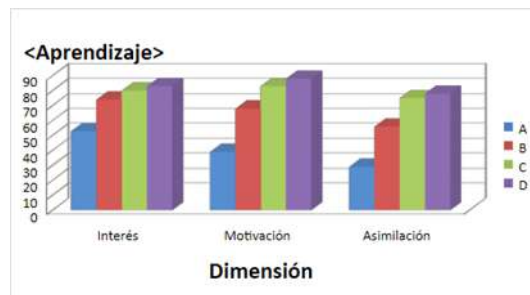


Figura 21. Métricas de aprendizaje para todos los grupos considerados.

4. Conclusiones

Es posible mejorar el desarrollo de habilidades cognitivas realizando una exposición incremental en la complejidad de la información y de los procesos a comprender por parte de los estudiantes. De esta manera, se da tiempo al cerebro de que construya las redes neuronales correspondientes de acuerdo con qué tan significativo sea uno u otro aspecto del contenido presentado y de las actividades realizadas.

La construcción de conocimiento que logre perdurar en el tiempo puede facilitarse al mediar los procesos educativos con soluciones tecnológicas creativas que se basen en paradigmas pedagógicos que tengan en cuenta las actividades experienciales. En la medida en que las actividades didácticas estén guiadas por un fundamento neurobiológico tanto del aprendizaje como de la enseñanza, es posible, de manera intencionada, influir positivamente en el proceso de desarrollo de habilidades perdurables por parte de los estudiantes.

El empleo de Py2HDL como herramienta de intervención en el proceso educativo manifestó ofrecer resultados de mejora en las distintas dimensiones del aprendizaje que se consideraron, como son interés, motivación y asimilación, medidas tanto inmediatamente como posteriormente en el tiempo, indicando una demostración en la práctica de los principios del constructivismo en general y del aprendizaje significativo en particular.

La inserción del modelo de aprendizaje de Kolb, en combinación con herramientas tecnológicas que faciliten su realización, se mostró como una posibilidad que incrementa la construcción de conocimiento, el desarrollo de habilidades y la retención ulterior de información y conceptos clave en una determinada disciplina.

La comprensión de la concurrencia al emplear VHDL para el desarrollo de sistemas digitales se propicia mediante herramientas tecnológicas que permitan al alumno observar un paralelismo en la ejecución entre dos sistemas: el que está aprendiendo y otro que le sea más familiar. La complejidad asociada con el paralelismo intenso que subyace a todos los procesos que ocurren en un sistema digital, aunada a la complejidad comportamental cuando presenta retroalimentación, es más abordable si se dispone de un referente que esté más cercano a la cotidianidad y a la representación de esquemas y propuestas, como es el caso de Python.

Disponer de herramientas de croscompilación permite establecer diferentes escenarios de aprendizaje en donde el protagonismo del aprendiz vaya gradualmente haciéndose más importante al pasar de conceptos básicos a intermedios y complejos. El uso intencional de herramientas de tecnología educativa permite modular la intensidad y la transición entre estas etapas.

5. Referencias

- Amaranth Project (2023). Disponible en: amaranth-lang.org/docs/amaranth/latest/guide.html
- Ausubel, D. Novak, J. y Hanesian, H. (1978). *Educational Psychology: A Cognitive View*. Holt, Rinehart & Winston.
- Based Learning Systems.
- Black, D. C., Donovan, J., Bunton, B. y Keist, A. (2009). *SystemC: From the ground up*. Springer.
- Blokdyk, G. (2018). *Hardware-Reconfigurable Devices*. 5STARCook.
- Doyle, T. y Zakrajsek, T. (2013). *The New Science of Learning: How to Learn in Harmony With Your Brain*. Stylus Publishing.
- Jasinski, R. (2016). *Effective Coding with VHDL: Principles and Best Practice*. MIT Press.
- Kleitz, W. (2011). *Digital Electronics: A Practical Approach with VHDL*. Pearson.
- Kolb, A. Y. y Kolb, D. A. (2017). *The Experiential Educator: Principles and Practices of Experiential Learning*. Experience
- Nicolescu, G. y Mosterman, P. J. (2018). *Model-Based Design for Embedded Systems*. CRC Press.
- O'Regan, G. A. (2021). *Brief History of Computing*. Springer.
- Parra-Plaza, J. A. (2012). *Concurrent programming: towards an optimal computation*. EIIISI.
- Parra-Plaza, J. A. (2013). *VHDL implementation of the Cows and Bulls game*. Technical report. Cali (Colombia). Pontificia Universidad Javeriana.
- Parra-Plaza, J. A. (2015). *High-level Synthesis Through a Cross-compiler from Pure Python to Hardware Description Languages*. WCAS.
- Parra-Plaza, J. A. (2016). *Custom processors design using Python-based high level synthesis*. Instituto Antioqueño de Investigación.
- Parra-Plaza, J. A. (2018). *Computación adaptativa para mediar tecnológicamente en la enseñanza para el aprendizaje*. Instituto Antioqueño de Investigación.
- Parra-Plaza, J. A. (2019). *Citoaprendizagem: Computação bioinspirada adaptativa focada na aprendizagem significativa*. CISCI.

- Parra-Plaza, J. A. (2020). Introducción a VHDL. Disponible en: www.youtube.com/watch?v=ZCX20VK5GmE
- Parra-Plaza, J. A. (2021). Simulación VHDL con ModelSim. Disponible en: www.youtube.com/watch?v=KTISNd4NCWo
- Parra-Plaza, J. A. (2022). Síntesis VHDL con Vivado. Disponible en: www.youtube.com/watch?v=Q2MCcWfLNhM
- Parra-Plaza, J. A. (2023). PyHDL: Cross-compiler from pure Python to Hardware Description Languages. Technical Report. Institución Universitaria Antonio José Camacho.
- Parra-Plaza, J.A. (2017). Propiciando el aprendizaje significativo en entornos interactivos mediante la inserción de moduladores neurogenéticos. *Compdes*.
- Pedroni, V. A. (2020). *Circuit Design with VHDL*. MIT Press.
- Rushton, A. (2011). *VHDL for Logic Synthesis*. Wiley.
- Van Ess, D. (2014). *Learn Digital Design with PSoC, a bit at a time*. Pearson.
- Zalar, P., Gostinčar, C., de Hoog, G. S., Uršič, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61, 21–38. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.02>



Modelado matemático de la producción de biomasa de levadura enológica nativa

Cristina Davies^{*1}, Carina Soldá¹, Gisela Goñi¹, Mónica Villalba¹, Liliana Gerard¹,
María Dalzotto^{1,2}, María Corrado¹

1. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos (MIBIAL), Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos; Mons. Tavella 1450, Concordia, Entre Ríos, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

*E-mail: cristina.davies@uner.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Propagación celular
Saccharomyces cerevisiae
nativa
Modelización.

RESUMEN

Ante el resurgimiento de la vitivinicultura entrerriana, este equipo de investigación aisló, seleccionó e identificó levaduras nativas para su uso como cultivos iniciadores. Con el objeto de determinar las condiciones nutricionales adecuadas para su propagación, se evaluaron diferentes formulaciones de sustratos con melaza de caña diluida como medio base, comparando dos fuentes de nitrógeno: extracto de levadura y sulfato de amonio suplementado con sales de Mg y K. Los ensayos se realizaron por duplicado, con *Saccharomyces cerevisiae* cepa OQ520880.1 (incorporada al Genbank), en biorreactor de 2 L. El crecimiento microbiano se monitoreó mediante recuento celular y los parámetros de crecimiento se calcularon ajustando los datos experimentales al modelo cinético de Gompertz modificado, mediante el software *Statgraphics Centurion XV Corporate*. Los criterios estadísticos de bondad de ajuste indicaron que este modelo resultó adecuado para la descripción de los datos. El análisis de varianza ($p < 0,05$) mostró que la fase lag y la velocidad específica máxima de crecimiento no difieren entre sustratos, pero sí la biomasa final y el crecimiento neto. Por lo tanto, el sustrato con sulfato de amonio y sales de K y Mg se consideró el más apropiado para la propagación de *S. cerevisiae* OQ520880.1.

Mathematical modeling of biomass production for a native enological yeast

KEYWORDS

Cell mass propagation
Indigenous *Saccharomyces cerevisiae*
Modeling

ABSTRACT

Due to the resurgence of viticulture in Entre Ríos, this research team isolated, selected, and identified native yeasts to be used as starter cultures for the production of wines with regional identity. To determine suitable nutritional conditions for their propagation, the effect of different substrates was evaluated. Diluted sugarcane molasses were used as the base medium, and two nitrogen sources were compared: yeast extract and ammonium sulfate supplemented with Mg and K salts. Experiments were performed in duplicate with *Saccharomyces cerevisiae* OQ520880.1 (GenBank) in 2-L bioreactor. Microbial growth was monitored by cell counts and growth parameters were estimated by fitting the experimental data to the modified Gompertz kinetic model using *Statgraphics Centurion XV Corporate*. Goodness-of-fit statistics indicated that the model provided an adequate description of the data. Analysis of variance ($p < 0.05$) showed that the lag phase duration and the maximum specific growth rate did not differ between substrates, whereas final biomass and net growth were significantly different. Therefore, the medium containing ammonium sulfate and salts was considered the most suitable for propagation of *S. cerevisiae* OQ520880.1.

1. Introducción

Entre 1907 y 1910, Entre Ríos se constituyó en la cuarta provincia vitivinícola del país, con importantes reconocimientos por la calidad de sus vinos. Sin embargo, a mediados de la década del '30, se sancionó la Ley Reguladora de Vinos N° 12137, por la cual se debieron erradicar los viñedos y bodegas. Recién en 1993, por ley 24037, se derogó la prohibición del cultivo de uva para vinificación y se liberó la plantación de vides y producción enológica en toda Argentina, lo que provocó, a partir de 1994, el resurgimiento del cultivo de vid y Entre Ríos se ha vuelto a posicionar como una provincia vitivinícola. Datos recientes del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV, 2024) indican que la elaboración de vinos tintos se incrementó un 740 % desde 2015 hasta los actuales 548 hL. Si bien un 39 % del volumen de uva cosechada en Entre Ríos se envía a otras provincias para su vinificación (INV, 2024), los productores locales están en constante búsqueda de oportunidades de mejora de los procesos de elaboración y de desarrollo de estrategias de diferenciación de la producción, atendiendo a las exigencias de un mercado nacional e internacional cada vez más competitivo y a la demanda de consumidores con nuevos estilos.

Durante mucho tiempo, el enfoque prioritario de los enólogos fue garantizar fermentaciones completas mediante el uso de cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que condujo a una producción estandarizada. No obstante, esta práctica derivó en vinos más uniformes y con menor diversidad sensorial, ocultando el aporte diferencial de las levaduras locales (Carrau et al, 2020). Tradicionalmente se ha aceptado que las características sensoriales del vino, como aroma y sabor, están vinculadas principalmente a la variedad de uva utilizada; sin embargo, el concepto de terroir ha emergido como un factor determinante en la calidad organoléptica del producto final. En 2010, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) introdujo el concepto de "terroir" vitivinícola como "una zona en la que se desarrolla el conocimiento colectivo sobre las interacciones entre el entorno físico y biológico identificable y las prácticas vitivinícolas aplicadas, otorgando características distintivas a los productos procedentes de dicha área. El terroir incluye el suelo específico, la topografía, el clima, las características del paisaje y los rasgos de biodiversidad" (OIV, Res. OIV/VITI 333/2010). El terroir microbiano, por su parte, describe la comunidad propia de microorganismos del suelo y de la vid dentro de un ecosistema dado,

cuyo impacto en las características del vino fue escasamente valorado hasta hace pocos años, aunque en la actualidad se reconoce su contribución en la generación de atributos diferenciales (Bekris et al., 2025). En particular, la uva constituye la principal fuente de microbiota en el proceso de vinificación, ejerciendo una influencia decisiva sobre la calidad y el perfil de los vinos resultantes (Liu et al. 2020; Zao et al. 2020; Wei et al. 2022; Papadopoulou et al. 2023; Ge et al. 2024).

En Entre Ríos no se registran estudios científicos que reporten la utilización de microorganismos autóctonos, previamente identificados y caracterizados, en procesos de vinificación. Por ello, y ante la necesidad planteada por productores locales, en este grupo de investigación se aislaron, seleccionaron e identificaron levaduras nativas a partir de uvas de la zona (Gerard et al., 2023). Entre ellas, *S. cerevisiae* Q520880.1 (incorporada a Genbank), mostró propiedades enológicas favorables, convirtiéndose en la primera levadura destinada a la elaboración de vinos tintos entrerrianos a partir de levaduras nativas.

Por otra parte, el modelado matemático constituye una herramienta para el diseño, optimización y control de bioprocesos (Moimenta et al., 2025). Los modelos primarios describen la dinámica de crecimiento y, al integrarse con datos experimentales, permiten estimar parámetros cinéticos clave como la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}), duración de la fase de latencia (λ) y concentración máxima de biomasa (N), datos esenciales para la predicción y control de la fermentación (Ginovart et al., 2024). Existen varios modelos primarios adaptados a diferentes microorganismos y condiciones de cultivo como los de Gompertz, Buchanan, Baranyi y Roberts, Gibson y McKellar, entre otros (Ginovart et al., 2024). Entre los de forma sigmoidal se destacan las versiones del modelo de Gompertz, como las reparametrizaciones propuestas por Zwietering (Zwietering et al., 1990) y Lay (Lay et al., 1997), que lo consolidaron como referencia práctica para ajustar curvas de crecimiento y producción metabólica (Wang y Guo, 2024). La utilidad del modelo de Gompertz ha sido validada en numerosos bioprocesos y, específicamente en contextos enológicos en los que se han comparado las respuestas de diversas especies de *Saccharomyces* para valorar la idoneidad de los modelos cinéticos (Tronchoni et al. 2009; Karaoglan et al., 2021).

Mediante el empleo del modelo matemático de Gompertz y con el objeto de producir biomasa de

levadura para los procesos de vinificación, en este trabajo se evaluó el efecto de la composición de diferentes sustratos compuestos por melaza de caña de azúcar y diferentes fuentes de nitrógeno, con el fin de determinar las condiciones nutricionales que permitan obtener la mayor concentración celular de *S. cerevisiae nativa*, a la mayor velocidad.

2. Materiales y métodos

Sustratos para la propagación de levadura

Las melazas de caña de azúcar y de remolacha azucarera son residuos agrícolas e industriales ampliamente utilizados para la producción de biomasa de levadura (Lino et al, 2018). En este caso se empleó melaza de caña de azúcar cuya caracterización indicó un contenido de sólidos solubles de 79,2±0,5 °Bx (refractometría) y 41,0±0,5 % p/v de azúcares reductores totales (método de Fehling-Causse-Bonnans). Para evitar el estrés osmótico de las levaduras, a partir de un balance de materia para azúcares totales, se calculó el volumen necesario de agua destilada necesario para diluir la melaza hasta una concentración final de 12-13 % p/v de azúcares totales.

Por otro lado, puesto que las melazas de caña azucarera son deficientes en nitrógeno, magnesio, fósforo y vitaminas (Gómez Pastor et al., 2011), se evaluaron dos posibles fuentes de estos elementos para ser adicionados al sustrato. Una de las fuentes consideradas fue el extracto de levadura (EL) en concentración de 0,5 g/L, por su abundante contenido en aminoácidos, vitaminas, nucleósidos, polipéptidos y minerales (Tao et al., 2023). La otra incluyó una solución de sales de N, P, K, S y Mg (SAS) según se especifica a continuación: 10 g/L de sulfato diamónico (SO₄(NH₄)₂ anhidro), 1 g/L de sulfato de magnesio (SO₄Mg.7 H₂O) y 5 g/L de fosfato monopotásico (PO₄H₂K anhidro) (Vieira et al., 2013).

Luego de la dilución de la melaza se agregó EL o SAS, según la combinación de sustrato ensayada, en las cantidades necesarias de acuerdo a las concentraciones mencionadas previamente. El contenido de azúcares reductores totales en los mostos así obtenidos fue 13±0,5 % p/v, equivalentes a 25,4±0,9 °Bx. A continuación, se ajustó el pH a 5, óptimo para el crecimiento de esta levadura. Por último, cada combinación de sustratos se esterilizó por calor húmedo a 121 °C durante 15 min.

Preparación del inóculo

Se partió de un cultivo de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en caldo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa) conservado a -18 °C con 20 % de glicerol. Una vez descongelado, 200 µL de esta suspensión fueron inoculados para su revitalización en un tubo con 2 mL del mismo caldo, a 30±1 °C durante 24-48 horas, hasta que se registraron recuentos celulares entre 6–9 x10⁷ cél/mL. En estas condiciones se realizó la primera transferencia de las dos etapas de propagaciones sucesivas, en las que cada una representaba el 10 % del volumen de la siguiente y en las que el sustrato utilizado fue la melaza de caña de azúcar diluida acondicionada tal como se especificó en el apartado anterior. De esta manera, el inóculo de 2 mL se transfirió a 18 mL de sustrato y luego de alcanzar la concentración celular mencionada (aproximadamente 24 horas), estos 20 mL se inocularon en 180 mL del mismo medio. De esta manera, se obtuvieron 200 mL de cultivo activo para ser inoculados en cada una de las diferentes combinaciones de sustratos (melaza con EL o melaza con SAS) contenidos en el biorreactor.

Proceso de obtención de biomasa

La propagación de *S. cerevisiae* OQ520880.1 se realizó en cultivo sumergido, en un biorreactor marca New Brunswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, provisto de un vaso de vidrio borosilicato de 2 L de volumen de trabajo. La esterilidad del aire que ingresa al biorreactor, se asegura mediante un filtro hidrofóbico con diámetro de poro de 0,45 µm. Los ensayos se realizaron por duplicado, manteniendo las siguientes condiciones: temperatura: 30 °C, velocidad de agitación: 200 rpm, caudal de aire: 0,9 vvm. La concentración del inóculo inicial fue de 4 - 7x10⁶ cél/mL y el crecimiento microbiano se siguió mediante recuento celular en cámara de Neubauer mejorada (improved). Para este fin se tomaron muestras de 5 mL, por duplicado, a intervalos regulares, durante aproximadamente 36 h. La observación se realizó en microscopio óptico Leica DME con amplificación de 1000 X. Se contaron las células observadas en 20 recuadros de 0,00025 mm³ cada uno de la mencionada cámara, se calculó el promedio en ese volumen y por último se lo refirió a 1 mL de muestra. En los casos en que se registraron más de 6-8 levaduras en cada recuadro, la muestra fue diluida convenientemente. Como criterio de inclusión se contabilizaron aquellas células que tocaban las líneas centrales superior e izquierda de la cuadrícula mientras que se excluyeron las que tocaban las centrales inferior y derecha. Además, las

gemaciones cuyo tamaño era un 50 % mayor o igual al de la célula madre, se contó como una más. En todos los casos, estas lecturas fueron realizadas por el mismo analista, a fines de disminuir la dispersión de los resultados por variabilidad humana y garantizar la comparabilidad de los mismos.

Como controles adicionales del proceso se determinaron sólidos solubles y pH, mediante potenciometría.

Análisis de datos

Se verificó que los datos de recuento celular de cada formulación de sustrato se ajustaran al modelo de crecimiento celular de Gompertz mediante un modelo de regresión no lineal, según la ecuación parametrizada por Zwietering et al. (1990) (ec. 1):

$$y = A \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{\max} \times e}{A} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} = \ln \frac{N}{N_0}$$

$$y = \ln N = \ln N_0 + A \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{\max} \times e}{A} \times (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

Donde μ_{\max} : velocidad específica máxima de crecimiento microbiano (h^{-1}), λ : tiempo de fase lag (h), N: número de células/mL a un determinado tiempo t, N_0 : número de células/mL al inicio del

proceso ($t=0$), A: crecimiento celular neto ($\ln N - \ln N_0$).

La bondad de ajuste del modelo se evaluó mediante el coeficiente de correlación R^2 y el error estándar del estimado (RMSE).

A partir de la ecuación que entrega el modelo ajustado para cada variante de sustrato se determinaron los parámetros de crecimiento: λ : tiempo de fase lag (h), μ_{\max} : velocidad específica máxima de crecimiento microbiano (h^{-1}), concentración final de biomasa N (cél/mL) y crecimiento celular neto, es decir diferencia entre concentración final e inicial de levadura (cél/mL). Estos parámetros se compararon mediante análisis de varianza con un nivel de confianza de 95 %.

Todos los ensayos estadísticos mencionados se realizaron con *software Statgraphics Centurion XV Corporate*.

3. Resultados y Discusión

Crecimiento microbiano y modelado cinético

La evolución de cada ensayo se siguió mediante determinaciones de recuentos microbianos y sólidos solubles cuyos resultados se indican en las Tablas 1 y 2:

Tabla 1. Crecimiento microbiano de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en melaza de caña de azúcar + 0,5 g/L extracto de levadura (EL), con su réplica.

EL (1)			EL (2)		
t (h)	Recuento microbiano (cél/mL)	Sólidos Solubles (°Bx)	t (h)	Recuento microbiano (cél/mL)	Sólidos Solubles (°Bx)
0,00	6,00E+06	25,0±0,1	0,00	4,40E+06	25,7±0,1
2,00	6,80E+06	24,9±0,0	3,00	5,60E+06	25,6±0,0
4,00	1,80E+07	24,8±0,0	6,25	4,20E+07	24,9±0,1
7,00	4,04E+07	24,2±0,1	8,50	1,78E+08	24,7±0,1
9,50	1,74E+08	23,9±0,1	10,50	2,04E+08	23,9±0,1
22,00	3,90E+08	19,7±0,1	23,00	3,72E+08	20,1±0,1
31,00	3,92E+08	16,4±0,1	27,00	4,96E+08	19,0±0,1
33,00	4,28E+08	16,2±0,1	30,00	4,20E+08	18,0±0,0
--	--	--	32,50	4,24E+08	17,2±0,2

Tabla 2. Crecimiento microbiano de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en melaza de caña de azúcar + solución de 10 g/L de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ anhidro, 1 g/L de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 5 g/L de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ anhidro (SAS), con su réplica.

