



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Extracción de biomacromoléculas de tejidos vegetales para su
aplicación en el campo de los retardadores del fuego

Alumna: Jeniffer Antje Wilckens Buchheister

Profesores Guía: Francesca Bosco
Giulio Malucelli

2016

Resumen

La resistencia a las llamas es una característica importante relativa a la seguridad de los materiales, entre los cuales se pueden considerar las telas. Algunas de estas telas, tanto naturales como sintéticas, presentan características intrínsecas de resistencia al fuego, debido a las fibras que las componen, mientras que otras pueden ser tratadas para adquirir esta propiedad.

Entre los tratamientos que se pueden realizar se encuentran aquellos con retardadores del fuego tradicionales, algunos de los cuales, particularmente aquellos halogenados, han demostrado una notoria toxicidad, tanto para humanos como para el medio ambiente. Por este motivo, en los últimos años se ha buscado la sustitución de estos compuestos halogenados con nuevos compuestos menos nocivos, como lo son los compuestos fosforados.

Recientemente se ha descubierto que algunas biomacromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas, presentan propiedades de resistencia a las llamas cuando son aplicadas sobre tejidos de algodón. Estas biomacromoléculas contienen algunos de los elementos o compuestos presentes en los retardadores del fuego tradicionales. Los estudios que han sido realizados hasta el momento han utilizado principalmente ADN y proteínas de uso comercial que se caracterizan por un alto nivel de pureza, su disponibilidad en pequeñas cantidades a costos muy elevados y normalmente usadas con fines analíticos. Dado que la aplicación a las telas requiere cantidades más bien grandes de estas biomacromoléculas, una alternativa más económica a estos productos comerciales viene presentada por la extracción de ácidos nucleicos y proteínas de residuos de la industria alimentaria. En este contexto, en el presente trabajo de tesis fue decidido utilizar residuos de naturaleza vegetal para la extracción de éstas moléculas.

Las técnicas tradicionales de extracción de ácidos nucleicos de matrices vegetales son bastante similares entre sí. En general, las cantidades de material tratado son pequeñas, los protocolos de extracción más bien complejos, los reactivos usados de alta pureza y por lo mismo caros y a veces también incluso tóxicos. Por estos motivos, estos protocolos no resultan adecuados para el objetivo de este trabajo. Se encontró en literatura un método de extracción simple y económico que reúne las condiciones deseadas, en base al cual se definió el protocolo para la extracción de biomacromoléculas de residuos vegetales, escrito en el presente trabajo de investigación.

El proceso de extracción consiste en un pretratamiento de la matriz vegetal, constituida de dos fases de trituración, seguidas de una fase de extracción en buffer. Luego se realiza una fase de recuperación del extracto mediante una precipitación en etanol, a la cual sigue una centrifugación y resuspensión del extracto en agua destilada.

En primera instancia se evaluó la aplicabilidad del método realizando una extracción de ácidos nucleicos de residuos de piña, de donde se obtuvieron resultados de extracción muy bajos, probablemente relacionados con la presencia de otros componentes de la materia prima. Se realizó consecuentemente la optimización de los parámetros fundamentales del proceso de extracción en residuos de vegetales mixtos y también verduras de hoja. Fue evaluada la influencia de la modalidad de conservación de matriz (fresca o congelada), de la temperatura de precipitación (4°C y -21°C), la proporción “peso seco de la matriz vegetal: peso del buffer” (1:7; 1:10,5 y 1:14) y también el grado de pureza del etanol usado durante la precipitación.

Definidos los parámetros óptimos, se realizó un escalamiento del proceso: se aumentó 5 veces la cantidad de material sometido a la extracción (de 40 g a 200 g), manteniendo constante la proporción “peso seco de la matriz: peso del buffer”. Posteriormente se evaluó también la posibilidad de reducir el tiempo destinado a la precipitación en etanol (de 15 h inicialmente a 4 h o menos). Cabe destacar que en los extractos también existe un nivel de proteínas, que no fueron removidas ya que presentan un efecto positivo en el retardo a las llamas.

El extracto obtenido de las verduras de hoja fue utilizado para impregnar trozos de algodón, que luego fueron sometidos a pruebas de resistencia al fuego. Los resultados obtenidos de estas pruebas no fueron exactamente los esperados, ya que las muestras se quemaron casi completamente aunque a una velocidad menor que el algodón sin tratar.

En este trabajo de tesis fue posible el desarrollo y la optimización de un método de extracción de ácidos nucleicos de residuos vegetales para su aplicación en el campo de los retardantes del fuego. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron tal como esperados por lo que sería necesario realizar pruebas adicionales y reducir componentes contaminantes del extracto, cuya presencia podría estar influyendo negativamente en el efecto deseado de resistencia a la combustión de la tela.

Este proyecto no lo podría haber llevado a cabo sin la formación que me ha sido entregada por la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Profesores y compañeros fueron esenciales para lograr tanto una sólida formación en el área de la ingeniería y como en las áreas de las ciencias naturales y la experiencia de trabajos en laboratorio, dándome una preparación bastante particular.

Asimismo, quiero agradecer a los profesores del *Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia* del Politecnico di Torino, quienes me ampliaron la visión respecto de la ingeniería química y de los alimentos, tomando de la vasta experiencia que existe en Italia. En particular, quiero agradecer a la Dra. Chiara Mollea y a la candidata a Dra. Annalisa Casale por su guía y apoyo durante las largas horas en los laboratorios. Su disponibilidad a responder preguntas y en la corrección de los reportes escritos fue de gran ayuda. También quiero recordar y agradecer la guía de la profesora Dra. Francesca Bosco.

Claramente, todo aquello que he logrado hasta este punto ha sido posible gracias al constante e inalterable apoyo de mis padres, quienes han estado conmigo, sea presencialmente o por teléfono, durante toda mi vida, apoyando mis decisiones y también consolándome en los momentos de fracaso, incluso en esta etapa a distancias enormes. Su ejemplo de resolución, responsabilidad y humildad me será de una guía durante toda mi vida. Mis hermanas, compartiendo buenos y malos momentos, siempre dispuestas a escucharme cuando las necesité de lejos.

Esta larga estadía en Italia no la habría podido sobrellevar sin las nuevas amistades forjadas. Gente de distintas costumbres, países y lenguas, compartiendo el deseo de finalizar estos estudios con éxito y poder volver a sus casas al completar esta carrera: Marisol, Malvina, Lorenzo, Jonathan, Salvatore y Miguel. Siempre dispuestos a apoyar con material de estudio, formas de estudio, trámites del Politecnico, y también, muy importante, acompañar durante una pausa para ir a tomarse un *caffè*. Tampoco quiero olvidar a Paul, Ivan, Beatrice y los otros miembros de la *Chiesa Evangelica Riformata*, todos los cuales hicieron de mi estadía en Turín mucho menos lejana de casa.

Finalmente, me gustaría agradecer a mi mejor amigo y novio, Francisco, con quién planificamos esta aventura desde el principio, tal vez sin dimensionar correctamente la escala de este desafío. Su compañía durante los momentos felices, y especialmente los tristes, en estos últimos dos años, fue de suma importancia. Espero que después de esta aventura, sean muchas más, juntos.

Gracias al Señor, pues ha hecho todo esto posible.

ÍNDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Objetivos del proyecto.....	3
1.2	Retardadores del fuego tradicionales.....	4
1.2.1	Retardadores de la llama inorgánicos.....	5
1.2.2	Retardadores de la llama halogenados.....	5
1.2.3	Retardadores de la llama a base de fósforo.	6
1.2.4	Retardadores del fuego a base de nitrógeno.	7
1.2.5	Sistemas con comportamiento intumescente.....	7
1.2.6	Preocupaciones sanitarias y ambientales.	7
1.3	ADN y proteínas como agentes de retardo del fuego.....	11
1.4	Ácidos nucleicos y proteínas de residuos vegetales.	12
1.5	Técnicas de extracción de ácidos nucleicos.	16
2	Materiales y Métodos.	21
2.1	Descripción de los residuos.....	21
2.2	Pretratamiento.....	22
2.2.1	Trituración primaria.....	23
2.2.2	Trituración secundaria.	23
2.3	Extracción.....	24
2.4	Recuperación del extracto.	25
2.4.1	Filtración.....	25
2.4.2	Precipitación en etanol y recuperación.....	26
2.4.3	Centrifugación y resuspensión del pellet.....	28
2.5	Diagrama del proceso de extracción.....	28
2.6	Impregnación de telas de fibra natural.	30
2.7	Técnicas analíticas.....	30
2.7.1	Peso seco.	30
2.7.2	Determinación de ácidos nucleicos: concentración y pureza.....	31
2.7.3	Determinación de proteínas.....	32
2.7.4	Pruebas de resistencia al fuego.....	33
3	Resultados y Discusiones.	34
3.1	Extracción de tejidos de piña.....	34

3.1.1 Extracción de pulpa, cáscara y hojas.....	35
3.2 Extracción de tejidos de vegetales mixtos.....	38
3.2.1 Efecto de la temperatura durante la precipitación de los ácidos nucleicos.	39
3.2.2 Efecto de la proporción “DW matriz: peso del buffer”.....	41
3.3 Extracción de tejidos vegetales mixtos II y verduras de hoja.....	50
3.3.1 Efecto de las condiciones de almacenaje de la matriz vegetal: fresco o congelado.	51
3.3.3 Efecto de la pureza del etanol.....	55
3.4 Extracción escalada de hojas de ensalada.....	58
3.4.1 Evaluación del comportamiento térmico durante el escalamiento.	59
3.4.2. Extracción escalada.	61
3.4.3 Efecto de la duración de la precipitación en etanol.	63
3.5 Resistencia al fuego de muestras de tela tratada.....	66
4 Conclusiones.....	69
5 Referencias Bibliográficas.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Composición de frutas y verduras	13
Tabla 1.2: Composición de 100 g de materia vegetal fresca	15
Tabla 1.3: Composición de las hojas de lechuga cada 100 g.	16
Tabla 3.1: Peso seco por cada 100 g de tejido de piña fresco.	34
Tabla 3.2: Pureza de los AN, concentración y rendimiento de la extracción de la piña.	36
Tabla 3.3: Peso seco verduras mixtas respecto de 100 g de material fresco.	39
Tabla 3.4: Efecto de la temperatura de precipitación	40
Tabla 3.5: Efecto de las diversas proporciones de “peso seco inicial: peso buffer”.	43
Tabla 3.6: Efecto de la filtración del extracto	46
Tabla 3.7: Contenido de proteínas de las muestras pre y post filtración.	49
Tabla 3.8: Peso seco para 100 g de material fresco.	51
Tabla 3.9: Efecto del tratamiento inicial de la matriz	53
Tabla 3.10: Efecto de la pureza del etanol.	56
Tabla 3.11: Efecto del escalamiento.	62
Tabla 3.12: Efecto de la duración de la fase de precipitación.	64
Tabla 3.13: Pruebas de resistencia al fuego.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Muestras durante la fase de trituración.	23
Figura 2.2: Tubos falcon y vasos precipitados durante la incubación.	25
Figura 2.3: Muestras durante la filtración.	26
Figura 2.4: Tubos durante la fase de precipitación.	27
Figura 2.5: Diagrama del proceso desarrollado para la extracción.	29
Figura 3.1: Rendimientos obtenidos de diversos tipos de tejido de piña.	38
Figura 3.2: Rendimiento de AN a diversas temperaturas de precipitación.	41
Figura 3.3: Rendimiento de AN usando diversas proporciones de peso seco vegetal: peso buffer.	45
Figura 3.4: Rendimientos medios de AN obtenidos antes y después de la filtración.	47
Figura 3.5: Estándar de BSA utilizado para la cuantificación de proteínas con el método de Bradford.	48
Figura 3.6: Contenidos proteicos medios pre y post filtración.	50
Figura 3.7: Influencia del pre-tratamiento en el rendimiento de AN.	55
Figura 3.8: Rendimiento de AN obtenidos usando etanol con diversos grados de pureza.	58
Figura 3.9: Tendencia de calentamiento de muestras de verduras de hoja de diversas dimensiones a varias temperaturas del baño de agua.	60
Figura 3.10: Rendimientos de AN obtenidos a diversa escala.	63
Figura 3.11: Rendimientos medios de AN obtenidos con diversos tiempos de precipitación.	65
Figura 3.12: Trozos de algodón impregnados con el extracto de hojas de ensalada, sobre una hoja de papel.	66
Figura 3.13: Residuos de tela de algodón después de las pruebas de Resistencia al fuego.	68

1 INTRODUCCIÓN

Entre las medidas de seguridad importantes tanto en ambientes industriales como cotidianos, se puede considerar la característica de resistencia al fuego o a las llamas. Ésta es una característica que puede ser observada en numerosas construcciones, particularmente, edificios públicos, industrias y medios de transporte, por mencionar algunos. Las características ignífugas o resistencia al fuego pueden ser vistas tanto en el diseño mismo del edificio como en los materiales utilizados para su construcción, confiriéndoles los más altos estándares de seguridad posibles.