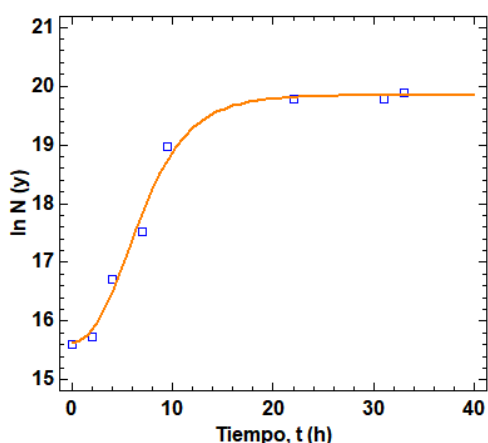
SAS (1)			SAS (2)		
t (h)	Recuento microbiano (cél/mL)	Sólidos Solubles ($^{\circ}\text{Bx}$)	t (h)	Recuento microbiano (cél/mL)	Sólidos Solubles ($^{\circ}\text{Bx}$)
0,00	5,20E+06	26,0 \pm 0,0	0,00	7,20E+06	24,7 \pm 0,0
1,50	4,40E+06	26,0 \pm 0,1	2,00	9,60E+06	24,6 \pm 0,0
4,00	1,04E+07	25,8 \pm 0,2	4,50	2,84E+07	24,1 \pm 0,1
6,00	1,76E+07	25,5 \pm 0,0	7,00	9,40E+07	23,8 \pm 0,1
8,00	4,48E+07	25,1 \pm 0,0	9,00	1,82E+08	23,3 \pm 0,1
10,00	9,80E+07	25,0 \pm 0,0	21,17	6,32E+08	18,1 \pm 0,1
11,00	1,72E+08	24,9 \pm 0,0	23,00	1,41E+09	16,2 \pm 0,1
23,75	5,48E+08	19,1 \pm 0,1	28,00	6,40E+08	13,9 \pm 0,0
26,75	5,52E+08	16,8 \pm 0,1	32,68	6,70E+08	13,6 \pm 0,0
30,50	8,40E+08	14,5 \pm 0,3	--	--	--

En cada condición experimental evaluada, los sólidos solubles muestran un descenso continuo, indicativo del consumo de los azúcares para las reacciones metabólicas de la levadura.

Con los datos de recuento microbiano obtenidos, y utilizando el *software* estadístico para el modelo de regresión no lineal, se construyeron las curvas de

crecimiento según el modelo matemático de Gompertz modificado (Figura 1). Los criterios estadísticos utilizados para analizar la bondad de ajuste del modelo para el sustrato EL fueron $R^2=99,03 \%$ y $\text{RMSE}=0,21$, y $99,50 \%$ y $0,15$ respectivamente para la réplica, lo que indica que el modelo resultó adecuado para la descripción de los datos.

Melaza + EL (1): gráfica del modelo ajustado



Melaza + EL (2): gráfica del modelo ajustado

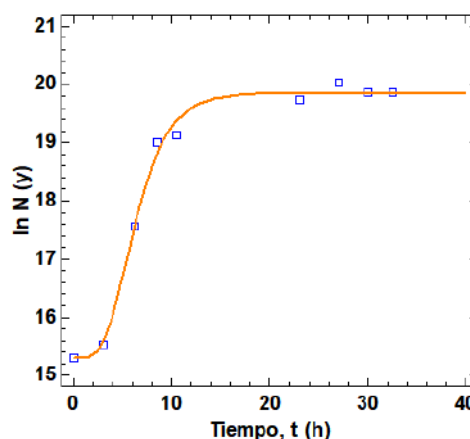


Figura 1. Modelo de crecimiento de *S. cerevisiae* OQ520880.1 ajustado según modelo de Gompertz modificado, en melaza de caña de azúcar + 0,5 g/L de extracto de levadura (EL), con su réplica. N: recuento celular, células/mL.

Análogamente, las gráficas de los modelos ajustados para el sustrato compuesto de melaza de caña + SAS se observan en la Figura 2. Los criterios estadísticos determinados fueron $R^2=99,39 \%$ y $\text{RMSE}=0,18$, y

$98,44 \%$ y $0,28$ respectivamente para la réplica. De la misma manera, el modelo de Gompertz modificado resultó adecuado para la descripción de los datos observados.

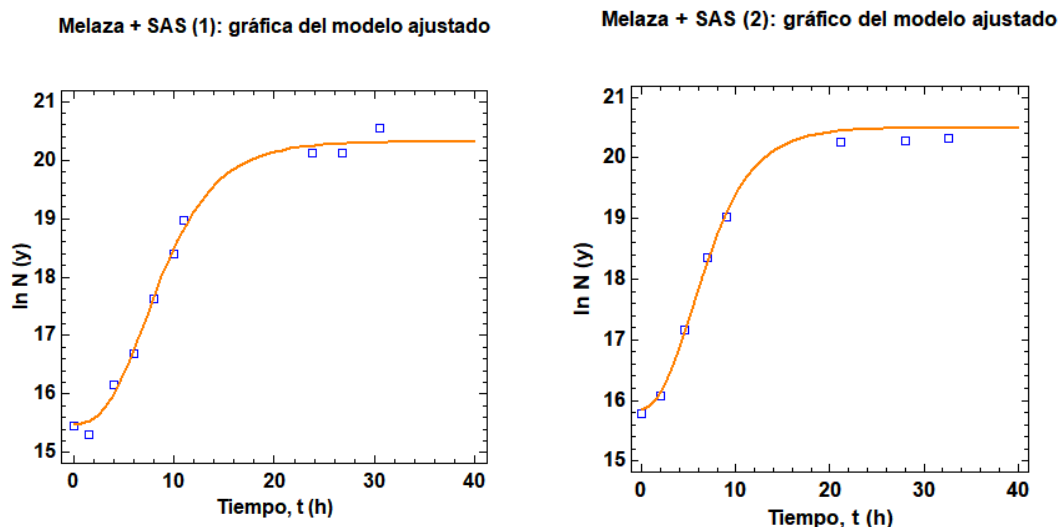


Figura 2. Modelo de crecimiento de *S. cerevisiae* OQ520880.1 ajustado según modelo de Gompertz modificado, en melaza de caña de azúcar + solución de 10 g/L de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ anhidro, 1 g/L de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 5 g/L de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ anhidro (SAS), con su réplica. N: recuento celular, cél/mL.

Parámetros cinéticos

Los resultados del ajuste del modelo de regresión no lineal de Gompertz para describir la relación entre $\ln N$ y el tiempo de cultivo, arrojaron las siguientes ecuaciones para cada modelo ajustado:

- Melaza + EL (1):

$$y = 15,6073 + (4,23366 * \exp(-\exp(0,468648 * 2,718281 * (2,20087 - t) / 4,23366 + 1))) \quad (2)$$

- Melaza + EL (2):

$$y = 15,2971 + (4,55127 * \exp(-\exp(0,726023 * 2,718281 * (3,08718 - t) / 4,55127 + 1))) \quad (3)$$

- Melaza + SAS (1):

$$y = 15,4642 + (4,84785 * \exp(-\exp(0,460047 * 2,718281 * (3,22977 - t) / 4,84785 + 1))) \quad (4)$$

- Melaza + SAS (2):

$$y = 15,7896 + (4,70738 * \exp(-\exp(0,497542 * 2,718281 * (1,86282 - t) / 4,70738 + 1))) \quad (5)$$

A partir de las ecuaciones (2), (3), (4) y (5) y teniendo en cuenta la ecuación modificada de Gompertz (1), se obtuvieron los parámetros cinéticos para cada combinación de sustrato según se indica en la Tabla 3:

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en diferentes composiciones de sustrato, según el modelo de Gompertz.

Sustrato	μ_{\max} (h^{-1})	λ (h)	N (cél/mL)	CN (cél/mL)
EL	$0,60 \pm 0,18^a$	$2,64 \pm 0,63^a$	$4,16\text{E}+08 \pm 2,12\text{E}+06^a$	$4,11\text{E}+08 \pm 3,54\text{E}+06^a$
SAS	$0,48 \pm 0,03^a$	$2,55 \pm 0,97^a$	$7,30\text{E}+08 \pm 9,48\text{E}+07^b$	$7,24\text{E}+08 \pm 9,33\text{E}+07^b$

La melaza de caña de azúcar + 0,5 g/L extracto de levadura, SAS: melaza de caña de azúcar + solución de 10 g/L de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ anhidro, 1 g/L de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 5 g/L de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ anhidro. λ : tiempo de fase lag (h), μ_{\max} : velocidad específica máxima de crecimiento microbiano (h^{-1}), N: concentración final de biomasa (cél/mL) y CN: crecimiento celular neto,

es decir diferencia entre concentración final e inicial de levadura (cél/mL). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de los sustratos de cada parámetro cinético.

Según se observa en la Tabla 3, el análisis de varianza de los parámetros obtenidos en los cuatro ensayos permitió determinar que no había diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) en la duración de la fase lag como tampoco en la μ_{\max} . Sin embargo, la concentración final de biomasa (N) y por ende el crecimiento neto (CN) resultaron aproximadamente un 76 % superiores en los sustratos compuestos con SAS (Figura 3).

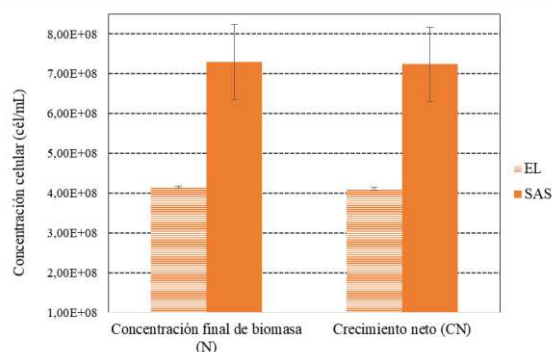


Figura 3. Concentración final de biomasa y crecimiento neto de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en diferentes sustratos: melaza de caña de azúcar + extracto de levadura (EL) y melaza de caña de azúcar + sales (SAS).

Estos resultados podrían indicar que, si bien el extracto de levadura constituye una fuente rica en nutrientes, su composición variable puede afectar la disponibilidad real de compuestos esenciales (Tao et al., 2023), reduciendo en consecuencia el rendimiento en biomasa. En contraste, un medio suplementado con sales definidas como el sulfato de amonio que aporta nitrógeno inorgánico fácilmente asimilable, el magnesio que es un cofactor esencial en numerosas enzimas que actúan en la síntesis de macromoléculas y el potasio y fosfato que mantienen el balance osmótico, el transporte iónico y la síntesis de ácidos nucleicos (Ribeiro-Filho et al., 2022), contribuye a optimizar la fisiología celular y a maximizar la producción de biomasa.

4. Conclusiones

Las curvas de crecimiento microbiano de los sustratos evaluados fueron ajustadas utilizando el modelo de Gompertz modificado, el cual describió con alta precisión el comportamiento de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en ambas condiciones. A partir de las ecuaciones ajustadas se obtuvieron los parámetros cinéticos microbiológicos, que permitieron identificar las variables con diferencias significativas y, en consecuencia, establecer las condiciones de sustrato que mejoran la producción de biomasa.

Aunque la velocidad de producción de biomasa y la duración de la fase lag no mostraron diferencias significativas entre los sustratos, la concentración final de biomasa y el crecimiento neto de la levadura fueron un 76 % superiores en el sustrato formulado con melaza y SAS, por lo que dicho sustrato se consideró el más apropiado al proporcionar la mayor producción de biomasa de *S. cerevisiae* OQ520880.1.

5. Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto PICTO-UADER-UNER 00008 "Desarrollo de vinos de la variedad Tannat (*Vitis vinifera* L.) de diferentes viñedos de la región del río Uruguay elaborados con microorganismos nativos", cofinanciado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) y Universidad Nacional de Entre Ríos.

Las integrantes del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos (MIBIAL) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación, UNER, agradecen a la Reserva y Viñedo Pampa Azul por el aporte de las uvas utilizadas para los ensayos.

6. Referencias

- Bekris, F., Papadopoulou, E., Vasileiadis, S., Karapetsas, N., Theocharis, S., Alexandridis, T. K., Koundouras, S. y Karpouzias, D. G. (2025). Vintage and terroir are the strongest determinants of grapevine carposphere microbiome in the viticultural zone of Drama, Greece. *FEMS Microbiology Ecology*, 101(2), fiae008.
- Carrau, F., Boido, E. y Ramey, D. (2020). Yeasts for low input winemaking: microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in applied microbiology*, 111, 89-121.
- Ge, X., Liu, Y., Wang, X., Gao, C., Mu, J., Wang, W. y Wang, J. (2024). Correlations between microbes with volatile compounds and physicochemical indicators of Cabernet Sauvignon wines fermented with different starters. *LWT*, 198, 115918.
- Gerard, L. M., Corrado, M. B., Davies, C. V., Soldá, C. A., Dalzotto, M. G. y Esteche, S. (2023). Isolation and identification of native yeasts from the spontaneous fermentation of grape musts. *Archives of Microbiology*, 205(9), 302.
- Ginovart, M., Carbó, R. y Portell, X. (2024). Adaptation of *Saccharomyces* to high

- glucose concentrations and its impact on growth kinetics of alcoholic fermentations. *Microorganisms*, 12(7), 1449.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E. y Matallana, E. (2011). Recent advances in yeast biomass production. *Biomass–Detection, Production and Usage*, 201-222.
- INV (2024): Informe anual de cosecha y elaboración 2024. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/inv/estadisticas-vitivincolas/cosecha/anuarios>
- Karaoglan, H. A., Ozcelik, F., Musatti, A. y Rollini, M. (2021). Mild pretreatments to increase fructose consumption in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Foods*, 10(5), 1129.
- Lay, J. J., Li, Y. Y. y Noike, T. (1997). Influences of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion. *Water Research*, 31(6), 1518-1524.
- Lino, F. S. D. O., Basso, T. O. y Sommer, M. O. A. (2018). A synthetic medium to simulate sugarcane molasses. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 221.
- Liu, D., Chen, Q., Zhang, P., Chen, D. y Howell, K. S. (2020). The fungal microbiome is an important component of vineyard ecosystems and correlates with regional distinctiveness of wine. *Mosphere*, 5(4), 10-1128.
- Moimenta, A. R., Minebois, R., Henriques, D., Querol, A. y Balsa-Canto, E. (2025). Temperature-Dependent Kinetic Modeling of Nitrogen-Limited Batch Fermentation by Yeast Species. *Mathematics*, 13(9), 1373.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. (2010). Resolución OIV/VITI 333/2010. OIV. <https://www.oiv.int>
- Papadopoulou, E., Bekris, F., Vasileiadis, S. Krokida, A., Rouvali, T., Veskoukis, A. S., Liadaki, K., Kouretas, D. y Karpouzas, D. G. (2023). Vineyard-mediated factors are still operative in spontaneous and commercial fermentations shaping the vinification microbial community and affecting the antioxidant and anticancer properties of wines. *Food Research International*, 173, 113359.
- Ribeiro-Filho, N., Linforth, R., Bora, N., Powell, C. D. y Fisk, I. D. (2022). The role of inorganic-phosphate, potassium and magnesium in yeast-flavour formation. *Food Research International*, 162, 112044.
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D. y Wang, T. (2023). Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(2), 151.
- Tronchoni, J., Gamero, A., Arroyo-López, F.N., Barrio, E. y Querol, A. (2009). Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 237-243.
- Vieira, É. D., Andrietta, M. D. G. S. y Andrietta, S. R. (2013). Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 551-558.
- Wang, J. y Guo, X. (2024). The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 72, 108335.
- Wei, R., Ding, Y., Chen, N. Wang, L., Gao, F., Zhang, L., Song, R., Liu, Y., Li, H. y Wang, H. (2022). Diversity and dynamics of microbial communities during spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different regions of China and their relationship with the volatile components in the wine. *Food Research International*, 156, 111372.
- Zhao, C., Su, W., Mu, Y. Jiang, L. y Mu, Y. (2020). Correlations between microbiota with physicochemical properties and volatile flavor components in black glutinous rice wine fermentation. *Food Research International*, 138, 109800.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., y Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881.



Remoción de arsénico en aguas subterráneas con Moringa oleífera una alternativa sustentable para el tratamiento de acuíferos en Entre Ríos

Silvana Spizzo^{1*}, Maria Valeria Ormaechea¹, Beatriz Rosalia Bot¹, Helena Francisconi¹,
Agustin Chiarello¹, Facundo Manuel Zaballo¹

1. Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNER

*E-mail: silvana.spizzo@uner.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Arsénico
Moringa oleífera
Remoción

RESUMEN

El arsénico de origen natural en aguas subterráneas de consumo es una problemática que afecta a la salud pública. Existen normativas que establecen límites regulatorios como el Código Alimentario Argentino (0,01 mg/L) y el Decreto 2235/02 (0,05 mg/L). Este estudio investigó la eficiencia de semilla de Moringa oleífera en la remoción de arsénico en dos pozos de agua de Colonia Ensayo (Acuífero Paraná). Se compararon dos tratamientos: Semilla de Moringa con cáscara (Tratamiento A) y sin cáscara (Tratamiento B). Los resultados mostraron una interacción significativa entre el tratamiento y el pozo ($p < 0.001$), lo cual sugiere que la eficiencia de Moringa se ve influenciada por las características del agua. Esto también se observa en la correlación negativa ($r = -0,87$) entre el porcentaje de remoción de arsénico y la concentración de bicarbonatos. Esto subraya la importancia de considerar las características del agua en el uso de harina de semillas de Moringa oleífera, la cual puede ser una buena opción sostenible y ecológica para disminuir el arsénico en aguas de consumo. Futuras investigaciones podrían enfocarse en optimizar los parámetros de aplicación de ésta en agua de diferentes características fisicoquímicas y una aplicación a mediana escala.

Arsenic removal from groundwater using Moringa oleifera a sustainable alternative for the treatment of aquifers in Entre Ríos

KEYWORDS

Arsenic
Moringa oleifera
Removal

ABSTRACT

Naturally occurring arsenic in groundwater intended for human consumption represents a significant public health concern. Regulatory frameworks, such as the Argentine Food Code (0.01 mg/L) and Decree 2235/02 (0.05 mg/L), have established permissible limits for arsenic concentrations in drinking water. This study investigated the effectiveness of Moringa oleifera seeds in removing arsenic from two groundwater wells located in Colonia Ensayo (Paraná Aquifer). Two treatment methods were compared: Moringa seeds with seed coat (Treatment A) and without seed coat (Treatment B). The results revealed a significant interaction between the treatment type and the water source ($p < 0.001$), indicating that the efficiency of Moringa is influenced by the specific characteristics of the water. This was further supported by a strong negative correlation ($r = -0.87$) between arsenic removal efficiency and bicarbonate concentration. These findings highlight the importance of considering water chemistry when applying Moringa oleifera seed powder as a remediation method. Given its sustainable and eco-friendly nature, Moringa oleifera represents a promising alternative for reducing arsenic levels in drinking water. Future research should focus on optimizing application parameters for water sources with varying physicochemical characteristics and exploring the feasibility of medium-scale implementation.

1. Introducción

El 71 % de nuestro planeta está cubierto por agua, de éste porcentaje aproximadamente sólo el 1 % es agua dulce disponible para el consumo humano y actividades productivas, ya que el resto se encuentra atrapado en glaciares, casquetes polares o en acuíferos de difícil acceso (National Geographic, 2022). Por lo tanto, el agua accesible para la vida representa una fracción limitada y valiosa, cuya disponibilidad y calidad se ven continuamente amenazadas por la contaminación derivada de actividades humanas.

El Acuífero Guaraní (AG) es la reserva de agua dulce subterránea más grande de Sudamérica y se ubica bajo parte de los territorios de Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay (Custodio y Llamas, 2017). Se observa en la Figura 1.



Figura 1. Acuífero Guaraní. Fuente: CGE, 2021.

Este acuífero está compuesto por agua que se encuentra en poros y fisuras de areniscas cubiertas por potentes capas de basalto que las confinan. Constituye la principal fuente de suministro de agua potable para abastecimiento urbano, industrial y agrícola en el Brasil, Uruguay, Paraguay y Argentina.

En Argentina, el AG se explota principalmente en la mesopotamia para usos termales debido a su profundidad y a la presencia de capas basálticas. Por esta razón, el abastecimiento de agua potable proviene en general de acuíferos más superficiales (Aceñolaza, 2004; Bruzzone, 2006; Favetto et al., 2008).

Entre Ríos realiza la extracción a partir de cuatro acuíferos principales ubicados en la parte superior de la columna estratigráfica, correspondientes a sedimentos del Cuaternario y Terciario: Paraná, Ituzaingó, Salto, Chico y El Palmar (Santi et al., 2013). El agua subterránea es utilizada tanto para el abastecimiento de los hogares como para riego, bebida animal y uso industrial. Uno de los aspectos que hacen particularmente útil al agua subterránea para el consumo humano es la menor contaminación por microorganismos a la que está sometida y la capacidad de filtración del suelo, que la hace generalmente más pura que las aguas superficiales. No obstante, en ocasiones los parámetros fisicoquímicos exceden los límites del Código Alimentario Argentino (CAA) y en estos casos la contaminación es más difícil de eliminar (Carol et al., 2022). En este sentido, la presencia de arsénico (As) en agua de consumo es un problema de salud pública (Quiroga et al., 2024). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer categorizó a este metaloide en el grupo I, como una sustancia con comprobada acción carcinogénica para el ser humano, sobre la base de evidencia epidemiológica (IARC, 2012).

En aguas subterráneas la presencia se debe en un 90 % del arsénico a procesos naturales y solo un 10 % proviene de actividad humana (Bhat et al., 2024). Las fuentes naturales de As están asociadas a procesos geológicos, tales como la meteorización a partir de rocas parentales o las emisiones volcánicas (Bundschuh et al., 2008).

En la actualidad, se calcula que 14 millones de habitantes en los países latinos y 4 millones en Argentina, están expuestos a niveles superiores a este límite (WHO, 2021). En nuestro país el contenido de As en aguas de consumo recién comenzó a ser abordado por los investigadores en los últimos años a pesar de haber convivido con la misma durante aproximadamente cien años (Minaberry y Cáceres, 2016). El área con mayores problemas de arsénico en sus acuíferos coincide con la llanura pampeana hasta el norte de Santa Fe y Santiago del Estero, área de mayor producción ganadera y mayor concentración de población (Villaamil, 2015). No obstante, la concentración del As en los acuíferos difiere de región en región e incluso existen grandes diferencias dentro de una misma zona, variando incluso dentro de los departamentos y/o localidades de la misma provincia(Ministerio de Salud de la Nación, 2017). Esto puede observarse en la Figura 2.

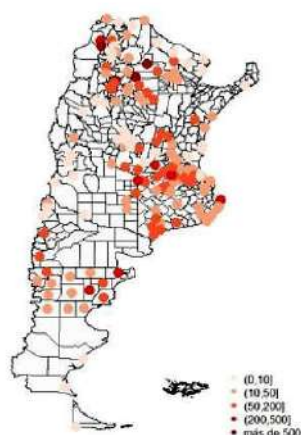


Figura 2 . Concentración de Arsénico ($\mu\text{g/L}$). Fuente: Ministerio de Salud de la Nación (2017).

En lo que respecta a la reglamentación vigente en Argentina, la estimación de la población expuesta puede variar ya que el Código Alimentario Argentino (CAA) propone un valor límite de 0,01 mg/L para agua potable de suministro público y/o de uso domiciliario; con la salvedad de que en regiones con suelos de alto contenido de As, la autoridad sanitaria competente podrá admitir valores mayores a 0,01 mg/L con un límite máximo de 0,05 mg/L cuando la composición normal del agua de la zona y la imposibilidad de aplicar tecnologías de corrección lo hicieran necesario (Corroto et al., 2021), este es el caso de Entre Ríos, donde la legislación provincial establece (Decreto 2235/02) dicho límite en 0,05 mg/L de As.

En este contexto, cobra relevancia la búsqueda de tecnologías sustentables para el tratamiento del agua. El tratamiento de potabilización de aguas con presencia de este metal pesado es una temática de alto interés particularmente porque los métodos para extraerlo son escasos y de un alto costo. Es por ello que es necesario encontrar alternativas sustentables y sostenibles, que permitan su remoción a un costo que pueda ser afrontado por la población en general.

Los procesos convencionales de eliminación de arsénico incluyen sedimentación asistida por químicos, coagulación y floculación, adsorción, intercambio iónico y procesos de membrana (Jebelli, et al., 2018; Rashid et al., 2020). Una alternativa a éste tipo de procesos es el uso de coagulantes naturales.

Diversos autores han utilizado diferentes partes de la planta de Moringa oleífera para evaluar la remoción de As en aguas de origen subterráneo, en algunos casos, llegando a una disminución del 90%.

Cota et al., 2024 reportaron un porcentaje de remoción del metaloide de entre el 50 y el 90% utilizando hojas de Moringa secas y molidas. Por su parte Vázquez (2016) menciona que el polvo de hoja de Moringa es un buen biosorbente de arsénico, ya que en sus ensayos logró una remoción de más del 90%.

Ghebremichael et al., (2005) mencionan que las semillas de ésta especie contienen proteínas catiónicas solubles en agua que actúan como agentes coagulantes naturales en el tratamiento de agua. Diferentes ensayos que han utilizado como adsorbente polvo de la semilla de Moringa oleífera han logrado la disminución del metaloide en agua en valores de entre 65%, y un 90% (Mendoza, 2018; Aguilar Diaz, 2019; Marhaini, et al., 2022). En la provincia de Entre Ríos, estudios preliminares de Vallecillo et al., 2024 revelaron un 55 y 75% de remoción en aguas subterráneas utilizando semillas molidas de Moringa oleífera.

En función de lo expuesto, el presente trabajo presenta como objetivo evaluar la eficacia de la semilla de Moringa oleífera, en la remoción de arsénico en aguas subterráneas de la provincia de Entre Ríos, específicamente en el acuífero Paraná. Se plantea como hipótesis que su uso podría reducir de manera significativa la concentración del metaloide en aguas subterráneas de la región. Mediante este trabajo se pretendió generar conocimiento aplicado que contribuya al desarrollo de tecnologías sustentables y accesibles para el tratamiento de agua potable en zonas con limitaciones técnicas y económicas, mejorando la calidad del recurso y reduciendo los riesgos para la salud humana y las actividades productivas locales.

2. Materiales y métodos

Agua utilizada

Para evaluar la efectividad de las semillas de Moringa oleífera en la extracción de arsénico, se trabajó con muestras de agua subterránea de dos pozos pertenecientes al Acuífero Paraná, específicamente en la localidad de Colonia Ensayo, departamento Diamante. Con el objeto de evaluar las diferentes características fisicoquímicas del agua se muestreó un pozo del Casco Urbano (Pozo 1) con una profundidad de 15 metros y un pozo La Jaula, del área rural (Pozo 2) con una profundidad de 56 metros.

En la figura 3 pueden verse los sitios de extracción de muestras y los acuíferos a los cuales pertenecen.

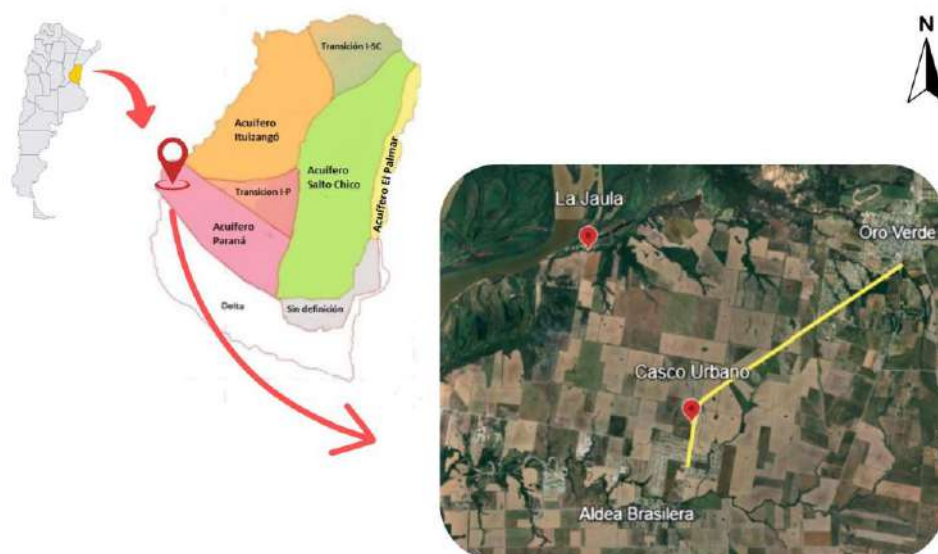


Figura 3. Figura 3. Distribución de los diferentes acuíferos menos profundos de agua dulce en la Provincia de Entre Ríos. Fuente: Lorenzo M. (2024), modificado. Los marcadores rojos representan los sitios de extracción de agua subterránea para el presente estudio.

Recolección de las muestras

Las muestras de agua se recolectaron en los dos pozos mediante bombas, en botellas de 1 litro de capacidad, se mantuvieron refrigeradas hasta llevarlas al laboratorio de aguas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNER) para posterior análisis fisicoquímicos y aplicación de tratamientos con semillas de *Moringa oleífera*.

Las muestras sin tratar y tratadas fueron enviadas al laboratorio de la Cámara Arbitral de Cereales de Entre Ríos para determinar al contenido de As por espectrometría de absorción atómica con equipo

Persee 990; en todos los casos se siguió el protocolo de normas APHA-AWWA-WPCF(1992).

Análisis realizados

Al agua sin tratar se le realizaron los análisis detallados en la Tabla 1, siguiendo técnicas normalizadas para conocer las características generales del agua y la concentración inicial de As.

A las muestras tratadas se les analizó el contenido de As, con el fin de evaluar la eficiencia de remoción del polvo de *Moringa oleífera*.

Tabla 1. Análisis de agua realizados a las muestras de agua de Colonia Ensayo y técnicas utilizadas, según Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2023).

Análisis	Técnica utilizada
pH (unidades de pH)	Potenciometría 4500 H-B
Arsénico (mg/L)	Espectrofotométrico de absorción atómica (3500 B)
Alcalinidad	Método titulación (2320 B)

La determinación de alcalinidad se realizó mediante el método de titulación (2320 B) según Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2023), modificando la expresión del resultado que se realizó como mg/L de bicarbonato en su reemplazo de carbonato de calcio.

Tratamientos de remoción de arsénico

Para realizar esta investigación se utilizó un diseño experimental factorial con dos factores (Tratamiento y Pozo). Para los ensayos se utilizaron semillas de *Moringa oleífera*, cosechada en el año 2019 para

todas las pruebas realizadas. Las mismas fueron sometidas a una limpieza manual y acondicionadas en un lugar seco y fresco con una temperatura entre 13 y 18 °C para su conservación.

Para su utilización se tomaron muestras, acorde a la cantidad necesaria, según los análisis a realizar semanalmente, éstas semillas se colocaron en estufa durante 48 h a 60 °C, posteriormente a una parte de las mismas se les retiró la cáscara y se las trituró en mortero de porcelana hasta obtener una harina ligeramente fina de color blanco amarillento, aspecto grasoso y de olor característico. Las restantes fueron trituradas en mortero sin extraerles la cáscara.

De esta manera, en la Figura 2 se observa el polvo de semillas utilizado en dos tratamientos diferentes: Tratamiento A: Semilla molida con cáscara y Tratamiento B: Semilla molida sin cáscara.



Figura 2. Semillas de Moringa oleífera molida. En la imagen se observa el polvo de los tratamientos A: Semilla molida con cáscara; B: Semilla molida sin cáscara.

En ambos tratamientos se realizaron cinco repeticiones. Estas tareas fueron realizadas en el laboratorio de Aguas de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNER. En todos los casos se agregó una dosis de Moringa al 1% con una agitación de 10 minutos, posteriormente se procedió al filtrado utilizando filtros Quanta de un tamaño de poro de 28 micrómetros. Se procedió a hacer una dilución al 5, ya que en el equipo se produce espuma por algún componente que presenta la Moringa.

Procesamiento de los datos

Una vez analizadas las muestras de agua y realizados los ensayos, los valores fueron sistematizados en tablas. El porcentaje de remoción de arsénico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de remoción de As} = \frac{A_{\text{TOTAL}}(S/\text{tratar}) - A_{\text{en muestra tratada}}}{A_{\text{TOTAL}}(S/\text{tratar})} \times 100 \quad (1)$$

Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad y homocedasticidad de los datos. Los resultados de porcentaje de remoción de As fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías para determinar los efectos de los tratamientos (Tratamiento A y B), de la calidad fisicoquímica del agua (Pozos 1 y 2) y su interacción sobre la variable respuesta, el "Porcentaje de Remoción de As". En todos los casos se utilizó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Para todo el tratamiento estadístico se utilizó el programa Infostat en su versión libre (Rienzo et al., 2016) para realizar los análisis de correlación entre variables.

3. Resultados y Discusión

Las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para los porcentajes de remoción en relación a los tratamientos y pozos presentaron una distribución normal ($p>0,05$). Sin embargo, F de igualdad de varianzas, reveló heterocedasticidad por lo que el supuesto de igualdad de varianzas no se cumple ($p<0,05$). No obstante, los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías ya que el mismo es bastante robusto a desviaciones moderadas de este supuesto. Dado que el diseño experimental planteado es balanceado (con igual número de repeticiones por grupo), podemos confiar razonablemente en las inferencias estadísticas derivadas.

Los resultados obtenidos del agua sin tratamiento se presentan en la tabla 2. El agua de ambos pozos se caracterizó por presentar un pH ligeramente alcalino. De acuerdo a los límites establecidos por el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, (2023), el pozo 1 presentó un nivel de bicarbonato que la clasifica como, fuertemente bicarbonatada (379 ppm), en tanto el pozo 2 se clasificó como agua moderadamente bicarbonatada (283 ppm).

En cuanto al contenido de As el agua de ambos pozos reveló la presencia de As por encima de los límites establecidos por el CAA pero por debajo de la reglamentación provincial (Decreto 2235/02) mostrando valores en el Pozo 1 de 0,0448 mg/L y el Pozo 2 una concentración de 0,0353 mg/L.

Tabla 2. Resultado de análisis de pH, bicarbonatos y concentración de arsénico del agua del Pozo 1 (Casco Urbano) y Pozo 2 (La Jaula) en muestras de agua sin tratar.

Muestra	pH	HCO ₃ ⁻ (mg/L)	As (mg/L)
POZO 1	7,3	379	0,0448
POZO 2	7,15	283	0,0353

Considerando que ambos se encuentran en el Acuífero Paraná, específicamente en la localidad de Colonia Ensayo, la presencia del metaloide es esperable debido a las características geológicas particulares de la unidad geomorfológica en la que se encuentran, denominada "Colinas Loésicas de Crespo" (Rodríguez, 2006).

En la tabla 3 se muestran los resultados de la concentración en ppm de As con los dos tratamientos en ambas muestras, con sus respectivos porcentajes de remoción. Los porcentajes de remoción hallados en ambos pozos superaron los reportados por Vallecillo et al., (2024) en el área de Colonia Ensayo. Estos autores lograron remover el 55 y 27 % del As utilizando polvo de

Moringa oleífera con y sin cáscara, respectivamente. En el mismo estudio, se menciona haber removido un 70 y 86 % del metaloide en agua subterránea extraída de la localidad de Feliciano.

En la figura 5 se muestra el gráfico de dispersión de los datos. El tratamiento A en todas sus repeticiones en el pozo 1 obtuvo el mismo % de remoción de arsénico (87,7 %), mientras que en el pozo 2 el mismo tratamiento presentó valores superiores (entre 89,2 y 92,1 %).

El tratamiento B en agua del pozo 1 presentó una menor remoción de As (entre 55,4 y el 70,8 %) en comparación al Pozo 2 (entre 94,1 y 96 %).

Tabla 3. Concentración (ppm) de As y % de remoción obtenido con ambos tratamientos para los dos pozos evaluados.

POZO 1			POZO 2		
	As (ppm)	% Remoción		As (ppm)	% Remoción
Valor inicial	0,0448	-	Valor inicial	0,0353	-
Tratamiento A	0,0055	87,7	Tratamiento A	0,0026	92,6
Tratamiento A	0,0055	87,7	Tratamiento A	0,003	91,5
Tratamiento A	0,0055	87,7	Tratamiento A	0,0028	92,1
Tratamiento A	0,0055	87,7	Tratamiento A	0,0038	89,2
Tratamiento A	0,0055	87,7	Tratamiento A	0,003	91,5
Tratamiento B	0,0174	61,2	Tratamiento B	0,0019	94,6
Tratamiento B	0,0131	70,8	Tratamiento B	0,0021	94,1
Tratamiento B	0,0131	70,8	Tratamiento B	0,0018	94,9
Tratamiento B	0,0135	69,9	Tratamiento B	0,0014	96,0
Tratamiento B	0,02	55,4	Tratamiento B	0,0018	94,9

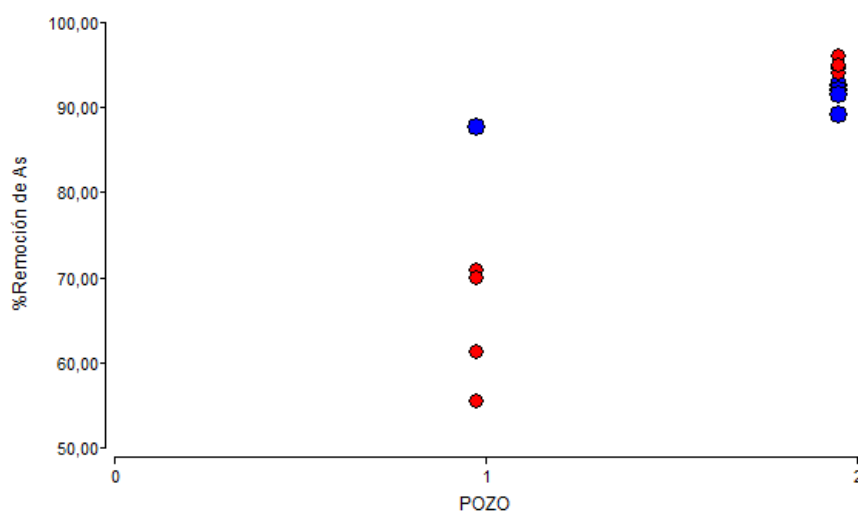


Figura 5. Distribución de los porcentajes de remoción de arsénico obtenida en agua del Pozo 1: Casco urbano y Pozo 2: área rural. Los círculos azules corresponden al tratamiento A: polvo de Moringa oleífera con cáscara y los círculos rojos al tratamiento B: polvo de Moringa oleífera sin cáscara.

Esto se refleja en el análisis estadístico de los porcentajes de remoción de As en los diferentes Pozos y para cada tratamiento (Tabla 4). Se observó que el Tratamiento A alcanzó un promedio de remoción de As superior (89,74 %) y menor variabilidad ($DE= 2,15$) comparado con el Tratamiento B (80,26 %; $DE=16,13$). Asimismo, el Pozo 2 mostró un porcentaje de remoción promedio más alto (93,14 %) y con menor dispersión ($DE= 2,10$) en sus datos que el Pozo 1.

La tabla 5 muestra el análisis ANOVA de dos vías donde se encontró un efecto estadísticamente significativo del "Tratamiento" sobre el porcentaje de remoción de As ($F=33,66$, $p<0,001$). Asimismo, el análisis mostró un efecto estadísticamente significativo entre los Pozos ($F = 106,14$, $p < 0,001$), lo cual indicaría que la calidad de agua influye notablemente en la remoción de As.

Tabla 4. Estadísticas descriptivas del porcentaje de remoción para cada nivel de tratamiento y pozo.

Factor	Nivel	Media (\bar{X})	Desviación Estándar (DE)
Tratamiento	Tratamiento A	89,74	2,15
	Tratamiento B	80,26	16,13
Pozo	Pozo 1	75,43	12,65
	Pozo 2	93,14	2,10

Tabla 5. Análisis ANOVA de dos vías realizado para el análisis del efecto del Tratamiento y el Pozo en el % de remoción de As.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de Libertad (gl)	Valor F	P-valor (p)
Tratamiento	430,59	1	33,66	<0,001
Pozo	1357,95	1	106,14	<0,001
Tratamiento x Pozo	819,20	1	64,03	<0,001
Residual	204,70	16		

Este efecto también puede observarse en la interacción estadísticamente significativa entre el "Tratamiento" y el "Pozo" ($F=64,03$, $p<0,001$). Esto indicaría que, si bien existe un efecto entre el tratamiento aplicado en el porcentaje de remoción de As, el mismo no es constante entre los pozos, lo que permite deducir que la eficiencia de remoción de As depende de las características específicas del agua de los pozos a tratar.

Para conocer con mayor profundidad las diferencias halladas se aplicaron las pruebas post-hoc de Tukey HSD con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ se encontró que pese a existir significancia estadística en el efecto principal del tratamiento empleado, no existe diferencia a nivel global entre los tratamientos A y B. En relación a la calidad de agua, representada por la variable "Pozo" se confirmó que existe diferencia significativa en los porcentajes de remoción de As en el Pozo 1 y el Pozo 2, siendo este último significativamente más eficiente. Asimismo, al correlacionar los porcentajes de remoción de As con el contenido de bicarbonatos utilizando el coeficiente de correlación de Spearman éste reveló una fuerte correlación negativa ($r= -0,87$) entre ambas variables. Estos resultados son consistentes con lo planteado por Smedley & Kinniburgh, (2002); John, et al., (2018) y Chou et al., (2025) quienes mencionan que en aguas, levemente alcalinas o alcalinas y con mayor contenido de bicarbonatos disminuye la eficiencia de remoción del As en materiales adsorbentes, debido a la competencia de éstos aniones por los sitios de adsorción en los óxidos de aluminio y hierro. Esta competencia en los sitios de adsorción es particularmente relevante considerando que el arsénico en aguas subterráneas se encuentra principalmente como arseniato ácido o diácido (As V), cuando las condiciones son oxidantes. En condiciones reductoras predomina en forma de arsenito (As III) o en formas menos cargadas o incluso neutras. Tanto el As V como el As III pueden ser adsorbidos en los óxidos de hierro y aluminio presentes naturalmente en los suelos, sedimentos o en materiales adsorbentes de origen natural como lo es el polvo de semillas de *Moringa oleifera*.

4. Conclusiones

Este estudio demuestra que tanto el tipo de tratamiento como las características fisicoquímicas del agua de cada pozo influyen en el porcentaje de remoción de arsénico. Asimismo, los resultados muestran que el polvo de semilla de *Moringa* presenta buena eficiencia para adsorber el

metaloide en aguas subterráneas, sin embargo, deben considerarse las características de pH y bicarbonatos para decidir utilizar semillas con cáscara y sin cáscara. Esto implica que la elección del tratamiento óptimo para la remoción de arsénico no puede hacerse de forma generalizada, sino que debe considerarse en el contexto de las condiciones específicas de cada pozo. Este estudio no solo profundiza en la comprensión de los factores que influyen la eficiencia de la remoción de arsénico mediante el uso de *Moringa oleifera*, sino que también aporta conocimiento de gran impacto al desarrollo de tecnologías de tratamiento de agua sustentables y accesibles.

5. Referencias

- Aceñolaza, F. G. (2004). Paleobiogeografía de la región mesopotámica. Temas de la biodiversidad del litoral fluvial argentino (Miscelánea INSUGEO 12, pp. 25–30). Tucumán: INSUGEO.
- Aguilar Díaz, H. R. (2019). Utilización de la *Moringa oleifera* como coagulante para la remoción de arsénico en el agua de los pozos del centro poblado Cruz del
- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), & Water Environment Federation (WEF). (2023). Standard methods for the examination of water and wastewater (24th ed.).
- Bhat, A., Ravi, K., Tian, F., & Singh, B. (2024). Arsenic contamination needs serious attention: An opinion and global scenario. *Pollutants*, 4(2), 196–211.
- Bruzzone, E. M. (2006). El agua potable – Nuevo recurso estratégico del siglo XXI: El caso particular del acuífero Guaraní. Realidad Económica, (204). Instituto Argentino para el Desarrollo Económico.
- Bundschuh, J., Armienta, M. A., Birkle, P., et al. (2008). Natural arsenic in groundwaters of Latin America. CRC Press.
- Chou, P. I., Wu, X., Gao, Z., Zhu, Y., & Jun, Y.-S. (2025). Bicarbonate concentrations affect arsenic release from arsenopyrite and nanoscale iron(III) (hydr)oxide formation: importance of unconfined aquifer carbonate chemistry. *Environmental Science: Nano*, 12, 3047–3060.

- Clean Water Crisis Facts and Information. Recuperado el 23 de junio de 2025, de National Geographic.
- Consejo General de Educación-Dirección de Información, Evaluación y Planeamiento- Programa Ambiental 2021. Bienes Naturales de Entre Ríos.
- Corroto, C., Iriel, A., Fernández-Cirelli, A., & Pérez-Carrera, A. L. (2021, junio). Metodologías de remoción de arsénico y flúor y su aplicabilidad en el mejoramiento de la calidad del agua destinada a producción pecuaria [Revisión bibliográfica]. *InVet*, 23(1), artículo 9. Facultad de Ciencias Veterinarias
- Custodio, E., & Llamas, R. (2017). El Acuífero Guaraní: la mayor reserva de agua subterránea de Sudamérica. *Revista de Hidrogeología*, 25(2), 45–58.
- Decreto N.º 2235/02. (2002) Valores Guía para la Calidad del Agua Potable y de Efluentes Cloacales (Anexo I). Gobierno de la Provincia de Entre Ríos.
- Dirección de Hidráulica de Entre Ríos: https://www.hidraulica.gob.ar/acuifero_guarani.php
- Ghebremichael, K. A., Gunaratna, K. R., Henriksson, H., Brumer, H., & Dalhammar, G. (2005). A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. *Water Research*, 39(11), 2338–2344.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2012). Arsenic, metals, fibres, and dusts (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Hazards to Humans, Vol. 100C). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- John, Y. J., Emery, D. V., & Daniel, M. (2018). A comparative study on removal of hazardous anions from water by adsorption: a review. *International Journal of Chemical Engineering*, 2018, 1–21.
- Lorenzo, M. (2024, 30 de abril). Las aguas subterráneas, un tesoro escondido. WordPress.
- Quiroga, A. M., Colussi, C. L., Odetti, L. M., Loteste, A. E., Paonessa, A. M., Mastandrea, C. R., Grigolato, R. A., Poletta, G. L., Sigríst, M., & Simoniello, M. F. (2024). Evaluation of oxidative damage and genotoxicity in populations exposed to arsenic in drinking water from Santa Fe province, Argentina. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 897, 503787.
- Rashid, E. E. U., Saini-Eidukat, B., & Bezbaruah, A. N. (2020). Modeling arsenic removal using zero-valent iron nanoparticles. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1–7.
- Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., & Robledo, C. W. (2016). InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Rodríguez, J. J. (2006). Estudio sedimentológico y mineralógico del loess en perfiles de la Formación Tezanos Pinto (Pleistoceno tardío-Holoceno temprano), provincia de Entre Ríos [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional CONICET Digital.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517–568.
- Vallecillo, S. M., Ormaechea, M. V., Dragán, A. N., Spizzo, S. R., Trossero, J. A., Mugheri Bohl, F., Della Giustina, Z., & Perusset, A. (2024). Evaluación de la capacidad de mejora de parámetros de calidad de aguas superficiales, subterráneas y residuales mediante el uso de semillas de *Moringa oleifera*. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 14(16).
- Vázquez, P. R. (2016). Propiedades biosorbentes del polvo de hojas de *Moringa oleifera* para la remoción de arsénico en aguas residuales. *Revista Mexicana de Ingeniería Ambiental*, 12(1), 45–53.
- Villaamil Lepori, E. C. (2015). Hidroarsenicismo crónico regional endémico en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 83–104. Recuperado el 23 de junio de 2025, de SciELO.