Cuando se habla de los materiales utilizados, se puede considerar una amplia variedad de ellos, comenzando con aquellos que constituyen las murallas y puertas de un edificio llegando a aquellos materiales presentes durante el la habitación del mismo edificio, sea de tipo civil o industrial.

Un tipo de material presente con bastante frecuencia producto del uso de un edificio, son las telas que pueden ser partes constituyentes del interior del mismo, tales como cortinajes, o aquellos utilizados como vestimenta por los trabajadores o habitantes del edificio en cuestión. Como fue dicho previamente, una medida de seguridad para este tipo de materiales, es considerar su grado de inflamabilidad o, aún más específico, la ausencia de ésta, lo cual es una característica de gran importancia. En estos casos, las telas presentes deben tener características retardadoras del fuego, la cual es la propiedad de los textiles de resistir la combustión espontánea cuando hay fuentes de calor cercanas o, para el caso de contacto con una llama, la capacidad de reducir la velocidad de la combustión. La reducción de la velocidad de combustión permite ganar tiempo para apagar el fuego externamente y, en algunos casos, se logra una detención de la combustión sin necesidad de la acción de agentes externos. Cuando un material se apaga sin la interferencia de externos, éste se considera auto-extinguible.

En relación a la composición de los textiles, éstos pueden estar compuestos por fibras naturales, las cuales, por lo general no tienden a fundirse. La lana y la seda son difíciles de encender, se queman lentamente y frecuentemente son auto-extinguibles, mientras que los tejidos de algodón y lino suelen encenderse rápidamente con llamas de propagación veloz.

Las fibras sintéticas constituyen un gran grupo de tejidos que se caracterizan por comportamientos muy variados: algunos presentan una alta resistencia a las llamas, otros pueden ser lentos para prenderse en llamas, y otros aún pueden ser auto-extinguibles, pero la gran mayoría presenta como característica que una vez encendidos, se funden en lugar de arder o llamear, presentando como consecuencia un alto riesgo de quemaduras severas cuando entran en contacto con la piel. En algunos casos, durante la fundición cuando entran en contacto con otros materiales inflamables pueden intensificar la propagación de las llamas.

Cuando las telas contienen combinaciones de fibras naturales y sintéticas, las propiedades que presentan dependen del tipo particular de fibra y sus proporciones, pero muchas veces tienden combinar sus peores características: encendido y propagación veloces con fusión del material.

Tomando en consideración todo lo previamente mencionado, la tarea de encontrar un textil ideal que presente las características de seguridad más altas posibles ha sido una constante para científicos e investigadores.

La inflamabilidad de fibras naturales puede ser reducida por medio de tratamientos tópicos con productos químicos retardadores del fuego después de su manufactura.

Tejidos sintéticos pueden ser diseñados resistentes a las llamas por diversos medios:

- Mediante la fabricación, utilizando fibras en las cuales las propiedades retardadoras a las llamas han sido incorporadas en su estructura molecular durante su síntesis.
- A través de tratamientos químicos de los tejidos durante el proceso de manufactura.

- Por tratamientos tópicos con productos químicos luego de la fabricación, tal como se realiza con los tejidos de fibras naturales.

1.1 OBJETIVOS DEL PROYECTO.

Las telas pueden ser diseñadas resistentes al fuego por medio de tratamientos con diversos compuestos químicos, y es algo que ya se ha hecho por al menos 50 años con métodos y compuestos químicos “tradicionales”, pero en los últimos años se ha comenzado a hacer también con productos no tradicionales, que han sido exitosos en sus fases experimentales.

Los productos no tradicionales que han sido utilizados son principalmente biomacromoléculas, específicamente ácidos nucleicos y proteínas provenientes de diversas fuentes, lo que significa que, en teoría, se pueden obtener de cualquier material biológico. En la práctica, esto no es totalmente cierto, ya que los sistemas biológicos son complejos y sus componentes no se encuentran naturalmente en condiciones puras o aisladas. Esto implica que al trabajar con materiales biológicos, un compuesto específicamente deseado debe ser previamente extraído y aislado o purificado.

Para este trabajo, se decidió extraer y recuperar biomacromoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) de células vegetales, de manera de probarlas como posibles agentes retardadores del fuego. Esto implica encontrar una fuente apropiada y un proceso de extracción y recuperación adecuado.

El mayor reto del presente proyecto es la selección de la matriz vegetal de desecho más apropiada para la extracción y recuperación de los ácidos nucleicos y proteínas.

Mientras tanto, simultáneamente, es crucial el desarrollo de un protocolo de extracción adecuado, ya que aquellos encontrados en literatura ninguno cumplía con los requerimientos

de simplicidad, duración del proceso, cantidad de material tratado y el uso mínimo de solventes tóxicos y/o de alto costo.

1.2 RETARDADORES DEL FUEGO TRADICIONALES.

El rol que cumple un retardador de las llamas es aquel de interrumpir el ciclo de la combustión al reducir la velocidad de los procesos químicos y físicos que se producen durante la misma.

Los retardadores de fuego existentes actualmente presentan una amplia gama de mecanismos de acción, que independientemente de éstos mismos, tienen como fin último la reducción de la velocidad de transferencia de calor hacia el polímero, lo que sólo es aplicable en las etapas iniciales de un incendio, cuando la cantidad total de calor es reducida. En la situación que el fuego presente expansión a altas velocidades, la combustión ya no puede ser interrumpida, sino solamente contenida.

Actualmente, los retardadores de llama para telas se clasifican en cinco grupos principales:

1. Productos inorgánicos.
2. Productos halogenados, principalmente clorados y bromados.
3. Productos organofosforados.
4. Productos nitrogenados.
5. Sistemas con comportamiento intumescente.

Los tres primeros grupos mencionados abarcan el 95% de los retardadores de las llamas producidos y utilizados a nivel mundial.

1.2.1 Retardadores de la llama inorgánicos.

Algunos de los compuestos inorgánicos utilizados como retardadores del fuego actúan interfiriendo físicamente en el proceso de la combustión al liberar moléculas de agua u otros gases no inflamables, diluyendo aquellos que nutren la combustión, absorbiendo energía térmica enfriando el material que se está quemando, o produciendo una capa de óxido no inflamable en la superficie del material.

Estos mecanismos recién mencionados suelen presentar bajos desempeños, por lo que este tipo de compuestos requieren un uso en altas concentraciones o en combinación con diversos tipos de retardadores del fuego. Compuestos que forman parte de este grupo son:

1. Trióxido de aluminio, el cual presenta los tres tipos de mecanismos previamente mencionados: a temperaturas cercanas a los 200°C se descompone en óxido de aluminio y agua, formando una capa protectora y disminuyendo la generación de humo.
2. Trióxido de antimonio, compuesto de alta efectividad cuando es combinado con retardadores de las llamas halogenados, ya que cataliza su descomposición a radicales libres.
3. Hidróxido de magnesio, actúa bajo los mismos mecanismos del trióxido de aluminio, con la diferencia que se descompone a temperaturas más altas, cercanas a los 300°C.
4. Compuestos al boro, éstos actúan liberando moléculas de agua en una reacción endotérmica de dos pasos y formando una capa aislante en la superficie del material tratado.

1.2.2 Retardadores de la llama halogenados.

Los compuestos halogenados que actúan como retardadores del fuego presentan alta efectividad al remover de la fase gaseosa los radicales \dot{H} y \dot{OH} , los cuales son responsables de la combustión. En teoría, compuestos que presenten cualquiera de los cuatro elementos halógenos pueden ser utilizados como retardadores del fuego, pero en la práctica ni el flúor ni

el yodo pueden ser empleados efectivamente, quedando disponibles solamente el cloro y el bromo, como los elementos posibles a utilizar. Sus mecanismos de acción pueden ser descritos a grandes rasgos de la siguiente manera: una vez que la molécula del compuesto ha sido expuesta a las altas temperaturas, se libera el halógeno en forma de radical libre que reacciona con el gas combustible (un hidrocarburo, típicamente) generando un ácido, que a su vez reacciona con los radicales \dot{H} y $\dot{O}H$, produciendo agua y otros radicales, los cuales están libres para comenzar nuevos ciclos de remoción radicalaria. La eficiencia de los retardadores de llamas halogenados depende directamente de la cantidad de átomos halógenos presentes en la molécula del compuesto y su velocidad de liberación desde la misma.

Aparte del efecto de intercepción de radicales libres, los retardadores del fuego bromados también actúan mediante algunos de los mecanismos físicos antes mencionados: el HBr es un gas no combustible de alto peso que interfiere con el ingreso del oxígeno a la zona de combustión al tiempo que cataliza las reacciones de descomposición que generan la carbonización de la superficie (char).

Sin embargo, los compuestos halogenados presentan como gran desventaja la alta toxicidad de los compuestos que se producen y liberan durante sus reacciones, siendo esto conocido desde la década de 1960, cuando una serie de episodios destacó sus potenciales riesgos con fuertes impactos ecológicos.

1.2.3 Retardadores de la llama a base de fósforo.

Los retardadores a las llamas a base de fósforo suelen tener niveles de eficiencia menores a los presentados por los compuestos halogenados, sin embargo han comenzado a ganar importancia en la última década debido al creciente interés de disminuir la aplicación de sistemas libres de halógenos. Las moléculas orgánicas con fósforo que se utilizan para estos fines son altamente complejas y presentan gran variabilidad de estructuras (como por ejemplo: alquil- y arilfosfatos, fosfonatos, etc.) mientras que los compuestos inorgánicos a base de fósforo más empleados son el fósforo rojo y el polifosfato de amonio. Estos compuestos a base

de fósforo actúan tanto en la fase gaseosa como en la condensada estabilizando los radicales \dot{H} y \dot{OH} o produciendo ácidos fosfóricos que modifican los mecanismos de degradación térmica del material que se está quemando, lo que lleva a la generación de capas carbonizadas térmicamente estables. En consecuencia, la cantidad presente de compuestos volátiles combustibles y el calor absorbidos por el material, se ven reducidos significativamente.

1.2.4 Retardadores del fuego a base de nitrógeno.

Los retardadores del fuego a base de nitrógeno son un pequeño grupo respecto de los anteriormente mencionados que vale la pena destacar. Actúan mediante la formación de estructuras moleculares con el material tratado que inhibe su descomposición a compuestos volátiles inflamables, mientras que liberan gases inertes que diluyen aquellos combustibles. Actualmente, los más utilizados de estos compuestos son aquellos a base de melamina, cuya descomposición produce amoníaco y compuestos cíclicos, que constituyen las capas externas de las capas carbonizadas.

1.2.5 Sistemas con comportamiento intumescente.

Este tipo de protección consiste en el recubrimiento de la superficie de un material con una capa que lo protege de las altas temperaturas que se alcanzan en un incendio. Los recubrimientos que se aplican a la superficie de los materiales, se obtienen combinando un ácido inorgánico (o su precursor directo) con un compuesto orgánico polihidroxiado y un compuesto orgánico nitrogenado (normalmente aminas o amidas). La deshidratación del compuesto polihidroxiado por acción del ácido produce su hinchazón, mientras que la deshidratación de los compuestos nitrogenados libera compuestos volátiles que complementan los mecanismos de protección. (Gigli & Rosace, 2013)

1.2.6 Preocupaciones sanitarias y ambientales.

Los principales compuestos que dan lugar a preocupaciones entre los retardadores del fuego tradicionales son los halogenados, en particular, aquellos que contienen cloro:

policlorobifenilos (PCB). Éstos fueron ampliamente utilizados durante la década de 1960, y posteriormente fueron sustituidos por compuestos bromados. No se hará ninguna referencia adicional a estos compuestos clorados, debido a que no siguen siendo utilizados en la actualidad.

Dado que los compuestos bromados sustituyeron a los clorados como los retardadores de llamas halogenados de mayor utilización y se encuentran en circulación ya por un periodo de tiempo significativo, han sido objeto de numerosas investigaciones y estudios de modo de determinar tanto su impacto ambiental como sus efectos en la salud humana. Simultáneamente, el interés por la reducción del uso de agentes de retardo del fuego halogenados, ha incrementado el uso y comercialización de aquellos a base de fósforo, lo que, consecuentemente, desplaza o incrementa la atención respecto de su inocuidad o idoneidad relativa al uso a gran escala hacia éstos. Es por esta misma razón que este capítulo está enfocado en estos dos tipos particulares de compuestos retardadores de la llama.

Los retardadores del fuego bromados comenzaron a ser producidos comercialmente en la década de 1970, principalmente en forma de polibromodifenil éteres (PBDE).

En el medio ambiente, los PBDE parecen ser inertes. Normalmente ingresan al ambiente a través del aire, en el cual permanecen suspendidos como partículas durante un tiempo indeterminado, y eventualmente, vuelven a tierra y agua por asentamiento con partículas de polvo a las cuales tienden a unirse fuertemente. Los PBDE no se disuelven fácilmente en el agua, por lo que en ambientes acuosos también tienden a adherirse a otras partículas con las cuales sedimentan. En consecuencia, los sedimentos en el fondo de cuerpos de agua tienden a ser reservorios de PBDE, donde pueden permanecer por años, dado que su descomposición es un proceso bastante lento. Por otro lado, se ha visto PBDE con bajos contenidos de bromo pueden acumularse en los tejidos de animales marinos. (ATSDR, 2004).

En particular, se ha visto que los PBDE tienden a presentarse en concentraciones más elevadas en los tejidos de peces grasos. En 2009, un reporte de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica de los Estados Unidos (NOAA, por sus siglas en inglés) mencionó que mediciones para PBDE realizadas en tejidos de diferentes bivalvos mostraron concentraciones

en el rango de 1-270 ppb referidas a la masa lipídica, la cual fue clasificada en niveles medios. Niveles medios y altos de PBDE suelen estar fuertemente relacionados a la presencia y actividades humanas: a mayores niveles de industrialización y densidad poblacional, mayores son los niveles observados de estos contaminantes. (Kimbrough et al, 2009)

Los PBDE se acumulan en los organismos y se amplifican a lo largo de las cadenas tróficas marinas, las cuales, en la mayoría de los casos terminan en el ser humano (Wan et al., 2008). Los niveles de PBDE en la población general resultan de la exposición al polvo de interiores y alimentos contaminados (Hites, 2004).

Respecto a los efectos en la salud de los PBDE en seres humanos, la información que se tiene no es definitiva, pero algunos estudios sugieren que los PBDE menores (con menor contenido de bromo) presentan niveles de toxicidad mayores que los PBDE mayores (con mayor contenido del mismo). Algunos estudios realizados en animales, principalmente ratas y ratones, han demostrado que la exposición a PBDE está asociada a trastornos tiroideos. Por ahora no se han observados malformaciones embrionarias o fetales, pero se requieren estudios adicionales relativos a los efectos reproductivos de estos compuestos. Tampoco se conocen con certeza los efectos cancerígenos que podrían tener los PBDE en los seres humanos, pero se ha observado que ratones expuestos a niveles elevados de PBDE mayores en la alimentación, desarrollaron tumores hepáticos, mientras que PBDE menores aún no han sido estudiados respecto de sus efectos cancerígenos (ATDSR, 2004)

Los retardadores de fuego a base de fósforo, al igual que los agentes de retardo de la llama halogenados, son aditivos y no se unen químicamente al producto final, lo que puede significar una fácil y rápida liberación al medio (Rodríguez et al., 2006). Ha sido posible identificar estos compuestos en diversas condiciones: como parte del aire de interiores, polvo doméstico, agua potable, sedimentos y biota. En estudios experimentales realizados por Regnery y Püttmann (2010), fue observado que algunos de estos compuestos, particularmente los retardadores del fuego a base de fósforo no halogenados, presentan una veloz degradación por parte de la luz solar, mientras que otros, como los agentes de retardo del fuego al fósforo

clorados, parecen ser resistentes a la foto-degradación, lo que lleva a la conclusión que se acumulan a lo largo de las cadenas tróficas.

Nuevamente para este caso, la mayoría de datos toxicológicos disponibles son resultados obtenidos con estudios realizados en animales, los cuales han demostrado que la mayoría de organofosforados presentan fuertes efectos hemolíticos. Reportes existentes relativos a efectos en humanos, indican los mismos efectos hemolíticos y también ciertos efectos reproductivos (Latendresse et al., 1994; Chapin et al., 1997). Uno de los compuestos fosforados no halógenos más problemáticos parece ser el trifenilfosfato (TPhP), el cual ha visto como causante de dermatitis por contacto (Camarasa and Serra-Baldrich, 1992), afectando el sistema de defensa inmunológico (Saboori et al., 1991) y también como causante de toxicidad aguda en organismos acuáticos (peces, camarones y *daphnia*) (Leisewitz et al., 2000).

Entre los retardadores del fuego al fósforo halogenados se puede considerar el tri(cloropropil)fosfato (TCPP) como un potencial cancerígeno (Ni et al., 2007); el tri(2-cloroetil)fosfato (TCEP) como tóxico para los animales (OMS, 1998) y neurotóxico para ratas y ratones (Tilson et al., 1990; Umezu et al., 1998), por mencionar algunos de estos compuestos y sus efectos conocidos.

Cabe destacar que todos estos agentes de retardo a las llamas fueron estudiados y probados individualmente, y para muchos de ellos, no existen o son insuficientes los datos en literatura respecto de los niveles de concentración en el medio ambiente, obstaculizando significativamente la evaluación de su real impacto en la salud humana. Sin embargo, la mayoría de los estudios destaca el hecho que los retardadores del fuego al fósforo no halogenados son más seguros de usar como sustitutos de los retardadores de fuego bromados (van der Veen & de Boer, 2012).

1.3 ADN Y PROTEÍNAS COMO AGENTES DE RETARDO DEL FUEGO.

De los capítulos anteriores, es posible deducir que tanto los procesos químicos de obtención de los compuestos de acción retardadora de las llamas como los procesos de tratamiento de los materiales no suelen caracterizarse por ser amigables con el medio ambiente. Por esta razón, ya por varios años se han estado buscando alternativas viables de manera de reducir el impacto ambiental y a la salud humana de los retardadores de las llamas. Tomando en consideración estos antecedentes, en los últimos años se ha descubierto que las biomacromoléculas, como compuestos químicos de ocurrencia natural, presentan el potencial de cumplir con estos requisitos. Las biomacromoléculas en cuestión son particularmente los ácidos nucleicos y las proteínas, las cuales han demostrado tener propiedades de retardo al fuego.

Investigaciones recientes han mostrado que el ADN es capaz de aumentar la estabilidad térmica de tejidos de algodón, esto debido a que contiene los tres principales componentes normalmente presentes en las clásicas formulaciones de retardadores del fuego con comportamiento intumescente: grupos fosfato, fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, los que normalmente actúan más eficientemente cuando están combinados entre sí (Alongi et al., 2013). Es por esto que, ante la posibilidad de tener los tres componentes clave en una sola molécula, ADN y ARN, de manera natural, se puede observar una ventaja adicional a la idea de utilizar los ácidos nucleicos como agentes de retardo a las llamas. Los componentes de los ácidos nucleicos esenciales para la acción de retardo a las llamas son los siguientes:

1. Los grupos fosfato, los cuales son capaces de producir ácido fosfórico que lleva a la deshidratación de las fuentes de carbono y la formación del carbonizado (char).
2. Fuentes de carbono: unidades de ribosa y desoxirribosa, las cuales al calentarse se deshidratan, liberando agua y formando la capa carbonizada (char).
3. Fuentes de nitrógeno: bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina, citosina y uracilo), las cuales pueden liberar amoníaco al calentarse.

Simultáneamente, las proteínas son las otras biomacromoléculas que pueden presentar estructuras o cadenas laterales con propiedades de retardo a las llamas, como las fuentes de

carbono y nitrógeno, y en algunos casos fósforo o azufre. Tejidos de algodón tratados con proteínas han mostrado una reducción en su inflamabilidad. En los casos de tratamiento de las telas con proteínas del suero de la leche, éstas mostraron una resistencia al fuego significativamente aumentada al sensibilizar la degradación del algodón y dejar grandes residuos finales en las pruebas de inflamabilidad (Bosco et al., 2013) y en los casos de tratamientos con caseínas e hidrofobinas (pequeñas proteínas producidas por hongos filamentosos), las telas mostraron un aumento en el tiempo total de combustión, una disminución en la velocidad de combustión y un residuo significativo al finalizar las pruebas de combustión (Alongi et al., 2014).

El hecho que estas biomacromoléculas tengan las propiedades retardadoras de la llama presenta la oportunidad de innovar en el campo de los agentes de retardo del fuego y de comenzar nuevas investigaciones relacionadas a esta aplicación poco convencional de los ácidos nucleicos y las proteínas. Resulta particularmente importante el encontrar fuentes eficientes de biomacromoléculas, que además sean económicas y de fácil obtención, al mismo tiempo, es esencial el desarrollo de técnicas de recuperación de alta eficiencia, que sean tanto amigables con el medio ambiente como también económicas.

1.4 ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS DE RESIDUOS VEGETALES.

Hasta ahora, la mayoría de las investigaciones han sido llevadas a cabo utilizando ADN comercial de esperma de arenque, el cual está altamente purificado y presenta escasa disponibilidad, elevados precios y es utilizado principalmente con fines analíticos; lo mismo se puede decir con respecto a las proteínas utilizadas: las proteínas del suero de leche, las caseínas y las hidrofobinas. Una vez que la efectividad de estas macromoléculas como retardadores de las llamas fue probada, el equipo de investigación reemplazó el ADN de esperma de arenque y las proteínas altamente purificadas, buscando otras fuentes para la extracción y recuperación de estas biomacromoléculas, de menores costos, menos purificadas y con eficacia como retardadores de la llama similar o comparable a aquella de las moléculas de alta pureza, previamente probadas.