Estudio de envase y vida útil en pasta fresca libre de gluten a base de harinas de amaranto y topinambur

Sonia Albano*¹, Nora Comelli²

1. FICA-UNSL– San Luis, Campus Universitario. Ruta 55 ext norte 5730. Villa Mercedes. San Luis, Argentina.
2. FICA-UNSL-CONICET, INTEQUI CCT - CONICET – San Luis, Campus Universitario. Ruta 55 ext norte 5730. Villa Mercedes. San Luis, Argentina.

*E-mail: albano@email.unsl.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Vida útil
Gluten
Nylon
Polipropileno

RESUMEN

Se estudió la vida útil de una pasta fresca sin gluten, rica en aminoácidos e inulina. Para ello se utilizaron dos tipos de envases: polipropileno de alta densidad y nylon de baja densidad. Las muestras, previamente envueltas en papel aluminio, se almacenaron refrigeradas hasta por 30 días, monitoreando semanalmente su humedad por gravimetría en estufa, actividad acuosa (aw) con un equipo Aqua Lab, textura (dureza, adhesividad, elasticidad y gomosidad) con un texturómetro. El análisis microbiológico se realizó por 21 días (hongos, levaduras, aerobios mesófilos, anaerobios sulfitos reductores y coliformes). Los resultados mostraron que la humedad se mantuvo estable en un 25% en ambos envases, y la actividad acuosa promedio fue de 0,9. No se detectaron anaerobios sulfitos reductores. Se observó un aumento en la dureza de la pasta, especialmente en el envase de polipropileno, lo que sugiere un resacamiento superficial. La elasticidad de la pasta disminuyó y la gomosidad aumentó en ambos envases con el tiempo. Se concluyó que el envase de polipropileno fue menos efectivo para retener la humedad. Debido al crecimiento de hongos y levaduras, se recomendó un período de almacenamiento corto, de 1 a 3 días, en refrigeración y utilizando el envase de nylon.

Study of packaging and shelf life of fresh gluten-free pasta based on amaranth and Jerusalem artichoke flours

KEYWORDS

Shelf life
Gluten
Nylon
Polypropylene

ABSTRACT

The shelf life of fresh gluten-free pasta rich in amino acids and inulin was studied. Two types of packaging were used: high-density polypropylene and low-density nylon. The samples, previously wrapped in aluminum foil, were stored refrigerated for up to 30 days. Their moisture content was monitored weekly by gravimetry in an oven, water activity (aw) was measured using an Aqua Lab device, and texture (hardness, stickiness, elasticity, and gumminess) was measured using a texturometer. Microbiological analysis was performed for 21 days (fungi, yeasts, mesophilic aerobes, sulfite-reducing anaerobes, and coliforms). The results showed that moisture content remained stable at 25% in both containers, and the average water activity was 0.9. No sulfite-reducing anaerobes were detected. An increase in the hardness of the pasta was observed, especially in the polypropylene container, suggesting surface drying. Elasticity of pasta decreased and gumminess increased in both containers over time. It was concluded that the polypropylene container was less effective at retaining moisture. Due to the growth of mold and yeast, a short storage period of 1 to 3 days was recommended, under refrigeration, using the nylon container.

1. Introducción

La caducidad natural de las pastas frescas presenta un reto, particularmente para una pasta libre de gluten, realizada con harinas no convencionales ricas en aminoácidos esenciales, inulina y compuestos fenólicos, con propiedades funcionales y antioxidantes. Es fundamental, por tanto, investigar envases que no solo impidan la alteración de su valor nutricional y resguarden su inocuidad, sino que también prolonguen sus características de calidad. Las causas de deterioro de los alimentos, se encuentran influenciadas por una serie de factores ambientales como lo son la temperatura, la humedad, las reacciones con el oxígeno, la luz y el tiempo. Se contempla la influencia de estos factores en la metodología de envasado y selección de los tipos de envases para este alimento. La harina de topinambur posee compuestos fenólicos, por lo que la pasta deberá resguardarse de la luz UV. Díaz, Andrea (2021). A demás la harina de amaranto posee un alto contenido de folatos (entre 52 y 70 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de materia seca). Los tetrahidrofolatos también son sensibles a la oxidación, a la luz ultravioleta y al aumento de la temperatura, (Schoenlechner, R. et al. 2010; Sepúlveda, C. et al. 2019). Esta harina también posee ácidos grasos insaturados entre 6-10% y si bien una parte podría convertirse a isómeros trans debido al proceso térmico de popeado de la semilla de amaranto, la cantidad disponible en la pasta también puede ser oxidada por la radiación UV, (Ariza Ortega, J. A. et al. 2011).

Respecto de las alteraciones que podrían provenir de un deterioro microbiano, se puede reducir la carga inicial de coliformes pasteurizando las pastas frescas antes de envasarlas para prolongar los tiempos de conservación, Chigal, P. S. (2021). Otra opción es el secado de la pasta con ventilación forzada para distribuir uniformemente el aire caliente en toda la pasta y a temperaturas entre 40 a 65°C durante 15-30 minutos y disminuir así la cantidad de los microorganismos iniciales, Rojas, J. (2018).

El objetivo, por lo tanto, es prevenir el deterioro de la pasta asegurando su salubridad y conservando sus cualidades óptimas por el mayor lapso posible mediante el estudio de envase y vida útil.

2. Materiales y métodos

Elaboración de la pasta

Se elaboran pastas frescas tipo espagueti, a partir de harinas no convencionales de topinambur (HT), de amaranto (HA) y fécula de mandioca (FM). Como

medio líquido se utilizó huevo fresco, agua potable y chicle de mandioca (CH) para simular el gluten que no poseen esas harinas. No se utilizaron aditivos, ni conservantes.

La mezcla se amasa por aproximadamente 30 minutos, fue laminada y se cortada en espaguetis con 4mm de ancho y un espesor de 2 mm (Hernández, A. 2015; Chigal, P. S. 2021; Yalcin, S. et al. 2007; Larrosa, V. 2014). Luego se dejó secar a temperatura ambiente (25°C) durante 4 horas a una humedad ambiente relativa del 40 %.

Se ensayaron 13 formulas, a partir de premezclas libres de gluten de harinas estudiadas (HA y HT) y fécula de mandioca (FM) como principales ingredientes en diferentes proporciones entre sí, y se mantienen fijos los demás ingredientes húmedos, Chicle de mandioca (CH) y huevo. Se utiliza agua potable de red, un agua de dureza baja a media es considerada como la más adecuada para la elaboración de las pastas, (Fu B.X. 2008). La cantidad de agua utilizada varía según la premezcla y se ajusta a hasta lograr una masa homogénea y de buena consistencia. Se realiza un diseño experimental fundamentado en la combinación de cantidades variables de las tres harinas empleadas. Se eligió el diseño de experimentos de mezcla utilizando el paquete programa estadístico comercial Statgraphics Centurión XVI.II.

Los rangos establecidos para los componentes de las mezclas (según rango alto o bajo) se fijaron en % (sumando los tres componentes el 100% de la premezcla de harinas) como se indica:

HA: Harina de amaranto (30-40), HT: Harina de topinambur (10-20) y FM: Fécula de mandioca (49-50).

Las cantidades a utilizar de huevo y de chicle de mandioca se mantienen sin variaciones, 50% y 10% respectivamente, los cuales son adicionales al 100% de la mezcla de harinas. El tipo de diseño que se utilizó fue el de vértices extremos, aumentando el diseño, obteniendo 13 combinaciones entre los factores (tabla 1). Con la aplicación de este criterio quedaron seleccionadas tres formulaciones de premezclas F2, F 4 y F11, siendo F2 y F4 extremos en los porcentajes de los componentes, mientras que F11 posee un valor intermedio respecto de las anteriores (figuras 1 y 2). A estas tres fórmulas elegidas se ensayan los parámetros de calidad de la pasta para la selección de la pasta final. Estos fueron: tiempo óptimo de cocción (TOC), determinación de los parámetros de color con colorimetría, textura con un texturómetro y se someten a un análisis sensorial.

Tabla 1. Formulaciones obtenidas en el diseño experimental, donde las composiciones son expresadas en % en peso.

Formulación	Componentes		
	HA	HT	FM
1	40,000	11,000	49,00
2	40,000	10,000	50,00
3	31,000	20,000	49,00
4	30,000	20,000	50,00
5	37,625	13,125	49,25
6	37,625	12,625	49,75
7	33,125	17,625	49,25
8	32,625	17,625	49,75
9	40,000	10,500	49,5
10	35,500	15,500	49,00
11	35,000	15,000	50,00
12	30,500	20,000	49,50
13	35,250	15,250	49,50

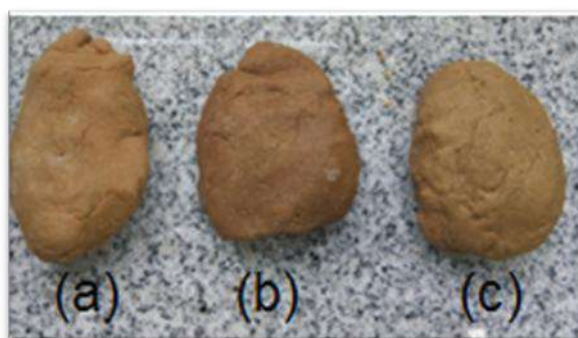


Figura 1. Masa para pasta de las fórmulas (a) F2, (b) F4 y (c) F11.



Figura 2. Tallarines frescos correspondientes a las fórmulas (a) F2, (b) F4 y (c) F11

La fórmula desarrollada y estudiada en los ensayos de envase y vida útil, corresponde a aquella que obtuvo mayor aceptabilidad general según el análisis sensorial realizado. Esta fórmula contiene 40 % HA, 10% de HT y 50 % FM (figura 3). Por consiguiente, se selecciona la fórmula F2 para los posteriores estudios de packaging y vida útil.



Figura 3. F2 Espagueti fresco

Envasado

Con el objetivo de determinar el tiempo de conservación en diferentes envases, se dispone de la pasta en diez muestras de 50 gr. Con el objetivo de resguardar la pasta de la radiación UV, fueron envueltas en papel aluminio como envase primario en contacto directo con la pasta, e inmediatamente luego se colocaron en envases plásticos secundarios. Se ensayaron dos tipos de empaques plásticos comerciales (figura 4). Estos empaques pasticos consisten en bolsas termo selladas de Nylon de baja densidad (70 μm) y en bolsas de polipropileno de alta densidad (18 μm), ambas se termosellaron inmediatamente, luego de introducir la muestra de pasta envuelta en aluminio (Pruna Tapia, D. B. 2020; Chigal, P. S. 2021). La pasta se refrigeró en heladera a temperatura de 8°C y humedad de 61 %.



Figura 4. Envases (a) nylon y (b) polipropileno.

Estudio de vida útil

Se estimó el tiempo de vida útil teniendo en cuenta las características de calidad e inocuidad del producto desarrollado que garanticen su aceptabilidad y perdurabilidad en el tiempo. Se siguió una frecuencia de muestreo que es la misma tanto a la pasta envasada en nylon como en polipropileno, para luego realizar los análisis fisicoquímicos, texturales y microbiológicos necesarios, que permitan identificar a lo largo del tiempo, en qué momento la pasta presenta un deterioro significativo, volviéndose inseguro o inaceptable para los consumidores. Los indicadores de deterioro de la vida útil de la pasta fueron: humedad, actividad acuosa, textura y análisis microbiológico, en el tiempo de corte de la vida útil.

Determinación de humedad

Los ensayos se realizaron de acuerdo al CAA (capítulo IX, artículo 720 - Res 305, 26.03.93) estableciendo

que el contenido de agua de las pastas frescas no deberá ser superior a 35% p/p. Los análisis se realizan por triplicado para cada envase con una frecuencia de muestreo de una vez por semana durante 30 días. Se lleva a cabo en estufa a 105°C por aprox. 12 hs. con una masa inicial de aproximadamente 2 gramos hasta lograr peso constante (figuras 5 y 6).

Determinación de actividad del agua

La actividad del agua se determinó mediante un equipo marca AquaLab modelo Pawkit. Los análisis se realizan por triplicado para cada envase con una frecuencia de muestreo de una vez por semana durante 30 días para una masa aproximada de 3 g., Cardona Serrate, F. (2019).



Figura 5. Horno para el secado de las muestras.



Figura 6. Muestras secadas en horno a peso constante.

Análisis microbiológico.

Según el CAA en el capítulo IX, artículo 720 - (Res 305, 26.03.93) se establece que las pastas frescas deberán mantenerse refrigeradas y expendirse dentro de las 48 horas y responder a las siguientes exigencias microbiológicas:

- *S. aureus coagulasa* positiva: menor de 103 UFC/g
- Salmonella: ausencia: en 25g.
- Hongos y levaduras: menor de 104 UFC/g

En este ensayo se analiza microbiológicamente a la pasta en la determinación de hongos y levaduras, como alteradores de la calidad y aerobios mesófilos, anaerobios sulfito reductores como patógenos, ya que una de las materias primas usadas es un tubérculo. Los sulfito-reductores son un grupo de especies del género *Clostridium*, (Cardona Serrate, F. 2019). Las muestras elaboradas y envasadas se mantuvieron refrigeradas a 8°C en heladera.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en ambos envases estudiados durante 21 días con una frecuencia de muestreo de una vez por semana. Para el análisis de aerobios mesófilos, se siguió el método horizontal para el recuento de microorganismos: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad. Procedimiento según International Standard Organization ISO 4833-1:2013

Los análisis para hongos y levaduras siguen el procedimiento según International Standard Organization ISO 6611:2004. La técnica para la determinación de bacterias coliformes, se inocula por duplicado 0,1 g de pasta en tubos conteniendo caldo McConkey. Se evalúa como positivo cuando se observó turbidez y formación de gas (los resultados para ambas muestras del día 21 se evalúan como negativos porque se observó turbidez, pero no presencia de gas).

Para la realización de los análisis de anaerobios sulfito reductores, se sigue el Método Horizontal para el Recuento de bacterias sulfito reductoras que crecen en anaerobiosis (Procedimiento según International Standard Organization ISO 15213:2003).

Análisis de textura

Se realizaron análisis de perfil de textura (TPA) a la pasta fresca envasada y refrigerada una vez por semana durante 30 días. Estas determinaciones se realizaron por triplicado para cada envase. Este ensayo consiste en comprimir el alimento en dos veces consecutivas sin llegar a romperlo, simulando dos mordidas, mediante una deformación del 50 % respecto de la altura inicial de la pasta y así registrar la curva de la fuerza empleada en función del

tiempo, o la distancia, ya que se suele comprimir a velocidad constante (0,5 mm/s). (Martínez et al., 2007; Battle et al 2018).

El perfil de textura (TPA), se realizó utilizando el texturómetro BROOKFIELD TEXTURE PRO CT con una sonda denominada Knife, la cual simula el diente. Para las mediciones se utilizaron 3 tiras de fideos frescos de 40 mm de largo, 20 mm de ancho y 2mm de espesor (figura 7), Limroongreungrat, K., & Huang, Y. W. (2007).



Figura 7. Preparación de la muestra para determinación del TPA.

En este estudio se evalúan los parámetros: dureza, adhesividad, elasticidad, gomosidad y cohesividad de la formula en estudio.

La fuerza máxima que realiza la sonda durante la primera compresión corresponde a la dureza. La adhesividad es el trabajo necesario para separar la sonda de la muestra y corresponde al área de fuerza negativa después de la primera compresión. La elasticidad es la distancia a la que una muestra deformada vuelve a su estado de no deformidad después de que se retire la fuerza de deformación de la segunda compresión. La cohesividad relaciona el área bajo el segundo pico al área bajo el primer pico, (Limroongreungrat, K. et al. 2007; Martínez et al., 2007).

1. Resultados y Discusión

Los resultados de porcentaje de humedad se muestran en la tabla 2 donde se indica cada determinación realizada como promedio de los resultados triplicados obtenidos semanalmente durante 30 días. Los resultados sugieren que la cantidad de humedad que retiene la pasta puede asociarse a la inulina presente, la cual permite retener gran contenido de agua en la estructura del alimento, según Díaz, Andrea (2021). Puede verse que el contenido de humedad para la pasta almacenada varía ligeramente tanto en envase de nylon como de polipropileno. A la semana 4, la pasta

envasada en ambos envases tiende a una humedad promedio del 25%, valor que se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el CAA para pastas frescas. Con respecto a la actividad de agua, según los resultados obtenidos en la tabla 3, puede observarse una ligera disminución de la misma en ambos envases a medida que transcurren los días de almacenamiento. La actividad del agua promedio de la pasta almacenada es de 0.9, similar a la encontrada en otros trabajos donde se desarrollan pastas frescas alternativas, (Limroongreungrat, K., et al. 2007). En las siguientes tablas se muestran los resultados de los análisis microbiológicos realizados.

Tabla 2. Resultados de los porcentajes de humedad en la pasta refrigerada en polipropileno y nylon.

% Humedad	1er determinación	2da determinación	3er determinación	4ta determinación	5ta determinación
Polipropileno	26,637 % H	19,534 % H	17,506 % H	25,12 %H	25,65 %H
Nylon	26,637 % H	26,825 % H	23,879 % H	26,708%H	25,425%H

Tabla 3. Resultados de la actividad de agua (aw) para la pasta en nylon y polipropileno.

	1er determinación	2da determinación	3er determinación	4ta determinación	5ta determinación
aw polip	0,92	0,85	0,90	0,89	0,86
aw nylon	0,92	0,91	0,91	0,90	0,88

Tabla 4. Aerobios mesófilos

Día	Envase	Ufc/g
0	Nylon	66.200
	Polipropileno	65.400
7	Nylon	935.000
	Polipropileno	120.000
14	Nylon	1,56x10 ⁶
	Polipropileno	8,82x10 ⁵
21	Nylon	3,84x10 ⁷
	Polipropileno	2,18x10 ⁷

Tabla 5. Hongos y levaduras

Día	Envase	Ufc/g
0	Nylon	970
	Polipropileno	1.200
7	Nylon	41.500
	Polipropileno	30.000
14	Nylon	7,28x10 ⁵
	Polipropileno	1,28x10 ⁵
21	Nylon	2,78x10 ⁵
	Polipropileno	2,38x10 ⁵

Tabla 6. Hongos y levaduras

Día	Envase	Resultado
0	Nylon	presencia en 0,1 g
	Polipropileno	presencia en 0,1 g
7	Nylon	presencia en 0,1 g
	Polipropileno	presencia en 0,1 g
14	Nylon	presencia en 0,1 g
	Polipropileno	presencia en 0,1 g
21	Nylon	ausencia en 0,1 g
	Polipropileno	ausencia en 0,1 g

Tabla 7. Anaerobios sulfito reductores

Día	Envase	Resultado
0	Nylon	ausencia en 0,1 g
	Polipropileno	ausencia en 0,1 g
7	Nylon	ausencia en 0,1 g
	Polipropileno	ausencia en 0,1 g
14	Nylon	ausencia en 0,1 g
	Polipropileno	ausencia en 0,1 g
21	Nylon	ausencia en 0,1 g
	Polipropileno	ausencia en 0,1 g

En la tabla 4 se observa un aumento de los aerobios mesófilos a medida que transcurren los días, lo cual puede asociarse al origen de la materia prima como es el caso de los tubérculos de topinambur que provienen del subsuelo o malas condiciones de almacenamiento de las semillas de amaranto.

Los aerobios mesófilos son indicadores de la inocuidad del alimento, haciendo referencia a la materia prima utilizada, la manipulación y procesamiento, así como también el almacenamiento del producto, (Cardona Serrate, F. 2019; Karel, M. 1976).

Otros factores que podrían influir en este desarrollo microbiano se asociarían a la estabilidad de la actividad acuosa, debido a los empaques utilizados que son impermeables a la humedad y además fueron herméticamente sellados.

De manera similar, se puede deducir que el desarrollo de hongos y levaduras observado en la tabla 5, se relaciona a la actividad del agua de la pasta determinada al día 30, de aproximadamente 0,9 (tabla 3). Esto es debido a que la mayoría de mohos y levaduras comienzan su desarrollo a una *aw* de 0,7, (Cardona Serrate, F. 2019; Karel, M. 1976; Josefina, C. et al. 2014).

Para que las levaduras se desarrollen se necesita de una humedad de 20% o más y los mohos necesitan humedades entre 13 y 16%. En este caso la pasta tiene una humedad inicial de 25%, que si bien esta dentro de los parámetros establecidos en el CAA para pastas frescas, favorece el desarrollo de estos microorganismos. Debido a las características que poseen los anaerobios sulfito reductores se suelen usar como indicadores de la calidad higiénica del agua y de los alimentos. Los resultados obtenidos en la tabla 7, indican la ausencia de microorganismos

esporulados bacilos gram positivos del género *Clostridium*; (Josefina, C. et al. 2014).

Hay que contemplar que en esta pasta no se han utilizado conservantes más allá de los propios y naturales del mismo alimento.

El huevo, debido a la lisozima tiene actividad lítica frente a las paredes de las bacterias Gram positivas, así mismo contiene fosvitina la cual unida a iones metálicos le confiere propiedades antibacterianas, sin embargo, puede ocurrir a que luego de la cocción de la pasta se inactive o desnaturalice la misma, Carrillo, W. (2013).

Es posible reducir la carga microbiana inicial de la materia prima a utilizar en la formulación irradiando a las harinas con radiación gamma para esterilizar. Palomino Heredia, P. P. (2010).

En el análisis de textura se observa tanto en la tabla 8 como en las figuras 8 y 9, que la carga del primer pico correspondiente al primer día de elaboración de la pasta, indica una dureza menor que en las sucesivas semanas de almacenamiento, tanto en la pasta envasada en polipropileno como en nylon.