Como consecuencia de esta búsqueda de retardadores del fuego más económicos, sustentables y también eficientes, la investigación se ha dirigido hacia los residuos de industrias procesadoras de biomasa y alimentos como fuentes de biomacromoléculas. De éstas, la industria alimentaria tiene presencia bastante extensa y parece ser una buena fuente de residuos biológicos.

Considerando los objetivos principales de este proyecto, se decidió recuperar ácidos nucleicos y proteínas a partir de residuos vegetales de una planta procesadora de frutas y hortalizas, ubicada en la provincia de Turín, Italia.

La planta procesa diariamente productos de cuarta gama, donde las frutas y verduras, son simplemente seleccionadas, lavadas con agua y peladas o cortadas de manera de eliminar las partes no comestibles. Para este tipo de residuos es fácil el reabastecimiento, no presentan costos significativos y no están contaminados con productos químicos, que también están siendo evitados durante el proceso productivo.

Se determinó, finalmente, la utilización de residuos de verduras en lugar de residuos frutales como fuentes de ADN para la extracción, básicamente por su composición respecto a las biomacromoléculas, considerando en este caso proteínas y carbohidratos. Esto puede ser observado en las tablas siguientes, que entregan una descripción bastante general.

Tabla 1.1 Composición de frutas y verduras (por cada 100g de material fresco)
(Fuente: CIHEAM- Options Méditerranéennes)

	Agua (g)	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	Fósforo (mg)
Verdura	79-96	0,5-18	0,5-5	12-125
Fruta fresca	80-95	1,5-16	0,5-1,5	-

De la tabla 1.1, se puede ver fácilmente como el agua se encuentra en los mismos rangos porcentuales, tanto para las verduras como para las frutas; ocurre lo mismo en el caso de los carbohidratos. Sin embargo, en el caso de las proteínas, éstas muestran una significativa

variación en el valor máximo, el cual es mayor en los vegetales que en las frutas. También se puede ver que el contenido de fósforo presenta una diferencia importante: está presente en los vegetales y ausente en las frutas (o presente de manera no cuantificable, respecto de la verdura). Esta diferencia podría estar ligada a los contenidos de proteínas de uno y otro, ya que el fósforo suele ser un constituyente de las proteínas, por lo que un mayor contenido de proteínas significaría una mayor presencia de fósforo, y aun cuando las cantidades están dadas en el orden de los miligramos, pueden volverse significativas al momento de tratar grandes cantidades de residuos vegetales con fines extractivos. Por otro lado, el contenido de fósforo, particularmente en forma de fosfato, es de gran importancia en este estudio, ya que es uno de los compuestos principales que contribuyen positivamente a los efectos de retardo al fuego.

Cuantificaciones exactas de ADN contenido en los vegetales son muy difíciles de obtener, pero se tienen algunos datos que pueden resultar útiles al momento de estimar las cantidades que se pueden obtener de diferentes tejidos vegetales. Murray y Thompson (1980) dicen que es esperable obtener 0,2-0,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ en peso seco dependiendo de la especie y el tipo de tejido utilizado en la extracción, habiendo aislado ADN de trigo, arvejas, avena, zanahorias, poroto chino y tabaco. Briard et al. (2000), que aislaron ADN de diferentes partes de la zanahoria y otros vegetales del género *Apiaceae*, obtuvieron 0,115 μg ADN/mg tejido fresco de las flores, 0,054 μg ADN/mg de tejido fresco de las semillas y 0,048 μg ADN/mg tejido fresco de las hojas (frescas). Guillemaut y Maréchal-Drouard (1992), extrayendo ADN de hojas maduras de diferentes árboles y diversas plantas, reportaron rendimientos de ADN puro en un rango entre 0,02 a 0,16 μg por gramo de tejido fresco, dependiendo de la especie, tejido vegetal y estado de desarrollo del mismo. Si bien no se tiene información más específica que la recién descrita, se puede asumir que las cantidades de ácidos nucleicos se encuentran en rangos similares tanto para la fruta como la verdura.

Otro factor determinante es el tipo y la cantidad de las moléculas adicionales a los ácidos nucleicos presentes en la solución, una vez que los tejidos vegetales han sido triturados y preparados para la extracción. Algunas de estas moléculas, los carbohidratos por ejemplo, pueden tener un impacto negativo en las propiedades de retardo a las llamas. Por esta misma

razón, los vegetales con bajos contenidos de carbohidratos deben ser privilegiados, lo cual también ayuda a evitar pasos de purificación adicionales.

En la tabla 1.2 se hace una comparación de la composición de diversos tipos de hortalizas.

Tabla 1.2: Composición de 100 g de materia vegetal fresca (Fuente: FAO, Anón. 1960)

	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	Agua (g)
Papa	18,9	2	78
Zanahoria	9,1	1,1	88,6
Lechuga	2,8	1,3	94,8

Se puede observar que los contenidos de carbohidratos presentan significativas variaciones en los distintos vegetales, el contenido más bajo se observa en la lechuga (2,8%) y el valor más alto en las papas (18,9%), mientras que para el contenido de agua se tiene la situación inversa: las papas presentan un 78% de agua y la lechuga un 94,8%. Para el caso de las proteínas, se observa una leve variabilidad, no determinante como en los dos casos anteriores.

El contenido de proteínas en los vegetales no debería ser un problema, ya que se ha visto que las proteínas resultan ser útiles como componentes de la solución que se adiciona a las telas como tratamiento para prevenir la combustión, mientras que el contenido de carbohidratos puede ser considerado como un factor decisivo, ya que éstos interfieren en la extracción y recuperación de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos forman complejos con compuestos secundarios, tales como polisacáridos o polifenoles, causando la “incrustación” del ADN en una matriz gelatinosa y pegajosa (Guillemaut & Maréchal-Drouard, 1992); los polisacáridos presentan una textura viscosa y similar a la de un pegamento y vuelven al ADN inmanejable (Echevarría-Machado et al., 2005). Los polisacáridos se comportan como contaminantes tanto en la solución de extracción como en el proceso de extracción. A modo de resumen, a menor presencia de carbohidratos resulta más fácil aislar los componentes deseados. Por esta razón, la lechuga se presenta como la mejor opción de las tres verduras mencionadas anteriormente

para los procesos de extracción y consecuentemente, la fuente de ácidos nucleicos más eficiente.

Tabla 1.3: Composición de las hojas de lechuga cada 100 g.
(Fuente: Suquilanda, M. 2003, Horticultura)

Lechuga	Por 100 g	
Agua	96	g
Proteínas	0,8	g
Carbohidratos	2,3	g
Fósforo	25	mg

Las hojas de lechuga, junto con otros tipos de hortalizas, fueron los principales componentes del material de residuo que fue entregado al laboratorio de parte de la planta procesadora. La tabla 1.3 entrega una idea bastante completa de los principales componentes de las hojas de lechuga (los valores presentan una ligera variabilidad producto de las variaciones normales de producción y cultivo). Una vez más, el contenido de agua, como se puede ver, presenta un valor muy elevado (96%), los carbohidratos un valor muy bajo (2,3%) y el fósforo, presente en un nivel bastante bajo, pero probablemente asociado a la cantidad de proteínas, que no es muy elevada (0,8 %).

De lo que fue posible encontrar en literatura, la composición de los vegetales frescos varía dependiendo de qué parte de la planta está siendo considerada (Shewfelt, 1990). Este hecho no es considerado significativo en este caso, dado que fue utilizada la hoja entera de la lechuga, la cual se espera que entre en los rangos estudiados.

1.5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Las técnicas tradicionales utilizadas para extraer ADN de tejidos vegetales tienden a ser utilizadas en muestras de tamaños muy pequeños, lo que significa que las cantidades de ácidos nucleicos que se obtienen también son muy reducidas. Estas técnicas usualmente son complejas y requieren numerosos pasos. Con mucha frecuencia tienen propósitos analíticos, lo que significa que se requieren extractos de ADN de alta pureza, obtenidos por medio de

reactivos también de alta pureza y, normalmente, de elevados costos, que en algunos casos igualmente son tóxicos. En términos generales, son bastante similares en las formas en las que han sido desarrollados, pero tienden a variar en cuanto al número de etapas o al número de repeticiones de ciertos ciclos.

La mayoría de los procedimientos de extracción tradicionales están parcialmente basados y adaptados de un método desarrollado por Dellaporta et al. en 1983, para pequeñas muestras de tejido vegetales.

Como es posible observar de la tabla 1.4 (columnas 1-4), las técnicas tradicionales han sido desarrolladas principalmente para material vegetal congelado con nitrógeno líquido, por lo que no se suelen utilizar en matrices frescas, y en todos los protocolos se considera una etapa de molienda para facilitar la etapa de extracción.

En lo que respecta a las soluciones tampón o buffers de extracción, pueden tener distintas composiciones, pero presentan algunos reactivos esenciales, tales como:

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como agente quelante de iones utilizado para prevenir el daño del ADN;
- Tris(hidroximetil)aminometano-HCl (Tris-HCl) como buffer;
- β -mercaptoetanol para la denaturación de las proteínas;
- Dodecilsulfato sódico (SDS) o bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) como surfactante, ayudando a la lisis celular;
- NaCl para neutralizar cargas negativas de los grupos fosfatos del ADN y facilitar la precipitación de éste.

La extracción del ADN también se combina con una o más etapas de purificación para lo cual se utiliza acetato de potasio o cloroformo: alcohol isoamílico, los cuales facilitan la remoción de proteínas.

Finalmente, una característica común en todos los protocolos estudiados es la precipitación en alcohol del ADN extraído.

Como fue mencionado previamente, estos procedimientos tradicionales de extracción, no son adecuados para trabajar con grandes cantidades de tejido vegetal, dado que pueden ser complejos y de altos costos. Pueden ser muy demandantes de tiempo, como es el caso del método desarrollado por Cheng et al. (columna 4, tabla 1.4) y, si son utilizados en cantidades mayores, tampoco resultan ser amigables con el medio ambiente o saludables, los que son de los principales objetivos de este proyecto.

De entre todos los protocolos investigados, además de los tradicionales, también se encontró uno bastante simple, descrito por Carboni (2007) (tabla 1.4, columna 5). Este protocolo es fundamental para demostrar la posibilidad de recuperar los ácidos nucleicos de manera fácil, a bajo costo y usando un buffer de extracción no tóxico. Esta solución tampón contiene NaCl y SDS, al igual que los métodos tradicionales, pero en este caso el SDS no se presenta en las mismas condiciones de elevada pureza, ya que forma parte de los componentes típicos de los detergentes líquidos de uso doméstico. En este caso, no es únicamente el ADN, sino que todos los ácidos nucleicos los que son extraídos y precipitados en alcohol, dado que no existen etapas de purificación adicionales.

Dada la simplicidad, economía y rapidez de desarrollo, además de la casi nula toxicidad de los componentes utilizados para el desarrollo de esta técnica, ha sido ésta la seleccionada para realizar el desarrollo de este proyecto, como una alternativa más ecológica las técnicas de extracción tradicional. Se ha pensado que posee el potencial para tratar tejidos vegetales en mayores volúmenes que aquellos típicos de una escala laboratorio para la recuperación de ácidos nucleicos, que sin ser particularmente puros pero con un cierto potencial para los tratamientos de retardo a la llama.

Tabla 1.4: Tabla comparativa de los métodos de extracción más relevantes.