Sin embargo, con el tiempo la dureza de la muestra almacenada en polipropileno se eleva y se mantiene en este valor elevado desde la primera semana de almacenamiento en adelante. La muestra almacenada en el envase de Nylon parece ir aumentando gradualmente alcanzando un valor mucho menor que para la pasta envasada en polipropileno a la tercera semana. Esta dureza elevada y mantenida en el tiempo para la pasta almacenada en polipropileno se relacionaría a un "resecamiento superficial", manteniendo o reteniendo la humedad en el centro de la misma, (Gonzalez, J. J. et al. 2000) (figura 10)

Tabla 8. Parámetros evaluados de la pasta fresca durante el ensayo TPA.

Almacenamiento	Envase	Dureza (N)	Adhesividad (mJ)	Cohesividad	Elasticidad (mm)	Gomosidad (N)
Día 1		5,673	0,013	0,506	3,28	2,753
Semana 1	Polipropileno	16,34	0,016	0,223	0,25	4,706
	Nylon	9,79	0,013	0,3	0,226	1,956
Semana 2	Polipropileno	16,07	0,02	0,28	0,92	4,656
	Nylon	8,716	0,006	0,526	1,196	3,49
Semana 3	Polipropileno	16,683	0,03	0,493	0,916	7,84
	Nylon	15,52	0,026	0,236	1,74	3,716
Semana 4	Polipropileno	18,573	0,02	0,26	2,75	4,226
	Nylon	9,46	0,013	0,496	0,956	5,113

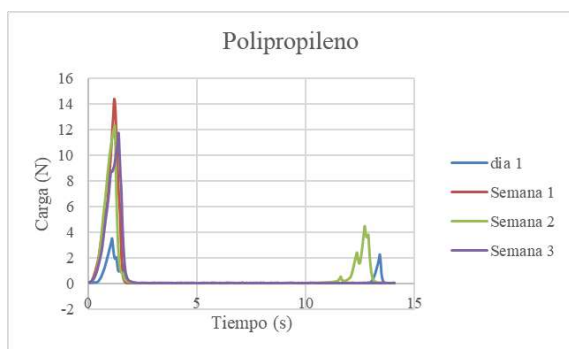


Figura 8. TPA pasta envasada en Polipropileno durante 3 semanas

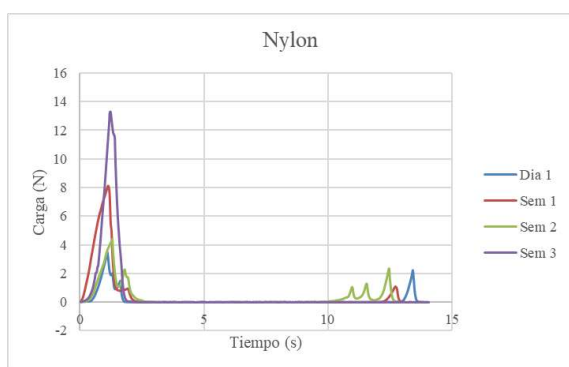


Figura 9. TPA pasta envasada en nylon durante 3 semanas

La adhesividad es un parámetro que parece mantenerse durante el almacenamiento en ambos envases estudiados, mientras que la elasticidad es un parámetro que va disminuyendo con el tiempo de almacenamiento con respecto al día 1 de envasado, inversamente ocurre con la gomosidad.

Las pastas frescas almacenadas que contienen almidón gelatinizado tienden a producir una retrogradación de la amilopectina, (Mariotti, M., et. al 2011).

Esta pasta fresca almacenada está preparada con una harina tratada térmicamente (HA), por lo tanto, el almidón de la pasta se encuentra en parte gelatinizado, además del almidón gelatinizado del chuño que también forma parte de la fórmula.

Durante este proceso las moléculas de amilopectina se reagrupan dependiendo de la afinidad de los grupos hidroxilo sobre cadenas adyacentes, Pomeranz, Y. (1985).

Esto se traduce en un aumento de la rigidez en la pasta produciendo un exudado por sinéresis.

La retrogradación del almidón depende de varios factores tales como las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura de

refrigeración) que influyen sobre la velocidad en que este proceso de sinéresis se lleva a cabo, (Iturriaga, L. B. 2001; Mariotti, et al. 2011).



Figura 10. Aspecto de la pasta envasada y refrigerada luego de tres semanas.

En el caso de esta pasta no se evidenciaron cambios en su contenido de humedad durante el tiempo de almacenamiento refrigerado en nylon por lo tanto no se manifiesta el proceso de sinéresis. Sin embargo, en la pasta almacenada en polipropileno hubo una disminución de la humedad en la semana 2 y 3, que podría deberse a una cierta permeabilidad del envase, volviendo finalmente a su valor inicial de humedad debido a una redistribución y retención del agua dentro del alimento por la presencia de fibra (Nilusha R., et. al 2019).

Esta variación en la humedad de la pasta envasada en polipropileno se correlaciona con valores más altos de dureza en la pasta almacenada y refrigerada en este envase.

2. Conclusiones

Debido a que la humedad de la pasta es uno de los criterios clave para la seguridad debido a que propicia el desarrollo de microorganismos, es conveniente optar por el nylon en este aspecto. La actividad de agua de la pasta disminuye levemente con los días de almacenamiento en ambos envases, aunque es elevada, lo que hace que sea más susceptible al desarrollo microbiano permitiendo así el crecimiento de bacterias. Con respecto a la humedad, si bien los valores se mantuvieron ligeramente estables y aceptables para pastas frescas, analizando los resultados puede verse que el envase polipropileno es un poco más inestable para mantener este parámetro. Esto puede deberse a que el polipropileno tiene mayor permeabilidad, lo cual también coincide con el aumento de dureza que se observa en la pasta almacenada en este envase. Por

otro lado, así como no es deseable un aumento en la gomosidad, tampoco es deseable una disminución de la elasticidad. Por lo analizado anteriormente se recomienda un período de almacenamiento corto de 1 a 3 días de refrigeración en envase de nylon, lo cual permite asegurar las condiciones de inocuidad, como sus propiedades nutricionales y de calidad.

3. Agradecimientos

A la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de San Luis, donde pudo desarrollarse este trabajo de investigación. A la Universidad Nacional de Cuyo por considerar este trabajo y brindarnos la posibilidad de su difusión.

4. Referencias

- Alvarez Murillo, M. J. (2010). Aplicación de la tecnología de fritura para la obtención de chips de oca (*Oxalis tuberosa*, Mol) a diferentes temperaturas y tiempos, utilizando dos empaques a dos condiciones de almacenamiento.
- Ariza Ortega, J. A., Flores Gonzalez, M., & Coyoti Huerta, J. (2011). Análisis de los ácidos grasos en la semilla de amaranto tostada. *La Alimentación Latinoamericana* N°292. 47-49.
- Batlle, T., Zaniolo, S. M., Leporati, J., Malka, M. T., Bochetto, A. N., & Bomben, R. M. (2018). Influencia de las variables de secado en la calidad nutricional de bocaditos salados a base de amaranto. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 9(1), 1-9.
- Cardona Serrate, F. (2019). Actividad del agua en alimentos: concepto, medida y aplicaciones.
- Carrillo, W. (2013). Lisoizima: Actividad antibacteriana y alergenidad. *Actualización en Nutrición*, 14(4), 314 - 326.
- Chigal, P. S. (2021). Parámetros fisicoquímicos, texturales y sensoriales de pastas a base de fécula de mandioca.
- Díaz, Andrea. Raíces no tradicionales como fuente de ingredientes para el desarrollo de alimentos funcionales. 2021. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Fu B.X. (2008). Asian noodles: History, classification, raw materials, and processing. *Food Research International*, 41: 888-902.
- Gonzalez, J. J., McCarthy, K. L., & McCarthy, M. J. (2000). Textural and structural changes in lasagna after cooking. *Journal of texture studies*, 31(1), 93-108.
- Hernández, A. (2015). Estudio del comportamiento reológico de pasta enriquecida en fibra dietética y con incorporación de hidrocoloides (Tesis de grado). Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Josefina, C., & Nancy, P. (2014). Análisis Microbiológico de los Alimentos, Metodología Analítica Oficial, Microorganismos Indicadores.
- Karel, M. (1976). Water activity and food preservation. *Principles of food science*.
- Larrosa, V. (2014). Efectos de los hidrocoloides en las características fisicoquímicas y reológicas de pastas libres de gluten aptas para individuos celíacos (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Limroongreungrat, K., & Huang, Y. W. (2007). Pasta products made from sweetpotato fortified with soy protein. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 200-206.
- Martinez, Cristina S, Ribotta Pablo D, León AE, M Cristina Añón (2007). Physical, sensory and chemical evaluation of cooked spaghetti. *Journal of Texture Studies*, 38(6):666-683.
- Nilusha RAT, Jayasinghe JMJK, Perera ODAN, Perera PIP. Development of Pasta Products with Nonconventional Ingredients and Their Effect on Selected Quality Characteristics: A Brief Overview. *Int J Food Sci*. 2019 Nov 27;2019:6750726. doi: 10.1155/2019/6750726. PMID: 31886166; PMCID: PMC6925700.
- Palomino Heredia, P. P. (2010). Aseguramiento de la inocuidad de la harina de maca con radiación gamma.
- Pruna Tapia, D. B. (2020). Determinación de los compuestos bioactivos y tiempo de vida útil de un spaghetti elaborado a partir de cultivos andinos y residuos agroindustriales (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería en Alimentos).
- Rojas, J. (2018) Análisis microbiológicos de pastas de sémola de trigo de marca libre. Retrieved from: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15065>.
- Schoenlechner, R., Drausinger, J., Ottenschlaeger, V., Jurackova, K., & Berghofer, E. (2010). Functional properties of gluten-free pasta produced from amaranth, quinoa and buckwheat. *Plant foods for human nutrition*, 65, 339-349.
- Sepúlveda, C., & Zapata, J. (2019). Efecto de la

Temperatura, el pH y el Contenido en Sólidos sobre los Compuestos Fenólicos y la Actividad Antioxidante del Extracto de Bixa orellana L. Información tecnológica, 30(5), 57-65

Vedia-Quispe, Víctor Samir, Gurak, Poliana Deyse, Espinoza, Sandra Karin, & Ruano-Ortiz, Juan Antonio. (2016). Calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial de tallarines producidos con sustitución parcial de sémola de trigo por harina de amaranto. Revista Española de Nutrición Humana y Dietética, 20(3), 190-197. <https://dx.doi.org/10.14306/renhyd.20.3.215>

Yalcin, S., & Basman., A. (2007). Quality characteristics of corn noodles containing gelatinized starch, transglutaminase and gum. Journal of Food Quality, 31, 465–479.



Inmovilización de levaduras autóctonas para la obtención de vinos regionales

Carina Alejandra Soldá^{1*}, Cristina Verónica Davies¹, Lilita Mabel Gerard¹,
María Gabriela Dalzotto^{1,2}, María Belén Corrado¹, María Verónica Fernández Martínez¹,
Mónica Inés Villalba¹, Franco Damián Irigoyen¹

1. Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Mons. Tavella 1450, Concordia, Entre Ríos, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*E-mail: carina.solda@uner.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Vinos regionales
Levaduras inmovilizadas
Tannat
Marselan

RESUMEN

La vitivinicultura experimenta un desarrollo creciente en Entre Ríos y, el uso de levaduras autóctonas se extiende para obtener vinos diferenciados. El objetivo principal de este trabajo fue analizar dos procesos de vinificación con levaduras autóctonas (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa GenBank: OQ520880.1) aisladas previamente: uno de ellos inoculado con células libres y el otro con células inmovilizadas en matriz de alginato, sobre mostos de uvas regionales (Tannat y Marselan). El experimento consistió en un diseño experimental ². El seguimiento del proceso se realizó mediante la determinación del porcentaje de sólidos solubles, el cálculo de la densidad y la velocidad global de consumo de sustrato para cada sistema. Los ensayos realizados en la variedad Tannat evidenciaron que las levaduras en estado inmovilizado presentaron una mayor capacidad de metabolizar los azúcares ($7,90 \pm 0,19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), frente a la misma variedad con levaduras en estado libre ($6,59 \pm 0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Sin embargo, no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre el sistema libre ($6,75 \pm 0,16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) y el inmovilizado ($6,75 \pm 0,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) en los ensayos realizados con la variedad Marselan. En conclusión, la inmovilización de levaduras nativas podría aportar ventajas tecnológicas al proceso de vinificación.

Immobilization of native yeasts for producing regional wines

KEYWORDS

Native yeasts
Immobilized cells
Tannat
Marselan

ABSTRACT

Viticulture and enology are undergoing rapid growth in Entre Ríos, and the use of indigenous yeasts is becoming more widespread to obtain distinctive wines. The main objective was to analyze two winemaking processes with regional grape varieties (Tannat and Marselan) using indigenous yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*, GenBank OQ520880.1) previously isolated. One system was inoculated with free cells and the other with cells immobilized in an alginate matrix. The experiment consisted of a ² experimental design. Process monitoring was performed by soluble solids determination, density by an empirical formula and the overall rate of substrate consumption for each system. Assays carried out on Tannat variety showed that immobilized cells exhibited a greater capacity to metabolize sugars ($7.90 \pm 0.19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) compared with the same variety using free cells ($6.59 \pm 0.13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). However, no statistically significant differences were observed between the free system ($6.75 \pm 0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and the immobilized cells ($6.75 \pm 0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) when compared with Marselan variety. In conclusion, immobilization of indigenous yeasts could provide technological advantages to the winemaking process.

1. Introducción

El actual escenario vitivinícola se caracteriza por la creciente competitividad de los mercados nacionales e internacionales y por las demandas de consumidores que exigen productos innovadores. Por este motivo, los elaboradores de vinos se ven obligados a optimizar sus procesos de producción e implementar estrategias de diferenciación. Una alternativa que ha ganado relevancia en los últimos años es el empleo de levaduras autóctonas seleccionadas en función de su adaptación a las condiciones ecológicas y tecnológicas específicas de cada región. Esta práctica no solo favorece la obtención de vinos con propiedades organolépticas distintivas, asociadas a su terroir, sino que también contribuye a la conservación de la biodiversidad microbiana local (Miranda Castillejo et al., 2015; Alonso González & Parga Dans, 2019; Lappa et al., 2020; Zabukovec et al., 2020). La diversidad de levaduras autóctonas confiere a los vinos una mayor complejidad sensorial y una identidad regional más acentuada en comparación con aquellos fermentados con cepas comerciales estandarizadas (Bougreau et al., 2019).

En los últimos diez años, la superficie de vides plantadas en la provincia de Entre Ríos aumentó un 67,5%. La variedad de uvas tintas Tannat se ha instaurado en esta provincia, debido no solo a las condiciones climáticas y calidad de los suelos, sino también a la tipicidad de los vinos obtenidos y, junto con el varietal Marselan, representan el 60 % de las uvas destinadas a la producción de vinos en la provincia (INV, 2024).

La vinificación en tinto se ha basado históricamente en sistemas de fermentación sumergida utilizando células libres de *Saccharomyces cerevisiae* como cultivo iniciador (Moreno García et al., 2018). Por otra parte, en años recientes, la técnica de inmovilización celular ha surgido como área de investigación en enología, debido a posibles ventajas tecnológicas y económicas frente a los sistemas convencionales. Esta metodología, cuya aplicación se ha consolidado exitosamente en procesos industriales como la producción de alcoholes, ácidos orgánicos y enzimas (Liouni et al., 2008; Reddy et al., 2018; López-Mencheró et al., 2021), puede ser adaptada al contexto vitivinícola mediante el empleo de diversos sustratos gelificantes, destacando entre ellos el alginato de calcio como matriz preferencial. Las ventajas comparativas de este sistema, particularmente cuando se emplea la técnica de atrapamiento en matrices de alginato, son el incremento en la productividad fermentativa (Djordjević et al., 2015; Bokkhim et al., 2018), la

optimización de la eficiencia metabólica mediante altas densidades celulares en biorreactores, la facilitación de la separación celular en fase de sedimentación, la reducción del período de latencia microbiana y la estabilización del proceso fermentativo (López-Mencheró et al., 2021). También se ha observado una elevada tasa de supervivencia y buenas condiciones para el almacenamiento, lo que permitiría reducir costos relacionados con el uso de levaduras liofilizadas (Kim et al., 2017; Kim et al., 2018).

El objetivo principal de este trabajo fue analizar dos procesos de vinificación con levaduras autóctonas aisladas previamente por este grupo de investigación: uno de ellos inoculado con células libres y el otro con células inmovilizadas en matriz de alginato, sobre mostos de dos variedades de uvas regionales, Tannat y Marselan.

2. Materiales y métodos

Diseño experimental

El ensayo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de Alimentos (MIBIAL) de la Facultad de Ciencias de la Alimentación, de la Universidad Nacional de Entre Ríos.

Para alcanzar el objetivo propuesto se confeccionó un diseño factorial 22, donde se evaluaron los siguientes factores: variedad de uva (Tannat y Marselan) y método de fermentación (tradicional y células inmovilizadas), por medio de microvinificaciones. Se utilizaron dos réplicas biológicas de cada ensayo.

Materia prima

Se dispuso de uvas de las variedades Tannat y Marselan de la vendimia 2022, provenientes de un viñedo de la zona (-31.24842418240885, -58.117994400881244). Las uvas se cosecharon en el estado óptimo de maduración de acuerdo al enólogo del viñedo y fueron mantenidas en conservación a -18°C hasta el momento de su uso para evitar su deterioro microbiano, sensorial y nutricional.

Levadura autóctona *Saccharomyces cerevisiae* (cepa Genbank OQ520880.1)

Esta cepa fue aislada de uvas de la variedad Tannat de la región de Concordia por el equipo de

investigación del laboratorio antes mencionado. Fue seleccionada por sus características biotecnológicas, como el poder fermentativo, la tolerancia al etanol y al dióxido de azufre, capacidad de floculación y factor killer (Davies et al, 2023) y su identificación se llevó a cabo por métodos moleculares (Gerard et al, 2023). La cepa *Saccharomyces cerevisiae* OQ520880.1, conservada en congelación, se activó en caldo YPD (extracto de levadura - peptona - dextrosa) a 30°C, 24 h antes de su utilización. Al finalizar esta etapa, un tubo de 5 mL de medio con la levadura, fue usado de inóculo en 45 mL de caldo YPD, a 30°C durante 48 h en agitación, para lograr su propagación.

Inmovilización de levadura autóctona

La combinación de sustancias inmovilizantes fue 0,5% de alginato de sodio y 0,5% de cloruro de calcio (Soldá et al., 2025). Para ello se prepararon concentraciones de alginato de manera tal que, al mezclarse con el inóculo, permitieran obtener la concentración final deseada. Tanto las soluciones de alginato como las de cloruro se esterilizaron previamente a 121 °C 15 min-1.

Para inmovilizar las células, un volumen de 10 mL de inóculo se mezcló con la cantidad requerida de alginato mediante agitador magnético para obtener una suspensión uniforme. Usando una jeringa hipodérmica estéril 22G 1", la suspensión de levaduras se dejó caer gota a gota sobre 50 mL de solución de cloruro de calcio. Las esferas formadas se dejaron en reposo 30 min y luego se filtraron para usarse como inóculo (Kim et al., 2017; Kim et al., 2018; Utami et al., 2022).

Ensayos de microvinificaciones

Se llevaron a cabo microvinificaciones (100 mL) en mostos de uvas de las variedades Tannat y Marselan con la levadura autóctona en condiciones de inmovilización y libre. Las uvas se despallaron y trituraron, se agregó metabisulfito de potasio a razón de 200 mg L⁻¹, según las prácticas enológicas habituales (Stockley et al., 2021) y luego de 30 min se inocularon con *S. cerevisiae* OQ520880.1 tanto inmovilizadas en la condición preestablecida, como en sistema libre. Para el inóculo se tuvo en cuenta contar 106 UFC/mL al inicio de fermentación. El seguimiento del proceso fue mediante la determinación de pH, densidad y el porcentaje de sólidos solubles. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Sólidos solubles

Se determinaron por método refractométrico, con refractómetro termocompensable (Hanna Instruments modelo HI 96801, Rumania).

Densidad

Fue calculada a partir de lecturas refractométricas corregidas según el modelo empírico propuesto por Plugatar et al. (2023).

pH

Se determinaron por método potenciométrico, con peachímetro Boeco modelo BT-500, Germany, según AOAC, 2019, 21st Ed., Official Method 960.19.

Velocidad global de consumo de sustrato

Con los datos de la variación de los sólidos solubles, se calculó la velocidad global de consumo de sustrato, de acuerdo a la ecuación 1:

$$r_s = \frac{S_i - S_f}{t} \quad (1)$$

Donde S_i es el sustrato inicial expresado como g S.L⁻¹, S_f el sustrato final (g S.L⁻¹) y t el tiempo expresado en días.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA), con el software Statgraphics Centurion XV, empleando un nivel de significancia de $p < 0,05$. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas entre medias se aplicó el test LSD.

3. Resultados y Discusión

Seguimiento de los procesos fermentativos: Los procesos [CM6.1] la cinética fermentativa se llevaron a cabo durante 16 días, de acuerdo al diseño propuesto. El seguimiento de los mismos se muestra en la Figura 1.

Los valores iniciales de sólidos solubles en la vendimia analizada en este estudio (21,20 y 19,40 °Brix para Tannat; 18,50 y 18,57 para Marselan) son similares a los reportados en uvas tintas. En particular, para 2017 y 2018, las uvas Cabernet Franc mostraron valores de 23,00 y 20,90 °Brix, respectivamente; Cabernet Sauvignon presentó

21,56 y 19,40 °Brix en esos mismos años (Biniari et al., 2020). La variedad Merlot registró 25,00 °Brix en 2017 y 18,53 °Brix en 2018. En cuanto a la variedad Tannat, Piccardo y sus colaboradores (2019) reportaron un valor de 24,30, 19,30 y 26,30 °Brix en las vendimias de 2016, 2017 y 2018 respectivamente

en Uruguay. Otros estudios que analizaron ambas variedades en las vendimias de 2015 y 2016 también reflejan valores similares: Tannat con 25,00, 22,10 y 24,50 °Brix en 2015, y 20,80 °Brix en 2016; y Marselan con 23,20 °Brix en 2015 y entre 24,90 y 25,30 °Brix en 2016 (Favre et al., 2020).