	1	2	3	4	5
Método	Dellaporta et al.(1983)	Guillemaut et al.(1992)	Briard et al.(2000)	Cheng et al.(2003)	Método didáctico (Carboni, 2007)
Buffer de extracción	Tris, EDTA, NaCl y β -mercaptoetanol.	Acetato de sodio, EDTA, NaCl, PVP, en caso necesario SDS.	Tris, NaCl, EDTA, CTAB y β -mercaptoetanol.	Tris-HCl, NaCl, EDTA, β -mercaptoetanol y CTAB.	Agua, detergente líquido que contiene SDS, NaCl.
Reactivos adicionales y soluciones	SDS, acetato de potasio, acetato de sodio, isopropanol, etanol.	Acetato de potasio; *Buffers: Tris-HCl, EDTA, y NaCl; isopropanol, etanol.	Cloroformo: alcohol isoamílico(24:1); isopropanol, etanol, TE.	Tris-HCl and EDTA (TE); cloroformo-alcohol isoamílico; fenol-cloroformo- alcohol isoamílico; isopropanol; etanol; solución NaCl; éter saturado con agua	Etanol.
Pasos requeridos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Congelación con nitrógeno líquido y molienda. 2. Incubación con buffer a 60°C por 10 min. 3. Incubación con acetato de potasio y SDS a 0°C por 20 min. 4. Incubación a -20°C por 30 min. 5. Centrifugación a 25 000g por 20 min. 6. Filtración y resuspensión con isopropanol. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Molienda con arena del tejido vegetal pre tratado. 2. Incubación con medio de extracción a 65°C por 10 min. 3. Centrifugación a 10 000g. 4. Decantación 5. Incubación con acetato de potasio a 0°C. 6. Centrifugación a 10 000g. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Molienda material liofilizado con nitrógeno líquido. 2. Incubación con buffer de extracción a 60°C por 45 min. Adición de cloroformo: alcohol isoamílico. 3. Centrifugación a 8 000rpm. 4. Resuspensión pellet en 1xTE. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Molienda con nitrógeno líquido. 2. Incubación a 65°C por 60 min. 3. Enfriamiento y adición de cloroformo-alcohol isoamílico. 4. Centrifugación a 5 500g. 5. Incubación del sobrenadante con isopropanol a -20°C por 30 min. 6. Centrifugación del sobrenadante a 5 000g. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Machacado de la fruta fresca. 2. Incubación con buffer de extracción a 60°C por 15 min. 3. Incubación en agua con hielo por 5 min. 4. Filtración. 5. Precipitación ADN con etanol helado por 5 min. 6. Recuperación del etanol.

Tabla 1.4: Tabla comparativa de los métodos de extracción más relevantes. (Continuación)

Método	1 Dellaporta et al.(1983)	2 Guillemaut et al.(1992)	3 Briard et al.(2000)	4 Cheng et al.(2003)	5 Método didáctico (Carboni, 2007)
	7. Incubación a -20°C por 30 min.	7. Resuspensión en isopropanol.		7. Resuspensión pellet en solución de TE and fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.	
	8. Centrifugación a 20 000g for 15 min.	8. Incubación con isopropanol a -20°C.		8. Centrifugación. Recuperación del sobrenadante acuoso y adición de solución de NaCl y éter saturado con agua.	
	9. Resuspensión pellet en Tris y EDTA.	9. Centrifugación a 10 000g.		9. Centrifugación. Recuperación de la fase acuosa.	
	10. Centrifugación por 10 min.	10. Resuspensión en agua.		10. Precipitación ADN con isopropanol helado a -20°C por 30 min.	
	11. Resuspensión pellet en acetato de sodio e isopropanol.	11. Precipitación ADN con isopropanol.		11. Recuperación pellet de ADN flotante.	
	12. Centrifugación.	12. Centrifugación a 10 000g.		12. Resuspensión pellet en TE.	
	13. Resuspensión pellet en Tris y EDTA.	13. Resuspensión pellet en *buffer adecuado.			

2 MATERIALES Y MÉTODOS.

El método de extracción que fue utilizado para el desarrollo de un proceso para la recuperación eficiente de ácidos nucleicos y proteínas de residuos vegetales, derivó del protocolo desarrollado por Carboni (2007). El procedimiento básico que fue usado es descrito la siguiente subsección 2.5 del presente capítulo, y también se representa de manera completa en la figura 2.5.

El proceso de recuperación puede ser resumido de la siguiente manera: consiste de una serie de pasos consecutivos comenzando con la trituración primaria de la matriz vegetal, seguida de una etapa de trituración secundaria más fina que la anterior, después de la cual corresponde la etapa de la extracción como tal, para la cual se utiliza un buffer de extracción adecuado. La extracción es seguida de una filtración, la cual a su vez es seguida por una etapa de precipitación utilizando etanol, que posteriormente debe ser recuperado. El etanol recuperado es sometido a una centrifugación que permite la formación de un pellet constituido por una mezcla de extractos vegetales que incluye ácido nucleicos y proteínas. Luego, este pellet es recuperado y resuspendido en agua destilada, de lo cual se realizan determinaciones analíticas o se recolecta para poder realizar las impregnaciones de los textiles de fibra natural.

En las siguientes subsecciones del capítulo se describen con más detalle cada una de las etapas, junto con todas las modificaciones que fueron realizadas al proceso durante su optimización.

2.1 DESCRIPCIÓN DE LOS RESIDUOS.

Los tejidos vegetales utilizados en la experiencia son residuos de una planta procesadora de alimentos, la cual elabora frutas y verduras de cuarta gama. Consecuentemente, el material recibido no es apto para el consumo humano, al menos bajo la mayoría de los estándares de calidad de los alimentos y preferencias estéticas de los consumidores del mundo

industrializado. A su llegada al laboratorio se encontraban bastante limpios, pero era necesario remover algunos cuerpos extraños, principalmente pequeños trozos de plástico.

El material residual que fue proporcionado, inicialmente correspondía a una línea de procesamiento de frutas, luego consistió en residuos vegetales mixtos y los últimos lotes consistieron casi en su totalidad de verduras de hoja. El hecho de que el tipo de residuos variara durante el desarrollo del trabajo se debió a la constante búsqueda del material más adecuado como fuente de ácidos nucleicos.

1. El primer lote en llegar estaba compuesto por residuos de la piña: cáscara con un alto porcentaje residual de pulpa y el penacho de hojas.
2. El segundo lote que llegó contenía zanahorias, zapallo y papas en pequeños trozos de dimensiones variables, y una mescolanza inseparable de lechuga, acelga, nabos y hojas de apio. Este lote se caracterizaba por la presencia de residuos de papa obtenidos por el raspado de las líneas de proceso.
3. Un siguiente lote estaba compuesto principalmente de lechuga, acelga, nabos, hojas de apio con algunas nuevas adiciones tales como rúcula y pequeños trozos de cebolla, pimentones y zapallos italianos.
4. Todos los siguientes lotes fueron similares y contenían sólo las hojas de diversas verduras, principalmente lechugas de diversos tipos, repollo y achicorias moradas. Las proporciones de todos estos componentes variaban ligeramente en los distintos lotes.

2.2 PRETRATAMIENTO.

Para poder preservar la fruta y las verduras que llegaban en lotes grandes, éstas fueron separadas en porciones más pequeñas y congeladas a -21°C , enteras o trituradas como será descrito más adelante. En casos particulares, el material vegetal no fue congelado, sino mantenido a 4°C y usado pocas horas después de su llegada al laboratorio.

2.2.1 Trituración primaria.

Este paso fue utilizado para reducir el volumen de material y de esta manera simplificar los procesos posteriores, tales como el congelado o el paso de trituración secundaria.

La trituración primaria era poco fina, y se utilizaba para ello una licuadora de cocina, una medialuna (cuchillo curvo) o una tijera, dependiendo del material a tratar.

Como fue mencionado previamente, ésta etapa era seguida por un congelamiento del material vegetal a -20°C , con algunos casos excepcionales.

2.2.2 Trituración secundaria.

Este paso se realizaba normalmente en el producto descongelado de la etapa anterior, o en el producto fresco después de la trituración gruesa. Los implementos utilizados en esta etapa eran un mortero o una licuadora manual (“minipimer”), dependiendo de la cantidad de material que estaba siendo triturado. Este paso se realizaba para romper el tejido vegetal y aumentar la superficie de contacto para la etapa siguiente, la extracción en sí.

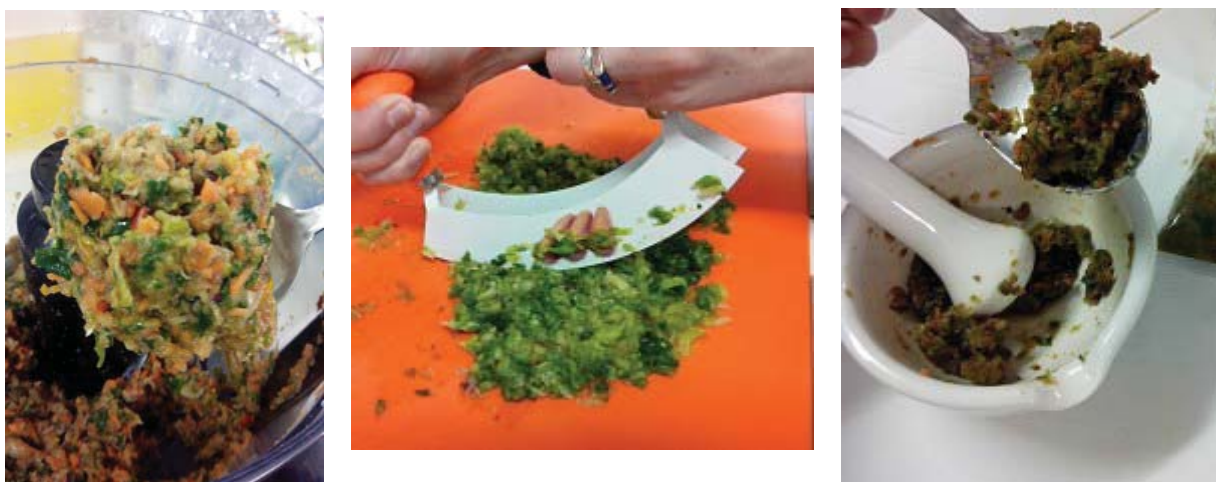


Figura 2.1: Muestras durante la fase de trituración.

2.3 EXTRACCIÓN.

La extracción es la etapa fundamental de todo el proceso de recuperación.

El buffer o solución tampón que fue agregado a la pasta obtenida de la trituración secundaria estaba compuesto por detergente líquido (con 5-15% de tensoactivos aniónicos) al 10% en volumen y cloruro de sodio al 10% m/v disueltos en agua destilada. Esta concentración fue mantenida constante durante todas las pruebas de extracción realizadas.

La extracción fue realizada inicialmente con aproximadamente 30 g de material vegetal, y posteriormente fue aumentado a 200 g.

A la papilla vegetal se le agregó el buffer, se volvió espesa y bastante homogénea, debió ser agitada suavemente para obtener esas características, y esta mezcla fue incubada en un baño de agua caliente bajo condiciones de temperatura especificada y constante (baño termostático 112A-E, Huber). Debido a la presencia del detergente líquido, la formación de espuma era muy fácil y rápida con la agitación por lo que era importante que ésta fuese muy delicada para prevenir la formación de la espuma.

En base a los protocolos investigados ya mencionados, donde las temperaturas de incubación iniciales variaban entre los 60°C y los 65°C, y los tiempos de incubación también variaban entre los 10 y los 60 minutos, se decidió que la fase inicial de la extracción base se debería realizar bajo las siguientes condiciones: en baño de agua caliente a 65°C durante 30 min con una relación de los vegetales en peso seco: peso del buffer de extracción igual a 1:7.

Sin embargo, durante el desarrollo del proceso todas las condiciones: tiempo, temperatura del agua caliente, relación peso seco de la matriz vegetal: peso de la solución tampón; fueron variadas de modo de poder encontrar lo combinación de condiciones más eficiente.

Las variaciones, siempre realizadas una a la vez, que fueron hechas en esta etapa del proceso fueron las siguientes:

- Temperatura del baño caliente: 65°C y 68°C.
- Tiempo de incubación: 30 min y 60 min.
- Relación peso seco de la matriz vegetal: peso del buffer: (1:7), (1:10,5) y (1:14).



Figura 2.2: Tubos falcon y vasos precipitados durante la incubación.

2.4 RECUPERACIÓN DEL EXTRACTO.

2.4.1 Filtración.

La etapa de la filtración se realizó para recuperar la fracción acuosa de la mezcla que contiene el extracto. De esta manera solo el extracto y los sólidos más pequeños pasan a las

subsiguientes etapas de recuperación, mientras que los sólidos restantes, retenidos durante la filtración, son considerados agotados y son descartados.

Los materiales filtrantes usados en esta fase fueron gasa, papel filtro cualitativo o tejido de nylon (medias), dependiendo del método de molienda secundaria utilizado y de la cantidad a filtrar.

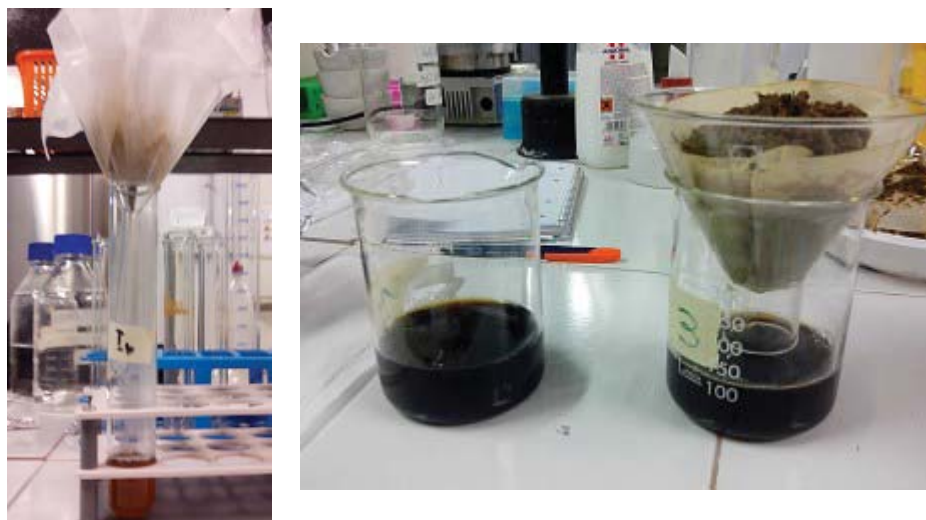


Figura 2.3: Muestras durante la filtración.

2.4.2 Precipitación en etanol y recuperación.

Se considera como una fase de separación ya que los ácidos nucleicos son propensos a precipitar en el etanol aunque hay otros componentes del extracto celular que se pueden trasladar a la fase etanol, mientras que otros compuestos celulares indeseados o innecesarios permanecen en la fase acuosa.

El etanol fue utilizado a una temperatura de -21°C y agregado cuidadosamente al filtrado en una proporción volumétrica 1:1 en tubos de vidrio, de modo que se pudieran distinguir claramente dos fases: una fase etanol superior y una fase acuosa inferior. La solución del

etanol utilizada varió en grado alcohólico y pureza. Inicialmente se utilizó un etanol altamente puro al 99,8%, luego uno al 96% y al 90% para el desarrollo del proceso.

Los tubos de ensayo que contenían estas dos fases fueron mantenidos a -21°C por intervalos de tiempo determinados para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos. Los tiempos fijados para la precipitación variaron entre toda una noche (overnight) y una a cuatro horas con aumentos de una hora entre cada uno. Los periodos de una noche normalmente comprendieron 15 ó 16 horas, dependiendo de la hora a la que fuera completada la etapa previa del proceso.

Luego del periodo de precipitación, la fase etanol era recuperada manualmente utilizando una pipeta y transferida a un tubo de centrifuga. La pipeta fue seleccionada principalmente por su capacidad de succión, ya que el pellet formado por los ácidos nucleicos podía quedar rezagado fácilmente en la zona inferior de la fase etanol si la succión no era lo suficientemente fuerte. La recuperación desde la parte inferior de la fase etanol es un proceso delicado dado que se puede contaminar fácilmente con componentes de la fase acuosa.

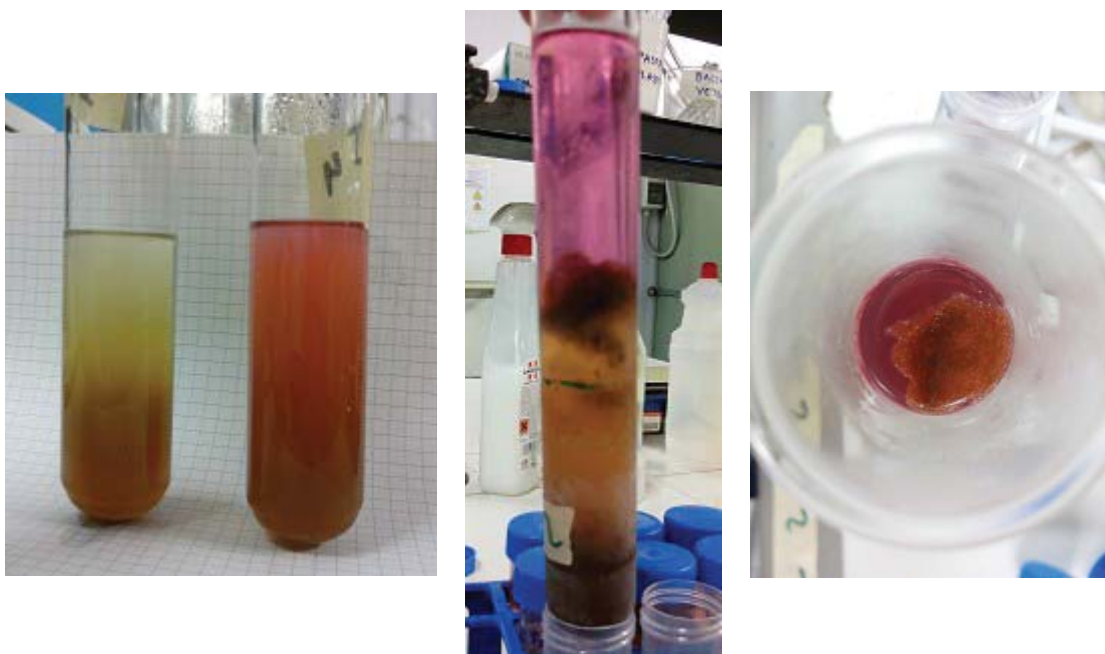


Figura 2.4: Tubos durante la fase de precipitación.

2.4.3 Centrifugación y resuspensión del pellet.

La fase etanol recuperada fue centrifugada durante 10 min a 4100 RPM (centrífuga IEC CL30, Thermo Scientific). El pellet producido era retenido mientras que el sobrenadante era descartado.

El pellet obtenido por medio de la centrifugación era resuspendido en agua destilada, en una cantidad proporcional al peso seco inicial de la muestra, lo cual fueron 5 ml de agua por cada 3 g de peso seco de la matriz vegetal inicial.

2.5 DIAGRAMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

Esta sección muestra el diagrama que entrega una visión general del proceso completo, tal como fue descrito en los puntos precedentes.

Proceso de extracción de tejidos vegetales

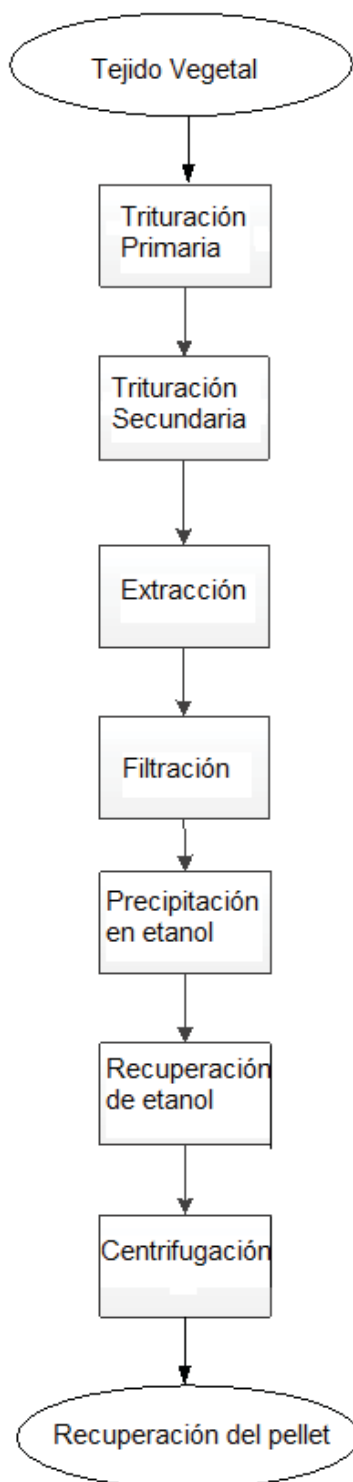


Figura 2.5: Diagrama del proceso desarrollado para la extracción.

2.6 IMPREGNACIÓN DE TELAS DE FIBRA NATURAL.

Para la etapa de impregnación, se remojaron trozos de tejido de algodón de 10cmx10cm en 120 ml de la solución del extracto. El proceso mismo de la impregnación consistió de una secuencia en la cual los trozos de tela eran, en primer lugar, sumergidos (uno a la vez) en la solución del extracto durante un minuto a temperatura ambiente. Finalizado el minuto, los trozos se retiraban de la solución evitando al máximo el goteo de la tela y llevados a secar en estufa a 105°C por 30 min. Terminado el periodo de secado, las telas eran llevadas a enfriar a una desecadora por 15 min para finalmente ser pesadas. Esta secuencia sería repetida hasta obtener un peso constante, correspondiente a un valor de *add-on* seco del 5% (AO%), que fue el valor máximo obtenido.

El *add-on* seco total de las muestras de algodón (AO%) fue determinado para cada una por medio del peso inicial (W_i) y el peso posterior a cada impregnación con la solución (W_f) y su correspondiente secado, usando una balanza de precisión de $\pm 10^{-4}$ g.

La absorción de los ácidos nucleicos fue calculada utilizando la siguiente ecuación (eq. 2.1)

$$AO\% = \frac{W_f - W_i}{W_i} * 100 \quad (\text{eq. 2.1})$$

2.7 TÉCNICAS ANALÍTICAS.

2.7.1 Peso seco.

Las muestras del material vegetal fueron secadas a 105 °C en estufa (Oven 9000, ISCO International), hasta obtener el peso constante, el cual normalmente se lograba a las 48 horas.

Esta técnica fue utilizada de modo de tener una base, lo más constante posible, sobre la cual realizar todo el trabajo, dado que cada lote de residuos vegetales presentaba una composición

variable, como fue mencionado previamente. De esta manera fue posible mantener constante las proporciones de la solución tampón respecto del peso de la matriz vegetal, independientemente de las condiciones y características del material fresco.

El peso seco de cada muestra fue determinado pesando cada muestra fresca antes de ser llevada a la estufa (W_i) y después de haber sido obtenido el peso constante (W_f), en cuyo caso también debía ser considerada la tara del recipiente de la muestra ($Tare$). La balanza utilizada presenta una precisión de $\pm 10^{-4}$ g.