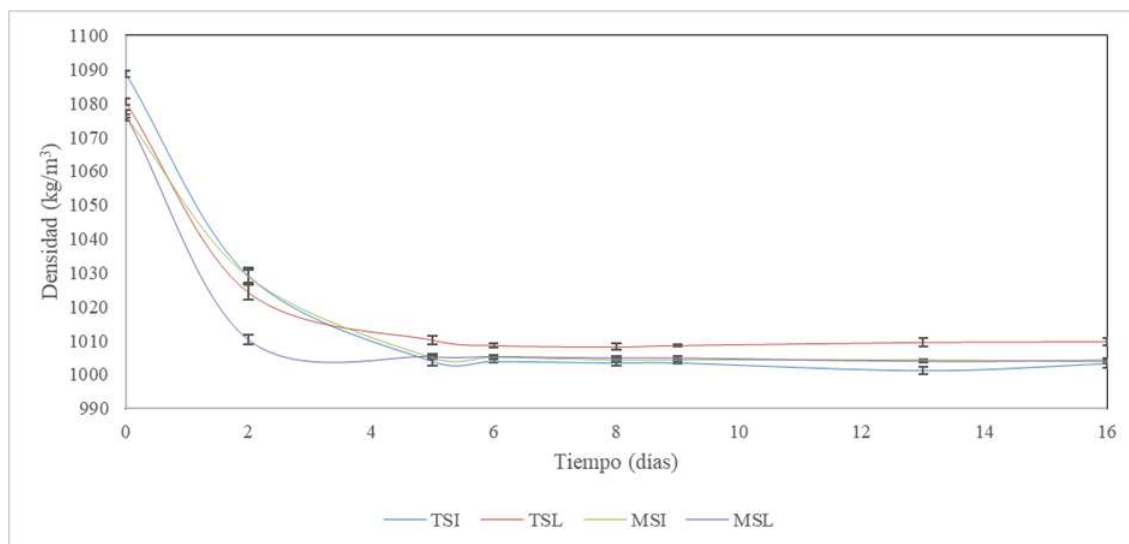


Figura 1. Seguimiento de las fermentaciones [CM11.1] para las variedades Tannat y Marselan en sistema libre (TSL y MSL) e inmovilizado (TSI y MSI), respectivamente.

Tabla 1: Comparación de velocidades de consumo de sustrato en microvinificaciones para las variedades de uva Tannat y Marselan en estado libre e inmovilizado.

Sistemas	Velocidad de consumo de sustrato (g.L.d ⁻¹)	
	Varietal	
	Tannat	Marselan
Levadura autóctona libre	6,59 ± 0,13 ^b	6,75 ± 0,16 ^b
Levadura autóctona inmovilizada	7,90 ± 0,19 ^a	6,75 ± 0,11 ^b

Letras diferentes en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (LSD; $p \leq 0,05$)

En los cuatro sistemas ensayados, se observó la detención del proceso fermentativo, aproximadamente a los 5 días del inicio de las fermentaciones. En fermentaciones espontáneas, se ha reportado para las mismas variedades de uva y en tres vendimias, la detención de la fermentación alrededor de los 8 días (Davies et al, 2023).

Velocidad global de consumo de sustrato

Las velocidades globales de consumo de sustrato se indican en la Tabla 1. Se evidenció una mayor capacidad de metabolizar los azúcares por parte de la levadura autóctona en estado inmovilizado en la variedad Tannat ($7,90 \pm 0,19$ g.L⁻¹.d⁻¹), frente a la misma variedad de uva con las levaduras en estado libre ($6,59 \pm 0,13$ g.L⁻¹.d⁻¹). Resultados similares

fueron encontrados por Kim (2018) en fermentaciones vnicas usando levaduras inmovilizadas. En cuanto a la variedad Marselan, no exhibió diferencias estadísticamente significativas entre el sistema libre ($6,75 \pm 0,16$ g.L⁻¹.d⁻¹) y el inmovilizado ($6,75 \pm 0,11$ g.L⁻¹.d⁻¹).

Al analizar las pendientes de las velocidades en la etapa lineal ($t=2$ días[CM1.1]) de los sistemas ensayados, se puso en evidencia la mayor velocidad de consumo de sustrato en esta etapa por parte de *S. cerevisiae* OQ520880.1 en el sistema libre [gd2.1] en la variedad Marselan, mientras que en Tannat no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (Tabla 2). Sin embargo, esta tendencia inicial no se

ve reflejada en el resultado final de las VGC. Esto podría atribuirse a las diferencias fisiológicas de los varietales estudiados, y la necesidad de adaptación

de la levadura al medio (Ribéreau Gayon et al., 2003).

Tabla 2: Comparación de las pendientes en las etapas lineales en microvinificaciones para las variedades de uva Tannat y Marselan en estado libre e inmovilizado

Variedad	Sistema	Pendiente
Tannat	Inmovilizado	-29,8±1,5 b
	Libre	-28,1±0,7b
Marselan	Inmovilizado	-23,6±1,2 c
	Libre	-33,1±1,2 a

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas para cada variedad (LSD; $p \leq 0,05$)

4. Conclusiones

Al observar las velocidades globales de consumo de sustrato, *S. cerevisiae* OQ520880.1 demostró una mayor eficiencia para metabolizar azúcares en uvas Tannat en sistema inmovilizado en comparación con el sistema libre y con la variedad Marselan en ambos tratamientos. Estos hallazgos sugieren que la inmovilización de levaduras para vinificación puede representar una alternativa tecnológicamente viable, cuyas ventajas potenciales (como la mejora en la eficiencia fermentativa) serán exploradas en profundidad en investigaciones posteriores.

Los resultados obtenidos posicionan a la variedad Tannat como relevante para estudios enológicos en la región, destacándose como material de partida para futuros ensayos a mayor escala y bajo condiciones de añejamiento controladas.

5. Agradecimientos

Al equipo de docentes y becarios de MIBIAL que hacen posible que podamos llevar a cabo nuestros proyectos. Este trabajo fue financiado por el proyecto de investigación PID Novel UNER 8127 "Técnicas de fermentación alcohólica para vinificación con levaduras autóctonas utilizando uvas de viñedos de Concordia, Entre Ríos."

La cepa *A. pullulans* m11-2 fue conservada mediante liofilización utilizando glutamato de sodio al 2,4% como agente lioprotector, manteniendo tanto su viabilidad como su actividad pectinolítica durante al menos 18 meses de almacenamiento a 4 °C. Estos resultados demuestran la eficacia de este protocolo de conservación para obtener levaduras secas activas viables y funcionales, y refuerzan su potencial

como fuente enzimática para aplicaciones enológicas específicas.

6. Referencias

- Alonso González P. y Parga Dans E. (2019) La vuelta al terroir: el despertar de la cultura del vino en España. *Rivar*, 6 (17): 62-89. ISSN 0719-4994.
- Biniari, K., Xenaki, M., Daskalakis, I., Rusjan, D., Bouza, D. y Stavarakaki, M. (2020). Polyphenolic compounds and antioxidants of skin and berry grapes of Greek *Vitis vinifera* cultivars in relation to climate conditions. *Food Chemistry*, 307, 125518.
- Bokkhim, H., Neupane, P., Gurung, S. y Shrestha, R. (2018). Encapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* in alginate beads and its application for wine making. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 10, 18-23.
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K. y Loneragan, G. (2019). Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLoS one*, 14(5), e0216246.
- Davies, C., Gerard, L., Corrado, M. B., Soldá, C. A., Fernández, M. V., Dalzotto, M. G. y Esteche, S. (2023). Aislamiento, caracterización e identificación de levaduras de frutos de la vid (*Vitis vinifera*) de la región de Concordia. *Ciencia, Docencia y Tecnología Suplemento*, 13(15).
- Djordjević, R., Gibson, B., Sandell, M., Billerbeck, M., Bugarski, B., Leskošek-Čukalović, I., Vunduk, J., Nikićević, N. y Nedović, V. (2015). Raspberry wine fermentation with suspended and immobilized yeast cells of two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 32, 271-279.

- Favre, G., Piccardo, D., Sergio, G. A., Pérez-Navarro, J., García-Romero, E., Mena-Morales, A. y González-Neves, G. (2020). Stilbenes in grapes and wines of Tannat, Marselan and Syrah from Uruguay: This article is published in cooperation with the 11th OenolVAS International Symposium, June 25–28 2019, Bordeaux, France. *OENO One*, 54(1), 27-36.
- Gerard, L. M., Corrado, M. B., Davies, C. V., Soldá, C. A., Dalzotto, M. G. y Esteche, S. (2023). Isolation and identification of native yeasts from the spontaneous fermentation of grape musts. *Archives of Microbiology*, 205(9), 302.
- INV (2024): Informe anual de cosecha y elaboración 2024. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/inv/estadisticas-vitivincolas/cosecha/anuarios>
- Kim, D., Lee, S. y Park, H. (2017). Effect of air-blast drying and the presence of protectants on the viability of yeast entrapped in calcium alginate beads with an aim to improve the survival rate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (1): 93-102.
- Kim, D., Lee, S. y Park, H. (2018). Fermentation characteristics of Campbell Early grape wine inoculated with indigenous Korean wine yeasts encapsulated in Ca-alginate beads after air-blast drying. *Italian Journal of Food Science*, 30: 535-552.
- Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E. y Kopsahelis, N. (2020). Indigenous yeasts: eEmerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*, 32, 133-143.
- Liouni, M., Drichoutis, P. y Nerantzis, E. T. (2008). Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate–chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2):281-288.
- López-Menchero, J. R., Ogawa, M., Mauricio, J. C., Moreno, J. y Moreno-García, J. (2021). Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system. *LWT*, 144, 111250.
- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A. y Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7): 759-773.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C. y Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9:241.
- Piccardo, D., Favre, G., Pascual, O., Canals, J. M., Zamora, F. y González-Neves, G. (2019). Influence of the use of unripe grapes to reduce ethanol content and pH on the color, polyphenol and polysaccharide composition of conventional and hot macerated Pinot Noir and Tannat wines. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1321-1335.
- Plugatar, Y., Johnson, J. B., Timofeev, R., Korzin, V., Kazak, A., Nekhaychuk, D. y Rotanov, G. (2023). Prediction of ethanol content and total extract using densimetry and refractometry. *Beverages*, 9(2), 31.
- Reddy, L. V., Reddy, Y. H. K., Reddy, L. P. A. y, & Reddy, O. V. S. (2008). Wine production by novel yeast biocatalyst prepared by immobilization on watermelon (*Citrullus vulgaris*) rind pieces and characterization of volatile compounds. *Process Biochemistry*, 43(7): 748-752.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enología. Volumen II: Química del vino, estabilización y tratamientos*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Soldá, C. A., Davies, C. V., Dalzotto, M. G., Martínez, M. V. F., Corrado, M. B., & Gerard, L. M. (2025). Vinificación de uvas Tannat y Marselan con levaduras autóctonas libres e inmovilizadas. *Revista argentina de ingeniería*, 25(13), 58-71.
- Stockley, C., Paschke-Kratzin, A., Teissedre, P. L., Restani, P., Tejedor, N. G., & Quini, C. (2021). OIV collective expertise document SO₂ and wine: a review.



Modelado de la dinámica celular utilizando celdas de Voronoi

María Emilia Dussel*¹, Andrea Ridolfi²,

- 1 Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA), Universidad Nacional de Córdoba-CONICET, Córdoba 5000, Argentina.
- 2 Departamento de Física y Matemática, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Universidad Nacional de Cuyo. Instituto de Ingeniería y Ciencias Aplicadas a la Industria, CONICET-UNCUYO, San Rafael, M56000AGP, Mendoza, Argentina.

*E-mail: emilia.dussel@unc.edu.ar

PALABRAS CLAVES

Celdas de Voronoi
Dinámica celular
Convergencia de Hausdorff
Convergencia de Kuratowski.

RESUMEN

En este trabajo se presenta un modelo geométrico para describir la dinámica celular mediante el uso de celdas de Voronoi. Se estudian las condiciones bajo las cuales dichas celdas, construidas a partir de núcleos celulares en un dominio compacto, y modeladas como celdas de Voronoi, convergen en sentido de Kuratowski y de Hausdorff. Para ello, se formaliza el desplazamiento de una célula como una sucesión de sitios que tiende a una posición final, y se prueba que las correspondientes celdas convergen topológicamente. La división celular (mitosis) se modela como la adición de un nuevo sitio, mientras que la muerte se representa mediante celdas con peso, aumentando progresivamente dicho peso hasta anular la celda. Los resultados permiten establecer criterios matemáticos precisos para simular dinámicas celulares de manera estable. Este enfoque aporta una base formal al estudio de procesos biológicos mediante herramientas de la teoría de análisis lineal. Se muestran ejemplos de implementación de la simulación en el plano bidimensional.

Modeling cell dynamics using Voronoi cells

KEYWORDS

Voronoi cells
Cellular dynamics
Hausdorff convergence
Kuratowski convergence

ABSTRACT

In this work, a geometric model is presented to describe cellular dynamics using Voronoi cells. The conditions under which these cells, constructed from nuclei of cell within a compact domain and modeled as Voronoi cells, converge in the Kuratowski and Hausdorff sense, are studied. To this end, the displacement of a cell is formalized as a sequence of sites converging to a final position, and it is shown that the corresponding cells converge topologically. Cell division (mitosis) is modeled as the addition of a new site, while death is represented by weighted cells, increasing that weight progressively until the cell is nullified. The results allow for the establishment of precise mathematical criteria to simulate cellular dynamics in a stable manner. This approach provides a formal basis for the study of biological processes using tools from linear analysis theory. Examples of the simulation implemented in the two-dimensional plane are presented.

1. Introducción

Un diagrama o teselación de Voronoi es una partición del espacio euclídeo determinada por la cercanía a puntos pertenecientes a un conjunto dado, T , de sitios generadores. A los elementos de esta partición se los denomina celda de Voronoi. La geometría y propiedades de celdas y diagramas

dependen de la función distancia elegida para medir la cercanía entre puntos y de las características del conjunto generador T . Los primeros hallazgos se remontan a Descartes (1656), cuando publica que el sistema solar estaba compuesto por vórtices y regiones convexas formadas por materia que giraba alrededor de estrellas fijas. Dirichlet (1850) lo utiliza en el espacio tridimensional y Voronoi (1908)

generaliza el concepto a espacios arbitrarios \mathbb{R}^n . El dual geométrico de la teselación de Voronoi fue propuesta por Delaunay (1934) y se la denomina triangulación de Delaunay. A su vez, el método fue redescubierto en otros campos, recibiendo otras denominaciones, tales como los polígonos de Thiessen (1911) en meteorología, las células de Wigner-Seitz (1933), y las zonas de Brillouin (1930) en física del estado sólido. Sin embargo, los diagramas de Voronoi se popularizaron recién en 1985, con el avance tecnológico y científico, por sus aplicaciones en la geometría computacional (Preparata y Shamos, 1985).

Por otro lado, la teoría de desigualdades lineales ha sido particularmente valiosa para obtener información geométrica de las celdas deterministas de Voronoi. En el espacio euclidiano, una celda clásica de Voronoi puede representarse como el conjunto solución de un sistema de desigualdades lineales y, es aquí donde dicha teoría contribuye fuertemente. Cuando el conjunto de sitios involucrados en la celda es infinito, éstas se representan por sistemas lineales semi-infinitos (LSIS, por sus siglas en inglés). Algunos trabajos que utilizan herramientas de LSIS para estudiar celdas de Voronoi son Voigt (2008), Goberna et al. (2012) y Goberna et al. (2020). Recientemente, Ridolfi y Vera de Serio (2023) aplicaron resultados conocidos sobre LSIS en celdas alejadas de Voronoi y determinaron un radio robusto de factibilidad para dichas celdas, considerando incertidumbre en los sitios involucrados.

Otras generalizaciones posibles de teselaciones de Voronoi, son las generadas por funciones de distancias ponderadas con pesos (Aurenhammer y Edelsbrunner, 1984; Zou et al., 2024; Fan y Raichel, 2025). En particular, Bock y coautores (Bock et al., 2010), simulan la dinámica pluricelular en dos dimensiones, mostrando la viabilidad del método de Voronoi para generar formas celulares realistas. En dicho trabajo, utilizan funciones de distancia ponderada para definir celdas de Voronoi generalizadas, como base para la descripción de células dentro de tejidos epiteliales, representando las interacciones entre células mediante densidades de fuerza, adhesivas y repelentes, en los bordes de contacto celular. Esto motiva el interés en estudiar un modelado geométrico y dinámico que reproduzca las formas de las células observadas y simule su interacción y movimiento. En este trabajo presentamos una propuesta de formulación sencilla mediante el uso de una teselación de Voronoi

adecuadamente ponderada, incorporando, en algunos casos, la teoría y herramientas de LSIS.

El objetivo de este trabajo es modelar distintas etapas del ciclo celular con celdas de Voronoi. En particular, se realiza un modelo simplificado del nacimiento, movimiento y muerte celular, a través de diagramas de Voronoi, utilizando la teoría de análisis convexo y sistemas lineales semi-infinitos. En la próxima sección, veremos teoría asociada a celdas y diagramas de Voronoi, multifunciones y convergencias de Hausdorff y Kuratowski. Posteriormente, se modela matemáticamente las tres etapas del ciclo celular y se hace un análisis de convergencia de Kuratowski y Hausdorff. Finalmente, se realiza una breve conclusión.

2. Materiales y métodos

Para analizar la dinámica celular se utilizará un modelo basado en celdas de Voronoi. Dado un conjunto de sitios $T \subseteq \mathbb{R}^m$ que contiene al menos dos elementos, decimos que la celda de Voronoi de $s \in T$ es el conjunto de puntos que se encuentra más cerca del sitio s que del resto de los sitios en T , es decir:

$$V_T(s) := \{x \in \mathbb{R}^m : d(x, s) \leq d(x, T \setminus \{s\})\}, \quad (1)$$

donde $d(x, y) = \|x - y\|$ representa la distancia en \mathbb{R}^m dada por la norma euclídea $\|\cdot\|$ y $d(x, A) = \inf_{a \in A} d(x, a)$ es la distancia de un punto a un conjunto. El diagrama de Voronoi de T es la familia de celdas generadas por cada sitio s en T , e.d.: $Vor(T) := \{V_T(s) : s \in T\}$.

En algunos casos se utilizará la siguiente representación de la celda como conjunto solución de un sistema lineal de inecuaciones (Voigt, 2008):

$$V_T(s) := \left\{x \in \mathbb{R}^m : (t - s)^T x \leq \frac{\|t\|^2 - \|s\|^2}{2}, \quad t \in T\right\} \quad (2)$$

donde $x^T y$ representa el producto escalar usual. Esta representación lineal permite mostrar que, para T finito, $V_T(s)$ es un poliedro convexo cerrado (Goberna et al., 2012).

El modelo se basa en considerar una porción de tejido constituido por cierta cantidad de $r + 1$ de células, cada una de ellas será representada por una celda de Voronoi, donde los sitios simularán los núcleos de las células. Se considerará $T = \{s, t_1, t_2, \dots, t_r\} \subseteq \mathbb{R}^m$ al conjunto de sitios. Si bien todo el trabajo está desarrollado en un espacio genérico \mathbb{R}^m , la interpretación e implementación de las simulaciones están realizadas para $m = 2$, es decir, considerando un tejido bidimensional.

Para el movimiento celular, se simulará el movimiento de una única célula, a través del movimiento de su núcleo s y se supondrá que el resto de las r células restantes mantienen sus núcleos t_1, t_2, \dots, t_r , fijos, aunque su geometría se modificará en función de la célula que se mueve, como se muestran en los ejemplos de simulaciones realizados. Este movimiento será discreto, y se modela a través de una sucesión de sitios $\{s_n\}$ que convergen a una posición final s , es decir, $s_n \rightarrow s$ en \mathbb{R}^m . Como s es un punto aislado de T , se considera, sin pérdida de generalidad, que $s_n \notin T \setminus \{s\}$ para cada $n \in \mathbb{N}$.

Debido a que, al mover la célula, cambia el conjunto de sitios (núcleos) se define, además,

$$T' = T \setminus \{s\} \quad ; \quad T_n = T' \cup \{s_n\} \quad (3)$$

y la multifunción $\mathcal{V}: \mathbb{R}^m \rightrightarrows \mathbb{R}^m$, definida como:

$$\mathcal{V}(\bar{s}) := \left\{ x \in \mathbb{R}^m : (t - \bar{s})^T x \leq \frac{\|t\|^2 - \|s\|^2}{2}, \quad t \in T \setminus \{s\} \right\} \quad (4)$$

que modela la célula que se mueve, generada por el sitio \bar{s} , en reemplazo del sitio s .

Similarmente, para modelar el caso del nacimiento, en este caso, la mitosis, se parte del supuesto de que la célula que se reproduce es la celda con sitio s , y a partir de allí, la nueva celda (célula) se desplazará hasta finalizar en algún punto \bar{s} . Por lo tanto, se utiliza el mismo modelo que el del movimiento, pero se agrega un nuevo sitio al principio.

Para modelar la muerte celular, se aplica una nueva definición de celda, teniendo en cuenta la teoría de Nguyen et al. (2015), en donde se utilizan celdas de Voronoi con pesos. Para un conjunto de sitios T , se define la celda de Voronoi $V_T^\alpha(\bar{t})$ de $\bar{t} \in T$ con peso $\alpha \in [0,1]$ como al conjunto de puntos $x \in \mathbb{R}^m$ tal que:

$$\|x - \bar{t}\|^2 - \alpha \|\bar{t} - s\|^2 \leq \|x - t\|^2 - \alpha \|t - s\|^2, \quad (5)$$

Para todo $t \in T \setminus \{\bar{t}\}$. Se simula la muerte de una célula con núcleo en el sitio s aumentando el peso de las celdas vecinas, con las que $V_T(s)$ comparte caras, hasta que $V_T(s) = \{s\}$ y ahí, se puede considerar que dicha célula "ha muerto".

Para analizar cierta estabilidad en estos modelos, se estudia una propiedad cualitativa utilizando herramientas del análisis convexo en relación a la convergencia de conjuntos. Se muestra que, si el núcleo converge a un sitio fijo final, esto implica la convergencia de las células a la célula generada por el sitio final.

Este análisis se realizará utilizando la noción de excedente de un conjunto sobre otro y las

convergencias en sentido de Kuratowski y Hausdorff (Luchetti, 2006), que se definen a continuación:

Dados dos conjuntos cerrados no vacíos A y B , definimos el **excedente de A sobre B** como $e(A, B) := \sup_{a \in A} d(a, B)$, considerando $e(A, B) = \infty$ cuando $B = \emptyset$ y $A \neq \emptyset$.

Definición 1: (Convergencia de Hausdorff) Una sucesión $\{A_n\}$ de conjuntos cerrados en \mathbb{R}^m , converge en el sentido de Hausdorff al conjunto A , si $e(A_n, A) \rightarrow 0$ y $e(A, A_n) \rightarrow 0$, cuando $n \rightarrow \infty$. En este caso se utiliza la notación:

$$A_n \xrightarrow{H} A.$$

Definición 2: (Convergencia de Kuratowski) Una sucesión $\{A_n\}$ de conjuntos cerrados en \mathbb{R}^m , converge al conjunto A en el sentido de Kuratowski si

$$LsA_n \subseteq A \subseteq LiA_n,$$

donde LiA_n es el **límite inferior** de la sucesión, definido por:

$$LiA_n := \left\{ x \in \mathbb{R}^m : x = \lim_{k \rightarrow \infty} x_k; \quad x_k \in A_k, \quad k \geq N \right\},$$

para algún $N \in \mathbb{N}$ y LsA_n es el **límite superior** de la sucesión y está definido por:

$$LsA_n := \left\{ x \in \mathbb{R}^m : x = \lim_{k \rightarrow \infty} x_k; \quad x_k \in A_{n_k}; \quad \{n_k\} \subset \mathbb{N} \right\}.$$

En este caso se utiliza la notación: $A_n \xrightarrow{K} A$.

Para comparar resultados entre estas convergencias se utilizará la siguiente proposición (Ambrosio, 2004):

Proposición 1: Si A y A_n , $n \in \mathbb{N}$, son conjuntos cerrados en \mathbb{R}^m , entonces: $A_n \xrightarrow{H} A$ implica que: $A_n \xrightarrow{K} A$. El recíproco es verdadero si todos estos conjuntos son subconjuntos de un mismo conjunto compacto.

Finalmente, se utilizan implementaciones de Voronoi en el lenguaje Python para realizar las simulaciones en \mathbb{R}^2 . En particular se utiliza la biblioteca Scipy que incluye el cálculo de celdas de Voronoi a partir del software Qhull (Barber et. al, 1996).

3. Resultados y Discusión

Movimiento celular

Para simular el movimiento celular, debe demostrarse -utilizando celdas de Voronoi- que una celda puede desplazarse a otro sitio a través del tejido en el que se encuentra. En este caso, $\{s_n\}$ representa la posición que va tomando el núcleo de una célula a medida que se mueve hasta la posición

final s , y, de manera análoga, $V_{T_n}(s_n)$ representa la posición que va tomando la célula a medida que se mueve hasta la posición final $V_T(s)$, como lo muestra la siguiente proposición, en sentido de convergencia de Kuratowski.

Proposición 2: (Convergencia de Kuratowski para el movimiento celular). Sea $\{s_n\}$ una sucesión de puntos en \mathbb{R}^m y sean T' y T_n los conjuntos de sitios definidos en (3). Si $s_n \rightarrow s$, entonces

$$V_{T_n}(s_n) \xrightarrow{K} V_T(s).$$

Demostración. Observemos que de la ec. (1) se tiene que $V_T(s) := \{x \in \mathbb{R}^m : d(x, s) \leq d(x, T')\}$ y de (3),

$$\begin{aligned} V_{T_n}(s_n) &= \{x \in \mathbb{R}^m : d(x, s_n) \leq d(x, T_n \setminus \{s_n\})\} \\ &= \{x \in \mathbb{R}^m : d(x, s_n) \leq d(x, T')\}. \end{aligned} \quad (6)$$

Consideremos los límites inferior y superior:

$$LiV_{T_n}(s_n) = \left\{x \in \mathbb{R}^m : x = \lim_{n \rightarrow \infty} x_n, x_n \in V_{T_n}(s_n), n \geq N_0\right\},$$

para algún $N_0 \in \mathbb{N}$, y

$$LsV_{T_n}(s_n) = \{x \in \mathbb{R}^m : x = \lim_{k \rightarrow \infty} x_k, x_k \in V_{T_{n_k}}(s_{n_k}), \{n_k\} \subset \mathbb{N}\}$$

Se demostrará que $V_T(s) \subseteq LiV_{T_n}(s_n)$: Sea $a \in V_T(s)$, para cada $n \in \mathbb{N}$, se toma $a_n \in V_{T_n}(s_n)$ tal que $d(a, a_n) = d(a, V_{T_n}(s_n))$. Tal a_n existe porque $V_{T_n}(s_n)$ es cerrado, convexo y no vacío.

Si $\{a_n\}_{n \in \mathbb{N}}$ no converge a a cuando $n \rightarrow \infty$, entonces existe $\varepsilon > 0$ y una subsucesión $\{s_{n_k}\}$ tal que $d(a, V_{T_{n_k}}(s_{n_k})) > \varepsilon$. Como $s_n \rightarrow s$, entonces $s_{n_k} \rightarrow s$ cuando $k \rightarrow \infty$. Además, $B_\varepsilon(a) \cap V_{T_{n_k}}(s_{n_k}) = \emptyset$, para todo $k \in \mathbb{N}$.

Si se define la multifunción $\mathcal{V} : \mathbb{R}^m \rightrightarrows \mathbb{R}^m$ como en (4), aplicando el Teorema 1 de Goberna et al. 2012, se tiene que \mathcal{V} es semicontinua inferiormente en s , ya que s es un punto aislado de T . Como $B_\varepsilon(a) \cap V_T(s) \neq \emptyset$, existe un abierto W tal que $s \in W$ y $B_\varepsilon(a) \cap \mathcal{V}(v) \neq \emptyset$, para todo $v \in W$. Del hecho de que $s_{n_k} \rightarrow s$, existe $n \in \mathbb{N}$ tal que si $k > N$, entonces $s_{n_k} \in W$. Luego, $B_\varepsilon(a) \cap \mathcal{V}(s_{n_k}) = B_\varepsilon(a) \cap V_{T_{n_k}}(s_{n_k}) \neq \emptyset$, lo cual es absurdo. Esta contradicción implica que $a_n \rightarrow a$. Así, $a \in LiV_{T_n}(s_n)$ y, por lo tanto, $V_T(s) \subseteq LiV_{T_n}(s_n)$.

Se mostrará ahora que $LsV_{T_n}(s_n) \subseteq V_T(s)$: Sea $a \in LsV_{T_n}(s_n)$. Entonces, existe una sucesión $\{a_k\}_k \in \mathbb{N} \subseteq \mathbb{R}^n$ tal que $a_k \rightarrow a$ y $a_k \in V_{T_{n_k}}(s_{n_k})$, donde $\{n_k\}$ es una subsucesión de enteros. Se quiere

probar que $a \in V_T(s)$, es decir, que $d(a, s) \leq d(a, T')$.

Como $\{s_{n_k}\}_{n_k \in \mathbb{N}}$ es una subsucesión de $\{s_n\}_{n \in \mathbb{N}}$, y $s_n \rightarrow s$, entonces $s_{n_k} \rightarrow s$. Además, como $a_k \in V_{T_{n_k}}(s_{n_k})$, se tiene que $d(a_k, s_{n_k}) \leq d(a_k, T')$. Así, dado $\varepsilon > 0$, existe $N \in \mathbb{N}$ tal que si $k \geq N$ entonces: $d(a, a_k) < \frac{\varepsilon}{2}$ y $d(s_{n_k}, s) < \frac{\varepsilon}{2}$.

Luego,

$$\begin{aligned} d(a, s) &\leq d(a, a_k) + d(a_k, s_{n_k}) + d(s_{n_k}, s) \\ &< \varepsilon + d(a_k, T'), \end{aligned}$$

para todo $k > N$. Como $d(a_k, T') \rightarrow d(a, T')$ cuando $k \rightarrow \infty$, se obtiene que $d(a, s) < \varepsilon + d(a, T')$, para todo $\varepsilon > 0$. Esto implica que $d(a, s) \leq d(a, T')$. Luego, $a \in V_T(s)$ y, por lo tanto, $LsV_{T_n}(s_n) \subseteq V_T(s)$.

Se ha probado así que $LsV_{T_n}(s_n) \subseteq V_T(s) \subseteq LiV_{T_n}(s_n)$ y, por Definición 2, se tiene que

$$V_{T_n}(s_n) \xrightarrow{K} V_T(s).$$

Para que las celdas de Voronoi converjan en sentido Hausdorff, por Definición 1, debe cumplirse que: $e(V_T(s), V_{T_n}(s_n)) \rightarrow 0$, y $e(V_{T_n}(s_n), V_T(s)) \rightarrow 0$, para todo que $n \in \mathbb{N}$.

Esto se cumple bajo el supuesto de que las celdas estén en un dominio compacto, como se muestra en la Proposición 2. El siguiente ejemplo muestra que, sin esta hipótesis, no se puede garantizar la convergencia de Hausdorff.

Ejemplo 1: Sea $T = \{a, s, b\} \subset \mathbb{R}^2$, donde:

$a = (-2, 0)$, $s = (0, 0)$ y $b = (2, 0)$ (ver Figura 1).

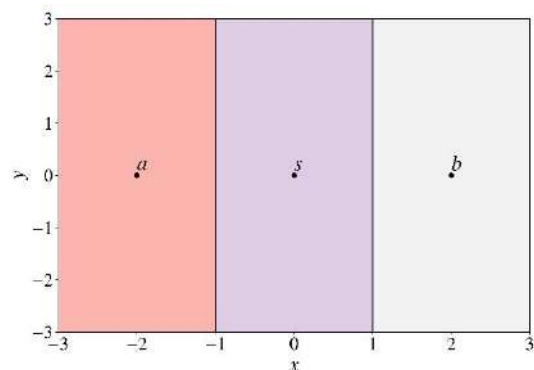


Figura 1. Diagrama de Voronoi de $T = \{a, s, b\}$.

Sea $\{s_n\}_{n \in \mathbb{N}} \subset \mathbb{R}^2$ una sucesión definida por $s_n = (0, \frac{1}{n})$. Sea $T_n = \{a, (0, \frac{1}{n}), b\}$. Es claro que $s_n \rightarrow s$. La recta que une los puntos b y s_n , está dada por:

$\hat{y}_n(x) = -\frac{1}{2n}x + \frac{1}{n}$ y la mediatriz entre el segmento que une los puntos b y s_n , es decir, la cara que comparten las celdas $V_{T_n}(b)$ y $V_{T_n}(s_n)$, está dada por: $y_n(x) = 2n(x-1) + \frac{1}{2n}$, tal como lo muestra la Figura 2.

Dado que $V_T(s) = \{(x, y) \in \mathbb{R}^2: -1 \leq x \leq 1\}$, si $(n, y) \in V_{T_n}(s_n)$, con $n \in \mathbb{N}$, entonces:

$$e(V_{T_n}(s_n), V_T(s)) \geq d((x, y), V_T(s)) = |x-1| = n-1$$

Luego $e(V_{T_n}(s_n), V_T(s)) \rightarrow \infty$ cuando $n \rightarrow \infty$. Por lo tanto, $V_{T_n}(s_n)$ no converge en sentido Hausdorff a $V_T(s)$, aunque $s_n \rightarrow s$ (ver Figura 3)

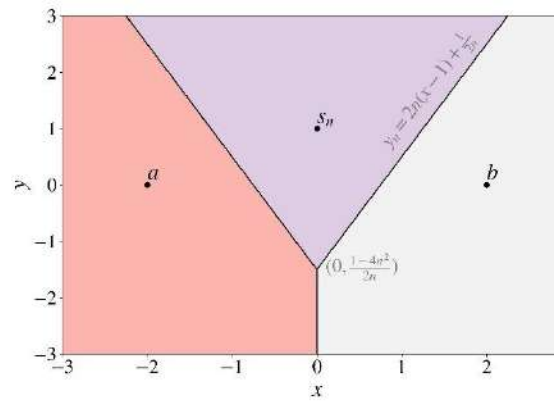


Figura 2. Diagrama de Voronoi de $T_n = \{a, s_n, b\}$. Nótese que a partir del punto $(0, \frac{1-4n^2}{2n})$, cuando $x \geq 0$, la cara común de las celdas $V_{T_n}(s_n)$ y $V_{T_n}(b)$ coincide con la mediatriz del segmento s_nb .

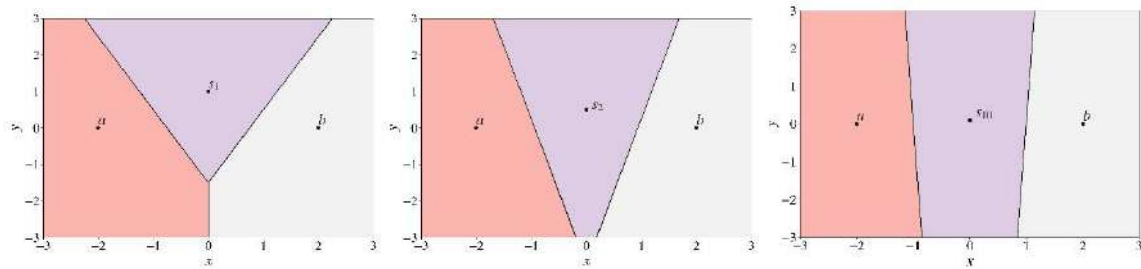


Figura 3. Diagramas de Voronoi de T_n para T_1, T_2 y T_{10} . Puede observarse (de izquierda a derecha) que la celda generada por el sitio s_n (lila claro) no converge a la celda generada por s , aunque $s_n \rightarrow s$.

El ejemplo anterior muestra la necesidad de agregar la hipótesis de que las celdas estén contenidas en un conjunto compacto E . Si esto no ocurriese, se toma $V_T(s) \cap E$ y $V_{T_n}(s_n) \cap E$. Esta hipótesis, no representa un inconveniente en el modelo de la dinámica celular, ya que E puede representar una porción de tejido.

Proposición 3: (Convergencia de Hausdorff en el movimiento celular). Sea $E \subseteq \mathbb{R}^m$ compacto, de modo que $V_T(s) \subseteq E$ y $V_{T_n}(s_n) \subseteq E$, para cada $n \in \mathbb{N}$. Si $s_n \rightarrow s$, entonces $V_{T_n}(s_n)$ converge en sentido de Hausdorff a $V_T(s)$.

Demostración. De la Proposición 2, se obtiene que $V_{T_n}(s_n)$ converge en sentido de Kuratowski a $V_T(s)$ y por Proposición 2, esto implica que $V_{T_n}(s_n)$

converge en sentido de Hausdorff a $V_T(s)$, ya que $V_T(s)$ y $V_{T_n}(s_n)$ son conjuntos cerrados dentro de un compacto, para todo $n \in \mathbb{N}$.

División celular

Para modelar la división celular, en este caso, la mitosis, se considera que la célula que se reproduce es la celda con sitio s (que representa ahora el primer elemento de la sucesión $\{s_n\}$). A partir de allí, la nueva celda se desplazará hasta finalizar en algún punto \bar{s} (ver Figura 4). Por lo tanto, se aplica el modelo del movimiento al conjunto de sitios $\bar{T} = T \cup \{\bar{s}\}$, donde \bar{s} es el límite de la sucesión $\{s_n\}$ y $s_1 = s$, dando en este caso, $\bar{T}_1 = T$, $\bar{T}' = \bar{T} \setminus \{\bar{s}\} = T$ y $\bar{T}_n = \bar{T}' \cup \{s_n\} = T \cup \{s_n\}$.

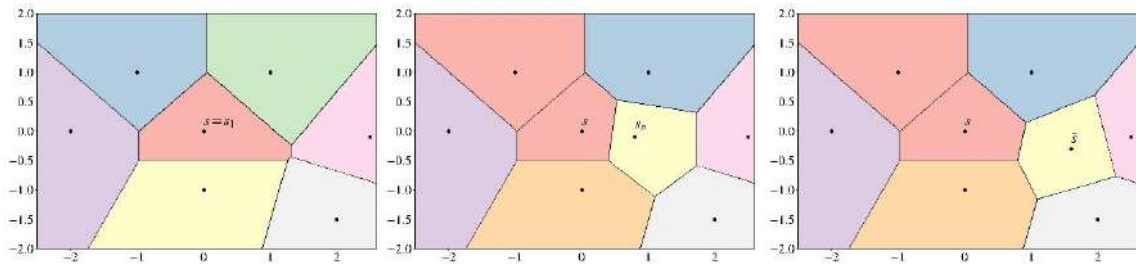


Figura 4. Diagramas de Voronoi de la división celular. Puede observarse (de izquierda a derecha) la división de la celda con sitio s (rosa) tras la aparición de una nueva celda con sitio s_n (amarillo) que converge a la posición final \bar{s} .

Proposición 4: (Convergencia de Kuratowski para la división celular). Sea $\bar{s} \in \mathbb{R}^m$, $\bar{T} = T \cup \{\bar{s}\}$ y $\bar{T}_n = T \cup \{s_n\}$ para todo $n \in \mathbb{N}$. Si $\{s_n\}$ es una sucesión en \mathbb{R}^m tal que $s_1 = s$ y $s_n \rightarrow \bar{s}$, entonces $V_{\bar{T}_n}(s_n)$ converge en sentido de Kuratowski a $V_{\bar{T}}(\bar{s})$.

Se puede observar en la Figura que si no tomamos $\bar{s} \in \text{int conv } T'$, el análisis no tiene sentido biológico, ya que el tamaño de la célula aumenta demasiado apenas se divide.

Demostración. Se aplica directamente la Proposición 2 al conjunto $\bar{T} = T \cup \{\bar{s}\}$. Por lo tanto $V_{\bar{T}_n}(s_n) \xrightarrow{K} V_{\bar{T}}(\bar{s})$.

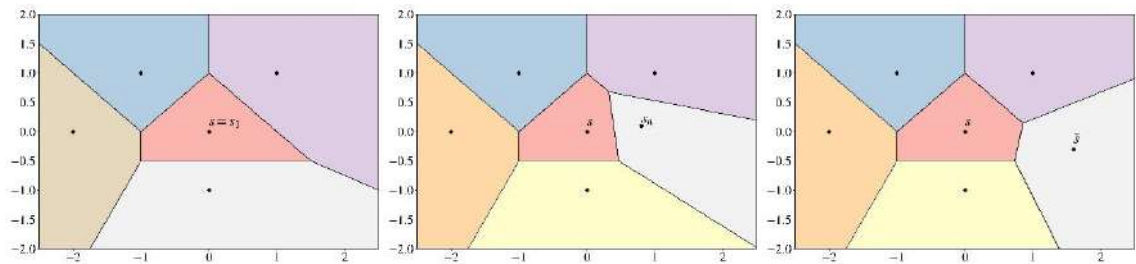


Figura 5. Diagramas de Voronoi de la división si $\bar{s} \notin \text{int conv } T'$. Puede observarse (de izquierda a derecha) la división de la celda con sitio s (rosa) y la aparición de una nueva celda con sitio s_n (gris) de gran tamaño que converge a la posición final \bar{s} .

Proposición 5: (Convergencia de Hausdorff en la división celular). Sea $E \subseteq \mathbb{R}^m$ compacto, de modo que $V_{\bar{T}}(\bar{s}) \subseteq E$ y $V_{\bar{T}_n}(s_n) \subseteq E$, para todo $n \in \mathbb{N}$. Si $s_n \rightarrow \bar{s}$, entonces $V_{\bar{T}_n}(s_n)$ converge en sentido de Hausdorff a $V_{\bar{T}}(\bar{s})$.

Demostración. Si se considera la sucesión $\{s_n\}$ a partir de $n = 2$, y como E es compacto, el análisis es equivalente al movimiento celular, sustituyendo T por \bar{T} , T' por T y T_n por $\bar{T}_n = T \cup \{s_n\}$, por lo que, aplicando la Proposición 2, $V_{\bar{T}_n}(s_n) \xrightarrow{H} V_{\bar{T}}(\bar{s})$.

Muerte celular

Finalmente, en esta última etapa, se considera la muerte celular como una célula que se une a otra y, así, disminuir en uno la cantidad de sitios. Es decir, hacer $s_n \rightarrow s$ sin retirar a s del conjunto T_n . Sin embargo, este tipo de razonamiento no garantiza la convergencia en sentido Hausdorff de las células, como lo muestra el siguiente ejemplo.

Ejemplo 2: Sean $T = \{(0,0), (-1,1), (1,1)\}$ y $\hat{T}_n = T \cup \{(0, -\frac{1}{n})\}$, $n \in \mathbb{N}$ conjuntos de sitios en el conjunto compacto $E = [-2,2] \times [-2,2] \subset \mathbb{R}^2$. Se considera $s = (0,0)$ y $s_n = (0, -\frac{1}{n})$, para cada

$n \in \mathbb{N}$. Es claro que $s_n \rightarrow s$. Además $(0,1) \in V_{\hat{T}_n}(s)$ y $1 < d((0,1), V_{\hat{T}_n}(s_n)) \leq e(V_T(s), V_{\hat{T}_n}(s_n))$, para todo $n \in \mathbb{N}$. Por lo tanto, $e(V_T(s), V_{\hat{T}_n}(s_n)) \not\rightarrow 0$ y

así $V_{\hat{T}_n}(s_n)$ no converge en sentido Hausdorff a $V_T(s)$, como se visualiza en la Figura 6, donde el diagrama realiza un cambio brusco cuando alcanza el límite.

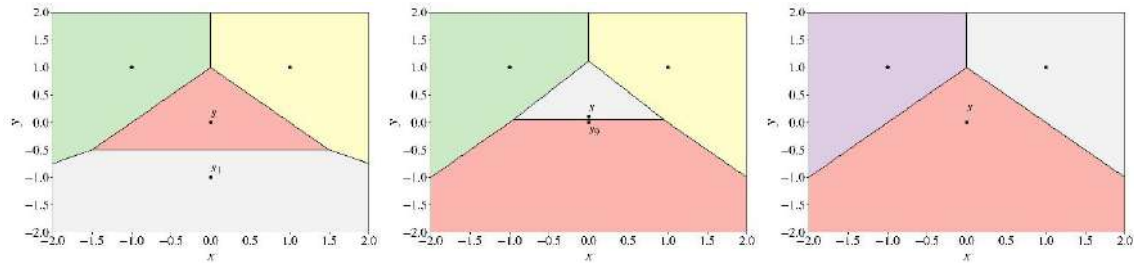


Figura 6. Diagramas de Voronoi en \mathbb{R}^2 de \hat{T}_n , para \hat{T}_1, \hat{T}_9 y en el límite T . Se puede observar (de izquierda a derecha) como la celda $V_{\hat{T}_n}(s_n)$ no converge en sentido Hausdorff a $V_T(s)$.

Por este motivo, para modelar la muerte celular, se utiliza la generalización de celdas de Voronoi con peso α , definida en (3), para $\alpha \in [0,1]$ y $\bar{t} \in T$. Con los mismos argumentos dados por Voigt, 2008 para obtener la representación dada en (2) se obtiene que $V_T^\alpha(\bar{t})$ es el conjunto de puntos $x \in \mathbb{R}^m$ tale que:

$$x^T(t - \bar{t}) \frac{1 - \alpha}{2} (\|t\|^2 - \|\bar{t}\|^2) + \alpha s^T(t - \bar{t}), t \in T \quad (7)$$

Con esta nueva definición y, teniendo en cuenta que por (7), las celdas mantienen sus propiedades de linealidad y convexidad, se modela la muerte de la célula con núcleo en el sitio s aumentando el peso α en las celdas vecinas hasta lograr que $V_T(s) = \{s\}$, como se observa en la Figura .