El peso seco (DW , del inglés *dry weight*) fue calculado según la siguiente ecuación (eq. 2.2):

$$DW = \frac{(W_f - Tare)}{W_i} * 100 \quad \text{eq. (2.2)}$$

Los valores de peso seco obtenidos fueron posteriormente reportados como valores por cada 100 g de tejido fresco.

2.7.2 Determinación de ácidos nucleicos: concentración y pureza.

La concentración del ADN fue determinada con métodos espectrofotométricos en el rango ultravioleta (UV), midiendo datos de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (OD_{260}). Los ácidos nucleicos (ADN de cadena simple y doble, y ARN) absorben la luz UV mayoritariamente a 260 nm debido a la presencia de las bases nitrogenadas, lo que significa que mientras mayor sea el pico a los 260 nm, mayor será la concentración de los ácido nucleicos en la muestra en cuestión.

Los valores de concentración de ADN ($\mu\text{g/ml}$) fueron determinados sobre la base de los valores OD_{260} según la siguiente ecuación (eq. 2.3), basada en la ley de Lambert- Beer:

$$C_{NA} \left(\frac{\mu g}{ml} \right) = A * FD * 50 \quad (\text{eq. 2.3})$$

Donde A representa el valor de la absorbancia a 260 nm y FD el factor de dilución utilizado, 50 es el coeficiente de extinción molar medio relacionado a que 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN tienen un valor de absorbancia igual a 1 con un paso óptico de 1 cm.

La pureza de los ácidos nucleicos fue determinada usando la relación $A_{260/280}$, es decir, la relación existente entre los valores de absorbancia a 260 nm y a 280 nm, respectivamente. La absorbancia a 280 nm se utiliza porque las proteínas son contaminantes típicos de las muestras de ácidos nucleicos y éstas absorben la luz a esta longitud de onda debido a la presencia de aminoácidos aromáticos. Una muestra de ADN se considera pura cuando la relación $A_{260/280}$ tiene un valor de 1,8; mientras que para ARN puro, esta relación presenta un valor igual a 2.

2.7.3 Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el Ensayo de Bradford, una prueba colorimétrica que se basa en la unión del colorante Azul (brillante) de Coomassie G-250 con las proteínas presentes en la solución: una vez que el colorante se une a las proteínas se convierte en su forma estable de color azul cambiando desde una forma catiónica roja doblemente protonada hasta una forma azul no protonada, lo cual conlleva una variación del máximo de absorción del colorante desde los 465 a los 595 nm.

Después de un periodo de incubación de 30 min, se midió la absorbancia de la muestra de referencia y de todas las muestras en cuestión a 595 nm. La muestra de referencia contenía agua destilada y colorante. La absorbancia neta fue calculada sustrayendo la absorbancia de referencia a 595 nm de cada una de las muestras a la misma longitud de onda ($Abs_{595} \text{Muestra} - Abs_{595} \text{Referencia}$) y la concentración en mg/ml de cada una de las muestras fue calculada por

contraste respecto de una curva estándar preparada usando un estándar de seroalbúmina bovina (BSA) que se puede observar en la figura 3.5 en la sección de resultados y discusiones.

2.7.4 Pruebas de resistencia al fuego.

Después de la impregnación de las muestras de tela, se realizaron pruebas de inflamabilidad horizontales. Las muestras, consistentes de trozos de algodón de 5cmx10cm, fueron aseguradas por tres lados usando un marco metálico en forma de U inclinado 45° respecto del plano que contiene el marco en una cámara cerrada, donde el extremo corto del tejido de muestra era expuesto por 3 s a una llama controlada de metano de 25 mm de alto. Esta prueba mide los siguientes parámetros: tiempo total de combustión, es decir la duración de la llama visible que queda en la muestra; longitud del carbonizado (char), lo cual es la longitud, en centímetros, de la tela que ha sido quemada; la velocidad total de combustión después de la aplicación de la llama, la cual se calcula como la relación entre la longitud del carbonizado y el tiempo total de combustión; y el residuo final. Estas pruebas reproducen los procedimientos descritos en el Standard ASTM D4804.

3 RESULTADOS Y DISCUSIONES.

3.1 EXTRACCIÓN DE TEJIDOS DE PIÑA.

El primer set de experimentos fue realizado con el fin de evaluar la aplicabilidad del método seleccionado de extracción y recuperación de ácidos nucleicos (AN) desde tejidos vegetales. Esta extracción fue llevada a cabo utilizando los residuos del procesamiento de la piña, principalmente la cáscara y las hojas.

El tejido de piña, previo al tratamiento, fue preparado de la siguiente manera: las hojas fueron separadas, la cáscara fue cortada dejando trozos de restos de fruta de hasta 1 cm de espesor, la cual también debió ser desmenuzada en el mayor grado posible. De esta manera se pudieron obtener 3 tipos de matrices distintas: hojas, cáscara y pulpa, las cuales fueron conservadas congeladas hasta que fue posible realizar las pruebas de extracción.

El peso seco (DW) fue determinado para cada una de las partes separadas, y para las cuales el peso constante fue obtenido después de 48 h a 105°C. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Peso seco por cada 100 g de tejido de piña fresco.

	DW (g)
Pulpa	12,2 ± 0,13
Cáscara	14,9 ± 0,54
Hojas	13,9 ± 0,23

Estos resultados tienen en común que los tres tejidos de piña considerados presentan un peso seco muy similar, lo cual consecuentemente indica su contenido de agua. Si bien los valores son similares, queda claro que la cáscara, con 14,9 g de peso seco, presenta el menor contenido de humedad, lo cual es esperable ya que la cáscara tiene un aspecto bastante leñoso. Un poco sorprendente es el resultado obtenido para las hojas de piña, cuyo peso seco de 13,9 g

es casi igual al de la cáscara. Sería esperable que las hojas presentaran una humedad significativamente mayor y por lo mismo un menor peso seco. Estos valores de peso seco tan similares entre ambos tipos de tejidos podrían ser atribuidos a la naturaleza fibrosa de las hojas. Respecto a las fibras de las hojas, éstas solamente se podían cortar y picar con cierta facilidad con la medialuna estando idealmente aún congeladas; con las licuadoras no se obtenía ningún resultado.

Respecto a la pulpa de la piña, cuyo peso seco de 12,2 g, es menor que el de los otros dos tipos de tejido considerados; aún sigue siendo comparable a ellos, por lo tanto se puede decir que las diferencias entre los tres tipos de material analizado son prácticamente insignificantes.

3.1.1 Extracción de pulpa, cáscara y hojas.

Para la extracción de la pulpa de la fruta, la pulpa congelada fue dejada para su descongelamiento. Luego, no estando completamente descongelada, fue triturada en primera instancia con la licuadora y posteriormente con el mortero. Finalmente fue pesada.

Respecto a la cáscara, el material fue triturado semicongelado, primero con la licuadora, luego con el mortero, y después pesado.

Las hojas también fueron probadas como posible matriz de extracción de ácidos nucleicos (AN). Éstas, sin embargo, no fueron trituradas con la licuadora ya que su textura fibrosa no permitía acción alguna de parte de los cuchillos de la licuadora. Por lo tanto, las hojas fueron cortadas finamente con medialuna estando aún bastante congeladas, y luego fueron pesadas.

El tampón de extracción fue preparado de acuerdo a la fórmula descrita en el capítulo de Materiales y Métodos, en el punto 2.3.

El procedimiento de extracción fue realizado bajo las siguientes condiciones:

- Proporción DW matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 65°C por 30 min.
- Filtración con gasa.
- Precipitación en etanol con proporción volumétrica 1:1, pureza del 99,8%, a -21°C, duración toda la noche.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 5 ml de agua destilada.

Los resultados obtenidos de estas pruebas de extracción se muestran en la siguiente tabla 3.2.

Tabla 3.2: Pureza de los AN, concentración y rendimiento de la extracción de la piña.

	DW inicial (mg)	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/PS}$ (%)
Pulpa	6090	1,13	1,978	0,032
Cáscara	6672	0,95	0,069	0,002
Hojas	5328	1,13	0,210	0,024

Lo primero que puede ser observado de los resultados obtenidos, son los rendimientos de los tres tipos de tejidos examinados: se encuentran todos por debajo del 1%, donde el mayor valor obtenido es un 0,032% correspondiente a la matriz de pulpa de piña.

La cáscara presenta el valor más bajo siendo éste un 0,002%, lo cual era casi esperable debido a las características previamente descritas de la corteza. Esta condición dificulta la ruptura del tejido como tal y, en consecuencia, también la de las células que lo constituyen, interfiriendo así con la extracción de los ácidos nucleicos.

Las hojas, con un 0,024%, muestran un rendimiento significativamente mayor que la cáscara, pero aun así es extremadamente bajo, y aún por debajo de los resultados obtenidos para la

pulpa sin dejar éstos de ser comparables. En este caso se puede atribuir la dificultad de la extracción a las fibras que constituyen las hojas, las cuales, como fue mencionado previamente, hacían muy difícil la ruptura del tejido.

En lo que refiere a la pulpa, los valores de rendimiento mayores (en comparación con los otros tejidos) podrían ser atribuidos a la naturaleza más blanda de la matriz, lo cual hace que la ruptura del tejido sea más fácil, exponiendo las células a los agentes extractivos. El bajo rendimiento general de extracción de los AN podría ser causado por la presencia de polisacáridos, los cuales son moléculas constituyentes de las frutas presentes en niveles significativos (como fue mostrado en la tabla 1.2, en el punto 1.4) y dificultan la recuperación de los ácidos nucleicos. En todo caso, una extracción constante y sistemática de tejidos frutales como lo fue esta extracción en particular tampoco es aplicable, ya que la pulpa de la fruta no es un material de desecho, sino la materia prima de la industria que está proveyendo el material de estudio, aun cuando pequeñas cantidades de la pulpa de la fruta forman parte de los residuos de la industria.

Otro aspecto a considerar es la pureza de los AN extraídos, dada por la razón $A_{260/280}$, la cual no está entregando valores muy elevados: todos se encuentran en las inmediaciones de la unidad, lo cual significa que las muestras están altamente contaminadas.

En cualquier caso, la aplicabilidad del método fue probada con este set de experimentos, pero tiene que ser mejorada y optimizada.

La figura 3.1 muestra los rendimientos de los AN obtenidos en este grupo de ensayos. Un factor que llama la atención es la alta variabilidad mostrada por las muestras de pulpa y hojas, la cual se ve evidenciada por las líneas de error en sus respectivas barras. Dado que el rendimiento (y la variabilidad) vistos en las muestras de la cáscara de piña es tan bajo, las grandes variaciones observadas en los otros dos tejidos podrían ser atribuidas a su

composición y estructura, lo cual puede significar una mayor presencia de todos los componentes que fueron liberados en forma desigual durante la ruptura de los tejidos.

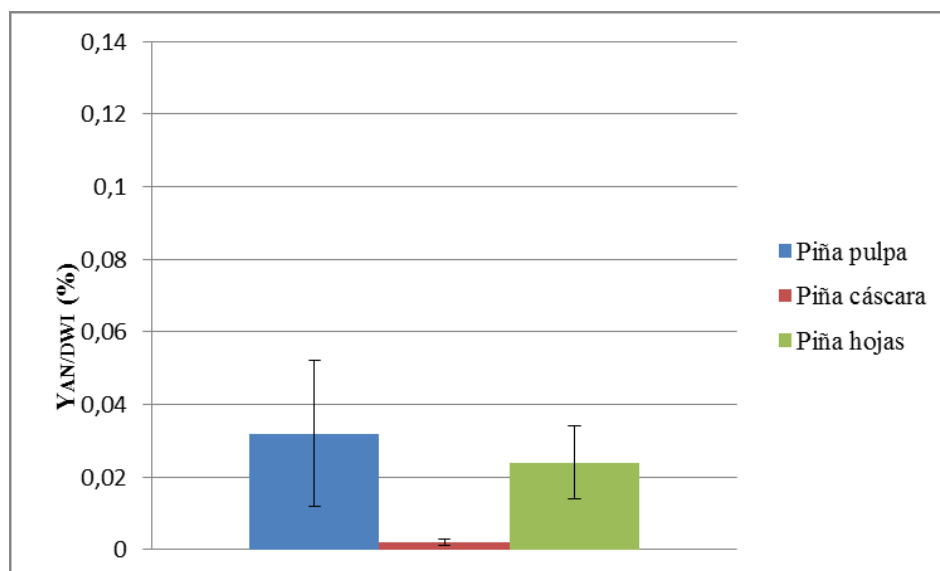


Figura 3.1: Rendimientos obtenidos de diversos tipos de tejido de piña.