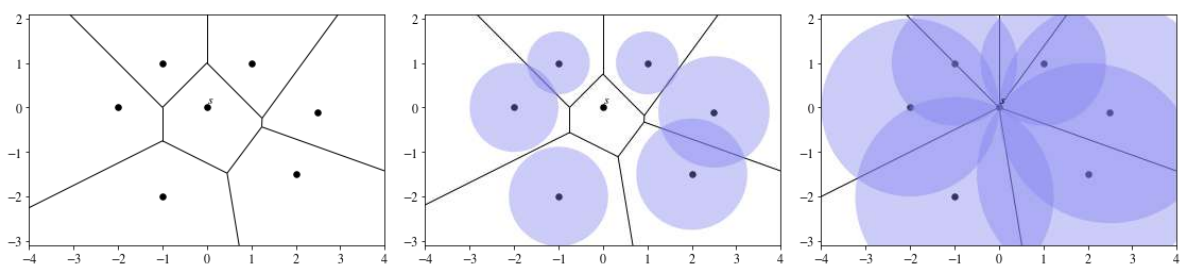


Figura 7. Diagramas de Voronoi con peso α_n , para T en \mathbb{R}^2 , simulando la muerte celular, para $\alpha_n = 1 - \frac{1}{n}$ con $n = 1$ (izquierda), $n = 2$ (centro) y cuando $n \rightarrow \infty$ (derecha).

Proposición 6: (Convergencia de Kuratowski para muerte celular). Sean $s \in \text{int conv } T'$ y sea $V_T^{\alpha_n}(s)$ la celda definida en (5) con $\bar{t} = s$ y $\alpha_n = 1 - \frac{1}{n}$, para cada $n \in \mathbb{N}$. Entonces, $V_T^{\alpha_n}(s)$ converge en sentido de Kuratowski a $\{s\}$.

Demostración. En primer lugar, de (5), se tiene que $V_T^{\alpha_n}(s)$ es el conjunto de puntos $x \in \mathbb{R}^m$ tales que

$$\|x - s\|^2 \leq \|x - t\|^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) \|s - t\|^2,$$

para todo $t \in T'$. De Definición 2, los límites $LiV_T^{\alpha_n}(s)$ y $LsV_T^{\alpha_n}(s)$ para $\{V_T^{\alpha_n}(s)\}$ son:

$$\{x \in \mathbb{R}^m: x = \lim_{n \rightarrow \infty} x_n, x_n \in V_T^{\alpha_n}(s), n \geq N\}$$

para algún $N \in \mathbb{N}$, y

$$\{x \in \mathbb{R}^m: x = \lim_{n \rightarrow \infty} x_k, x_k \in V_T^{\alpha_{n_k}}(s), \{n_k\} \subset \mathbb{N}\},$$

Respectivamente. Se demostrará que $\{s\} \subseteq LiV_T^{\alpha_n}(s)$: Claramente $s \in V_T^{\alpha_n}(s)$ para todo $n \in \mathbb{N}$. Sea $a_n = s$ para todo $n \in \mathbb{N}$. Entonces, a_n converge a s y $a_n \in V_T^{\alpha_n}(s)$, para todo $n \in \mathbb{N}$. Luego, $s \in LiV_T^{\alpha_n}(s)$, y así, $\{s\} \subseteq LiV_T^{\alpha_n}(s)$.

Se verá ahora que $LsV_T^{\alpha_n}(s) \subseteq \{s\}$: Sea $a \in LsV_T^{\alpha_n}(s)$. Entonces, existe una subsucesión $\{n_k\}$ tal que $x_{n_k} \in V_T^{\alpha_{n_k}}(s)$ y $x_{n_k} \rightarrow a$. Como $x_{n_k} \in V_T^{\alpha_{n_k}}(s)$ entonces, sustituyendo α_n por $(1 - \frac{1}{n_k})$ en (7), se tiene que

$$x_{n_k}^T(t-s) \leq \frac{1}{2n_k} (\|t\|^2 - \|s\|^2) + \left(1 - \frac{1}{n_k}\right) s^T(t-s)$$

luego,

$$x_{n_k}^T(t-s) - s^T t + \|s\|^2 \leq \frac{1}{2n_k} (\|t\|^2 + \|s\|^2 - s^T t),$$

$$(x_{n_k} - s)^T(t-s) \leq \frac{1}{2n_k} (\|t\|^2 - 2s^T t + \|s\|^2).$$

$$(x_{n_k} - s)^T(t-s) \leq \frac{1}{2n_k} \|t-s\|^2.$$

Luego, cuando $n_k \rightarrow \infty$, $(a-s)^T(t-s) \leq 0$, para todo $t \in T'$.

Sea $w \in \text{conv } T'$. Entonces, existen escalares $\beta_t > 0$, $t \in T'$ tales que $\sum_{t \in T'} \beta_t = 1$ y $w = \sum_{t \in T'} \beta_t t$. Luego,

$$\begin{aligned} (a-s)^T(w-s) &= (a-s)^T \left(\sum_{t \in T'} \beta_t t - s \right) \\ &= \sum_{t \in T'} \beta_t (t-s)^T (a-s) \\ &= \sum_{t \in T'} \beta_t (a-s)^T(t-s) \leq 0. \end{aligned}$$

Así, $(a-s)^T(w-s) \leq 0$, para todo $t \in \text{conv } T'$.

Por hipótesis, $s \in \text{int conv } T'$, luego existe $\varepsilon > 0$ tal que $s + \varepsilon z \in \text{conv } T'$ y $s - \varepsilon z \in \text{conv } T'$, para cada $z \in B_1(0_n)$. Si se considera $w = s + \varepsilon z$, entonces

$$\begin{aligned} (a-s)^T(s + \varepsilon z - s) &= (a-s)^T(\varepsilon z) \\ &= \varepsilon(a-s)^T z \\ &\leq 0. \end{aligned} \quad (8)$$

Ahora, si se considera $w = s - \varepsilon z$, entonces

$$\begin{aligned} (a-s)^T(s - \varepsilon z - s) &= (a-s)^T(-\varepsilon z) \\ &= -\varepsilon(a-s)^T z \\ &\leq 0. \end{aligned} \quad (9)$$

Por (8) y (9), se tiene que $(a-s)^T z = 0$, para todo $z \in B_1(0_n)$. En particular, si $z = \frac{a-s}{\|a-s\|}$, entonces $(a-s)^T \frac{a-s}{\|a-s\|} = \|a-s\| = 0$, y así, $a = s$. Por lo tanto, $LsV_T^{\alpha_n}(s) \subseteq \{s\}$.

Se ha probado así, que $V_T^{\alpha_n}(s) \xrightarrow{K} \{s\}$.

Para analizar la convergencia de Hausdorff, al igual que en los dos casos anteriores, se agrega el supuesto de que las celdas estén contenidas en un conjunto compacto E , si esto no ocurriese, se toma $V_T^{\alpha_n}(s) \cap E$.

Proposición 3.2.6 (Convergencia de Hausdorff para muerte celular) Sea $E \subseteq \mathbb{R}^m$ compacto, de modo que $V_T^n(s) \subseteq E$, para todo $n \in \mathbb{N}$, y se supone $s \in \text{int conv } T'$. Entonces, $V_T^{\alpha_n}(s)$ converge en sentido de Hausdorff a $\{s\}$.

Demostración. Si bien se puede utilizar la Proposición 1 para realizar esta demostración, se hará una demostración alternativa.

Según Definición 1 se debe demostrar que

$$e(\{s\}, V_T^{\alpha_n}(s)) \rightarrow 0 \quad \text{y} \quad e(V_T^{\alpha_n}(s), \{s\}) \rightarrow 0.$$

Se mostrará primero que $e(V_T^{\alpha_n}(s), \{s\}) \rightarrow 0$: Sea $x_n \in V_T^{\alpha_n}(s)$ tal que $d(x_n, s) = e(V_T^{\alpha_n}(s), \{s\})$. Como E es compacto, existe $\bar{x} \in E$ y una subsucesión $\{x_{n_k}\}$ tal que $x_{n_k} \rightarrow \bar{x} \in E$. Por proposición 6, $V_T^{\alpha_n}(s) \xrightarrow{K} \{s\}$, entonces $\bar{x} \in LsV_T^{\alpha_n}(s) \subseteq \{s\}$. Es decir, $\bar{x} = s$. Así, dado $\varepsilon > 0$, existe $N \in \mathbb{N}$ tal que si $k > N$, entonces $d(x_{n_k}, s) < \varepsilon$.

Del hecho de que $\|x - t\|^2 - \left(1 - \frac{1}{n+1}\right) \|s - t\|^2$ es menor o igual a $\|x - t\|^2 - \left(1 - \frac{1}{n}\right) \|s - t\|^2$, se obtiene que $V_T^{\alpha_{n+1}}(s) \subseteq V_T^{\alpha_n}(s)$. Por lo tanto, $e(V_T^{\alpha_{n+1}}(s), \{s\}) \leq e(V_T^{\alpha_n}(s), \{s\})$. Luego, para cada n tal que $n > n_k$, con $k > N$, se cumple que

$$e(V_T^{\alpha_n}(s), \{s\}) \leq e(V_T^{\alpha_{n_k}}(s), \{s\}) = d(x_{n_k}, s) < \varepsilon.$$

Luego, $e(V_T^{\alpha n}(s), \{s\}) \rightarrow 0$.

Se verá ahora que $e(\{s\}, V_T^{\alpha n}(s)) \rightarrow 0$: Esto se deduce de que $s \in V_T^{\alpha n}(s)$ para todo $n \in \mathbb{N}$, lo que

4. Conclusiones

Los resultados presentados permiten interpretar los fenómenos de movimiento, la división (mitosis) y muerte celular desde una perspectiva geométrica basada en la teoría de celdas de Voronoi y las nociones de convergencia de Kuratowski y Hausdorff.

En el caso del movimiento celular, se demostró que, si el núcleo de una célula se desplaza según una sucesión de puntos que converge a una posición fija dentro de un dominio compacto, entonces la correspondiente celda de Voronoi también converge en sentido de Kuratowski y Hausdorff. Este resultado no solo valida el uso de diagramas de Voronoi para simular dinámicas celulares, sino que también proporciona una base teórica sólida para asegurar la estabilidad del modelo ante desplazamientos discretos de los núcleos celulares. Este fenómeno -el desplazamiento de una célula a través de un tejido- puede observarse, por ejemplo, en la cicatrización del epitelio, donde los fibroblastos migran hacia la zona lesionada para generar nuevo tejido conectivo.

Para el fenómeno la división celular, se modeló la mitosis como la adición de un nuevo sitio al conjunto de generadores. Al establecer que este nuevo sitio converge a una posición límite dentro del dominio, se logró demostrar la convergencia en ambos sentidos (Kuratowski y Hausdorff). Esta formalización se puede utilizar para describir procesos de proliferación celular, como la regeneración de tejidos o el crecimiento tumoral, en los que la estructura espacial de las células juega un rol central.

El análisis de la muerte celular fue más desafiante, ya que la simple eliminación de un sitio no garantiza convergencia. Para resolver esto, se introdujo una nueva definición de celdas de Voronoi con peso, en donde se aumenta progresivamente el peso de las celdas contiguas a la celda que se desea eliminar, hasta que su dimensión tiende a cero, simulando así una célula cuyo volumen tiende a cero. Este enfoque no solo permite modelar el proceso de muerte celular desde una perspectiva geométrica, sino que también asegura la continuidad del sistema en términos topológicos, algo que no era posible en el modelo clásico. Se trata, por lo tanto, de una

implica que $e(\{s\}, V_T^{\alpha n}(s)) = 0$, para todo $n \in \mathbb{N}$. Por lo tanto, $V_T^{\alpha n}(s) \xrightarrow{H} \{s\}$.

propuesta original que puede ser útil en contextos en los que es necesario simular muertes celulares programadas, como la apoptosis o ciertos procesos de remodelación tisular.

En conjunto, estos resultados muestran que las nociones de convergencia de conjuntos aplicadas a celdas de Voronoi permiten formalizar y simular dinámicas celulares complejas con precisión matemática. Las propiedades de linealidad, convexidad y continuidad de las celdas juegan un papel central en esta construcción, y su preservación bajo ciertos supuestos garantiza la validez del modelo.

Como línea futura, se propone ampliar el marco teórico a espacios tridimensionales y explorar condiciones más generales de convergencia, así como integrar este enfoque en sistemas computacionales que permitan validar los modelos con datos empíricos o experimentales.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Cuyo (SIIP 06/80020240100387UN, SIIP 06/80020240400087UN) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero que hizo posible la realización de este trabajo.

6. Referencias

- Ambrosio, L.; Tilli, P. (2004). Topics on analysis in metric spaces. Oxford University Press, USA.
- Aurenhammer, F.; Edelsbrunner, H. (1984). An optimal algorithm for constructing the weighted Voronoi diagram in the plane. Pattern recognition, 17(2), 251-257.
- Barber, C. B.; Dobkin, D. P.; Huhdanpaa, H. (1996). The quickhull algorithm for convex hulls. ACM Transactions on Mathematical Software, 22(4), 469-483.
- Bock, M.; Tyagi, A.K.; Kreft, JU.; Alt, W. (2010). Generalized Voronoi Tessellation as a Model of Two-dimensional Cell Tissue

- Dynamics. Bull. Math. Biol. 72, 1696–1731.
- Brillouin, L. (1930). Les électrons dans les métaux et le classement des ondes de de Broglie correspondantes. C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 191, 292.
- Delaunay, B. (1934). Sur la sphère vide. A la mémoire de Georges Voronoi. Bulletin de l'Académie des Sciences de l'URSS., 6, 793-800.
- Descartes, R. (1656). Renati Des-Cartes Principia philosophiae. Amstelodami, apud Johannem Jansonium Juniores.
- Dirichlet, G.L. (1850). Über die Reduction der positiven quadratischen Formen mit drei unbestimmten ganzen Zahlen. Journal für die reine und angewandte Mathematik 40, 209-227.
- Fan, C., Raichel, B. (2025). Linear Expected Complexity for Directional and Multiplicative Voronoi Diagrams. Discrete Comput Geom 73, 1–24
- Goberna, M.; Rodríguez, M.; Vera de Serio, V. (2012). Voronoi cells of arbitrary sets via linear inequality systems. Linear Algebra Appl, 436, 2169-2186.
- Lucchetti, R. (2006). Convexity and Well-Posed Problems. Springer New York.
- Nguyen, N. A.; Olaru, S.; Rodríguez-Ayerbe, P. (2015). Recognition of additively weighted Voronoi diagrams and weighted Delaunay decompositions. European Control Conference (ECC), 328-333.
- Preparata, F. P.; Shamos, M. I. (1985). Computational geometry: an introduction. New York.
- Ridolfi, A. B., Vera de Serio, V. N. (2023). A Radius of Robust Feasibility for Uncertain Farthest Voronoi Cells. Set-Valued and Variational Analysis, 31(1), 11.
- Thiessen, A.H., (1911). Precipitation averages for large areas. Mont. Weather Rev. 39, 1082-1084.
- Voronoi, G. (1908). Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques. Deuxième mémoire. Recherches sur les parallélogrammes primitifs. Journal für die reine und angewandte Mathematik 134, 198-287.
- Voigt, I. K. (2008). Voronoizellen diskreter Punktmengen, Ph.D. thesis, TU Dortmund University, Faculty of Mathematics, Dortmund.
- Wigner, E.; Seitz, F. (1933). On the constitution of metallic sodium. Phys. Rev. 43, 804-810.
- Zou, S., Gong, H., Gao, J. Zhou, L. (2024). Simulation of cells mechanical responses during perfusion culture in Voronoi-lattice scaffolds using multiphase FSI model. Acta Mech. Sin. 40, 624031.

7. Anexos

Celdas sin peso: A continuación, se presenta el código en Python utilizado para generar celdas de Voronoi sin peso, a partir de un conjunto de sitios definidos manualmente. El código permite graficar las regiones resultantes y exportar la imagen generada en alta resolución.

```
import numpy as np
from matplotlib import pyplot as plt
from scipy.spatial import distance
import matplotlib
matplotlib.rcParams['mathtext.fontset'] = 'stix'
matplotlib.rcParams['font.family'] = 'STIXGeneral'

sitios = np.array([[0.3,0],[-1,1],[1,1],[-2,0],[0,-1],[2.5,-0.1],
                  [2,-1.5], [-1.5,-1.75]])
#se colocan las coordenadas de los sitios

x = np.linspace(-2.5,2.5,1000)
y = np.linspace(-2,2,1000)
x,y = np.meshgrid(x,y)

points = np.stack((x.ravel(), y.ravel()), axis=1)

distances = distance.cdist(points, sitios)

celdas = np.argmin(distances,axis=1).reshape(x.shape)

plt.figure(figsize=(10,7))
plt.contour(celdas, extent=(-2.5, 2.6, -2, 2),linewidths=1, colors='k')

plt.contourf(celdas, extent=(-2.5,2.6,-2,2),cmap="Pastel1")

plt.scatter(sitios[:, 0], sitios[:, 1],marker='o', s=40,color='k')

plt.xticks(size=24)
plt.yticks(size=24)

plt.text(0.3,0.1,'$ V_{T}(s)$', fontsize = 28)

plt.tight_layout()
plt.savefig('Imagen1-4.jpg',dpi=300)
```

Celdas con peso: El siguiente script permite generar celdas de Voronoi con peso, simulando la desaparición progresiva de una célula. Este modelo fue adaptado a partir de un repositorio en línea y modificado para ajustarse al enfoque propuesto en este trabajo:

<https://gist.github.com/sunayana/a3a564058e97752f726ca65d56fab529>.

```
import itertools
import numpy
from scipy.spatial import ConvexHull
from scipy.spatial import distance
from matplotlib.collections import LineCollection
from matplotlib import pyplot as plot
import matplotlib
matplotlib.rcParams['mathtext.fontset'] = 'stix'
matplotlib.rcParams['font.family'] = 'STIXGeneral'

def disc_uniform_pick(N):
    angle = (2 * numpy.pi) * numpy.random.random(N)
    out = numpy.stack([numpy.cos(angle), numpy.sin(angle)], axis = 1)
    out *= numpy.sqrt(numpy.random.random(N))[:,None]
    return out

def norm2(X):
    return numpy.sqrt(numpy.sum(X ** 2))

def normalized(X):
    return X / norm2(X)

def get_triangle_normal(A, B, C):
    return normalized(numpy.cross(A,B) + numpy.cross(B, C) + numpy.cross(C, A))

def get_power_circumcenter(A, B, C):
    N = get_triangle_normal(A, B, C)
    return (-.5 / N[2]) * N[:2]

def is_ccw_triangle(A, B, C):
    M = numpy.concatenate([numpy.stack([A, B, C]), numpy.ones((3, 1))], axis = 1)
    return numpy.linalg.det(M) > 0

def get_power_triangulation(S, R):
    S_norm = numpy.sum(S ** 2, axis = 1) - R ** 2
    S_lifted = numpy.concatenate([S, S_norm[:,None]], axis = 1)
    if S.shape[0] == 3:
        if is_ccw_triangle(S[0], S[1], S[2]):
```

```
        return [[0, 1, 2]], numpy.array([get_power_circumcenter(*S_lifted)])
    else:
        return [[0, 2, 1]], numpy.array([get_power_circumcenter(*S_lifted)])

    hull = ConvexHull(S_lifted)

    tri_list = tuple([a, b, c] if is_ccw_triangle(S[a], S[b], S[c]) else [a, c, b] for (a, b, c), eq in zip(hull.simplices, hull.equations) if eq[2] <= 0)

    V = numpy.array([get_power_circumcenter(*S_lifted[tri]) for tri in tri_list])

    return tri_list, V

def get_voronoi_cells(S, V, tri_list):
    vertices_set = frozenset(itertools.chain(*tri_list))
    edge_map = { }
    for i, tri in enumerate(tri_list):
        for edge in itertools.combinations(tri, 2):
            edge = tuple(sorted(edge))
            if edge in edge_map:
                edge_map[edge].append(i)
            else:
                edge_map[edge] = [i]
    voronoi_cell_map = { i : [] for i in vertices_set }
    for i, (a, b, c) in enumerate(tri_list):
        for u, v, w in ((a, b, c), (b, c, a), (c, a, b)):
            edge = tuple(sorted((u, v)))
            if len(edge_map[edge]) == 2:
                j, k = edge_map[edge]
                if k == i:
                    j, k = k, j
                    U = V[k] - V[j]
                    U_norm = norm2(U)
                    voronoi_cell_map[u].append(((j, k), (V[j], U / U_norm, 0, U_norm)))
            else:
                A, B, C, D = S[u], S[v], S[w], V[i]
                U = normalized(B - A)
                I = A + numpy.dot(D - A, U) * U
                W = normalized(I - D)
                if numpy.dot(W, I - C) < 0:
                    W = -W
```

```

        voronoi_cell_map[u].append(((edge_m
ap[edge][0], -1), (D, W, 0,
None)))
        voronoi_cell_map[v].append((-1,
edge_map[edge][0]), (D, -W, None,
0)))

def order_segment_list(segment_list):
    first = min((seg[0][0], i) for i, seg
in enumerate(segment_list))[1]
    segment_list[0],
    segment_list[first] =
    segment_list[first],
    segment_list[0]
    for i in range(len(segment_list) - 1):
        for j in range(i + 1,
len(segment_list)):
            if segment_list[i][0][1] ==
segment_list[j][0][0]:
                segment_list[i+1],
segment_list[j] =
segment_list[j],
segment_list[i+1]
                break
    return segment_list
    return {i :
order_segment_list(segment_list) for i,
segment_list in
voronoi_cell_map.items() }

def display(S, R, tri_list,
voronoi_cell_map):
    fig, ax = plot.subplots()
    plot.axis('equal')
    plot.xlim(-4,4)
    plot.xticks(size=12)
    plot.yticks(size=12)
    for Si, Ri in zip(S, R):
        ax.add_artist(
            plot.Circle(Si, Ri, fill = True,
alpha = .4, lw = 0.,
color = '#8080f0', zorder = 1))
        plot.scatter(S[:, 0], S[:,
1], marker='o', s=30, color='k')
        plot.text(0,0.1, '$s$', fontsize =
12)
        edge_map = { }

        for segment_list in
voronoi_cell_map.values():
            for edge, (A, U, tmin, tmax) in
segment_list:
                edge = tuple(sorted(edge))
                if edge not in edge_map:
                    if tmax is None:
                        tmax = 10
                    if tmin is None:
                        tmin = -10
                    edge_map[edge] = (A + tmin
* U, A + tmax * U)
                line_list =
LineCollection(edge_map.values(), lw = 1.,
colors = 'k')
                line_list.set_zorder(0)
                ax.add_collection(line_list)

        plot.savefig('Muerte_pesos_cuadrado
s_5.jpg', dpi=300)
        plot.show()

def main():
    sample_count = 7
    S = numpy.array([[0,0],
[-1,1],[1,1],[-2,0],
[-1,-2],[2.5,-0.1],
[2,-1.5]])
    s = numpy.array([S[0]])
    alpha = 0.999
    weight = alpha *
(distance.cdist(S,s))
    R = weight.flatten()
    print(R)

    tri_list, V =
get_power_triangulation(S, R)

    voronoi_cell_map =
get_voronoi_cells(S, V, tri_list)

    display(S, R, tri_list,
voronoi_cell_map)

if __name__ == '__main__':    main()

```