3.2 EXTRACCIÓN DE TEJIDOS DE VEGETALES MIXTOS.

Una vez que fue comprobada la aplicabilidad del método de recuperación y para comenzar con la optimización del protocolo, se realizó un segundo set de experimentos en el cual fueron variados dos parámetros principales: la temperatura de la precipitación en etanol y la proporción “DW matriz: peso buffer de extracción”.

El segundo grupo de experimentos fue realizado con un lote distinto de residuos vegetales, el cual ya fue descrito en la sección 2.1. Cabe mencionar nuevamente que junto a las hojas y trozos de los vegetales, había un residuo proveniente del raspado de las líneas de proceso, el cual tenía un aspecto pastoso levemente granuloso, proveniente principalmente del procesamiento de las papas y otros vegetales como la zanahoria y el zapallo. Este tipo de residuos heterogéneos es mucho más similar a los residuos reales provenientes de esta industria, donde los restos no procesados son recolectados y acumulados sin ningún tipo de

clasificación. Como tal, los residuos normalmente están compuestos por una gran variedad de de vegetales, diversas partes de los mismos, en proporciones variables, muchas veces fuertemente influidos por la estación del año. Esto se contrasta con el material residual único como con la piña, y que en este caso, representaba residuos bastante poco realísticos.

Este lote de verduras fue triturado con la licuadora estando aún fresco, y luego fue congelado en pequeñas porciones para cuando fuese posible realizar la extracción.

También fue realizada la determinación del peso seco: las muestras fueron tomadas y secadas en estufa por 48 h, el cual fue el tiempo necesario para obtener el peso constante. El resultado obtenido se muestra en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Peso seco verduras mixtas respecto de 100 g de material fresco.

	DW (g)
Verduras Mixtas	9,08 ±0,19

3.2.1 Efecto de la temperatura durante la precipitación de los ácidos nucleicos.

Este grupo de ensayos fue realizado para evaluar y comparar el efecto de la temperatura durante la fase de precipitación en etanol. Dado que los ácidos nucleicos son solubles en agua y precipitan en etanol, particularmente en condiciones frías y en presencia de sales, una evaluación para determinar la mejor de estas condiciones frías se vuelve necesaria para obtener la mejor recuperación.

Las muestras fueron tomadas del material triturado congelado, que luego fue descongelado y triturado con mortero.

La extracción fue realizada bajo las siguientes condiciones:

- Proporción DW matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 65°C por 30 min.

- Filtración con gasa.
- Precipitación en etanol durante la noche con proporción volumétrica 1:1, etanol con 99,8% pureza, temperaturas de -21°C y 4°C.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 5 ml de agua destilada.

Los resultados de este procedimiento de extracción y recuperación de ácidos nucleicos de verduras mixtas (VM) pueden ser observados en la tabla 3.4.

Tabla 3.4: Efecto de la temperatura de precipitación sobre la pureza, concentración y rendimiento de los AN.

	DW inicial (mg)	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/DW}$ (%)
VM, precipitación a -21°C	6035	1,34	5,47	0,09
VM, precipitación a 4°C	6023	1,36	0,96	0,02

Este set de pruebas indica que la temperatura de precipitación tiene una influencia significativa en el rendimiento obtenido de los ácidos nucleicos. A una temperatura de precipitación de -21°C, el rendimiento de los ácidos nucleicos presenta un valor de 0,09%, el cual es más de cuatro veces el rendimiento obtenido a 4°C, el cual es de un 0,02%.

Estos rendimientos son comparables con los de la extracción previa hecha sobre los tejidos de piña. La extracción de la matriz de verduras a 4°C muestra valores similares (0,02%) a aquellos de la pulpa y hojas de piña (0,032% y 0,024%, respectivamente, tal como se muestra en la tabla 3.2), que fueron realizadas con la precipitación a -21°C.

La pureza de las muestras fue independiente de la temperatura de precipitación del proceso, ya que en ambos casos se observan prácticamente el mismo valor al analizar la razón $A_{260/280}$, el cual es 1,3.

En general, la extracción de la matriz de verduras mixtas demostró mejores rendimientos y valores de pureza que la piña. Al mismo tiempo, pudo ser determinado que las mejores condiciones para la precipitación en etanol son a -21°C .

La figura 3.2 permite comparar los rendimientos obtenidos durante este set de pruebas y que fueron discutidos anteriormente. Vale la pena mencionar, para este caso, que las muestras de la precipitación a -21°C presentan una variabilidad bastante alta en comparación con las muestras de la precipitación realizada a 4°C , pero aun tomando en cuenta esta mayor variabilidad, los rendimientos son significativamente más elevados a la temperatura más baja.

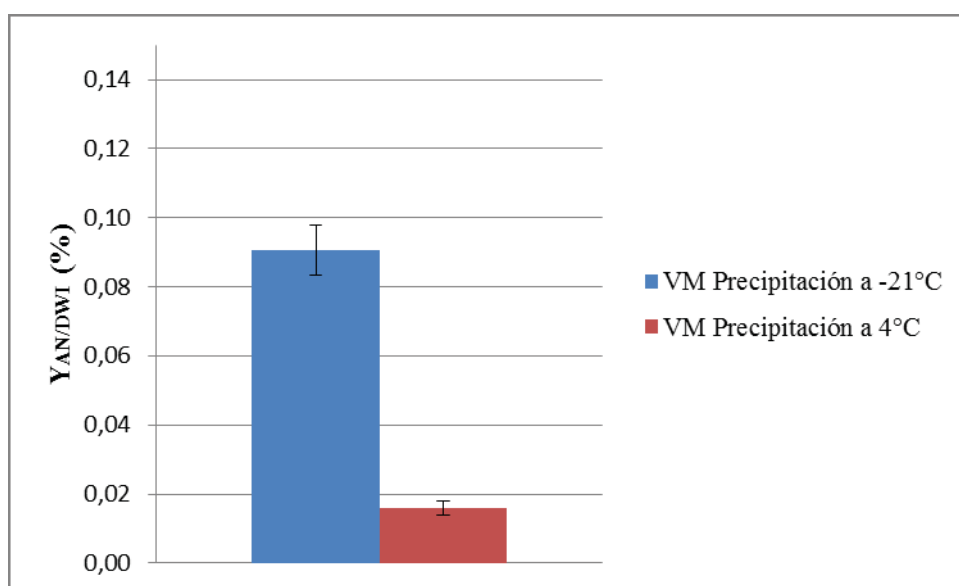


Figura 3.2: Rendimiento de AN a diversas temperaturas de precipitación.

3.2.2 Efecto de la proporción “DW matriz: peso del buffer”.

Para evaluar la influencia que el buffer pudiera tener en el proceso de extracción, tres proporciones distintas de “peso seco vegetal: peso del buffer” fueron probadas.

Fue importante determinar si una mayor cantidad de tampón de extracción significaría un mayor rendimiento de ácidos nucleicos, y si este era el caso, qué tan significativo sería este incremento.

Las muestras fueron tomadas de la matriz de verduras mixtas que fue triturada previo a su congelamiento. Éstas fueron descongeladas y trituradas en segunda instancia en el mortero.

El procedimiento de extracción siguió el mismo protocolo descrito en el punto 2.3, con la variación realizada en el peso del buffer de extracción utilizado, y por lo mismo, en la proporción “peso seco inicial: peso del buffer” (DW: buffer a modo de abreviación):

- Proporción DW matriz: buffer igual a (1:7); (1:10,5); y (1:14).
- Incubación a 65°C por 30 min.
- Filtración con gasa.
- Precipitación en etanol durante la noche con proporción volumétrica 1:1, etanol al 99,8% de pureza y temperatura de -21°C.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 5 ml de agua destilada.

Los resultados obtenidos para cada muestra se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5: Efecto de las diversas proporciones de “peso seco inicial: peso buffer” sobre la pureza, concentración y rendimiento de los AN.

	DW inicial (mg)	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/DW}$ (%)
1 VM, proporción (DW: buffer)				
(1:7)				
1.1	2995	1,17	1,875	0,063
1.2	3008	1,19	1,422	0,047
1.3	2984	1,18	1,815	0,061
1.4	3009	1,17	2,078	0,069
2 VM, proporción (DW: buffer)				
(1:10,5)				
2.1	3007	1,23	1,194	0,040
2.2	3004	1,25	1,167	0,039
3 VM, proporción (DW: buffer)				
(1:14)				
3.1	2996	1,22	1,234	0,041
3.2	3011	1,24	1,122	0,037
3.3	3008	1,23	1,317	0,044
3.4	3008	1,21	1,888	0,063
3.5	3008	1,22	1,269	0,042

En primer lugar, cabe mencionar que los rendimientos obtenidos usando las tres diferentes proporciones de “DW matriz: buffer” resultaron ser muy similares para los tres tipos de muestras.

Las muestras que usaron la proporción (1:7) mostraron los valores de rendimiento más elevados, los cuales varían entre 0,047 y 0,069%, mientras que las otras dos proporciones presentaron valores más bajos, similares entre ellas: las muestras con la proporción (1:10,5) presentan un rendimiento de 0,04% y aquellas con la proporción (1:14) presentan un rendimiento que varía entre el 0,037 y 0,067%. Estos últimos muestran una variabilidad comparable a la de las muestras en las que se usó la proporción (1:7) como puede ser visto en la figura 3.3.

La pureza de las muestras, dada por la relación $A_{260/280}$, presenta un valor casi constante de 1,2 para todas las muestras. Los valores más bajos (1,17) corresponden a las muestras 1.1 y 1.4, las cuales fueron tratadas con la solución tampón en la proporción (1:7). El valor más elevado (1,25) pertenece a la muestra 1.2, que fue tratada con el buffer en proporción (1:10,5). Un aumento en el volumen del buffer utilizado no demostró un cambio significativo en este parámetro.

Este procedimiento sirvió para demostrar que mayores volúmenes de solución tampón (vistos como una disminución de la proporción) no aumentaron las cantidades de ácidos nucleicos extraídos. De hecho, se puede decir justo lo contrario, ya que los rendimientos de AN para las muestras que utilizaron mayores volúmenes de buffer son menores que los rendimientos obtenidos con la proporción estándar (1:7).

Aun cuando fue claro que la proporción (1:14) no tenía ninguna influencia, se realizó por mera curiosidad una prueba adicional, la cual fue llevada a cabo para probar si una extracción a dos pasos presentaría un cambio en el resultado del rendimiento. En este caso, luego de la incubación con buffer en proporción (1:7), se agregó a la matriz agotada un segundo volumen de buffer en la misma proporción, y se repitió la incubación. Este procedimiento no demostró ninguna variación respecto de la extracción previamente mencionada con el buffer en proporción (1:14) realizado en un solo paso, y por lo mismo se decidió no reportarlo de ninguna otra manera.

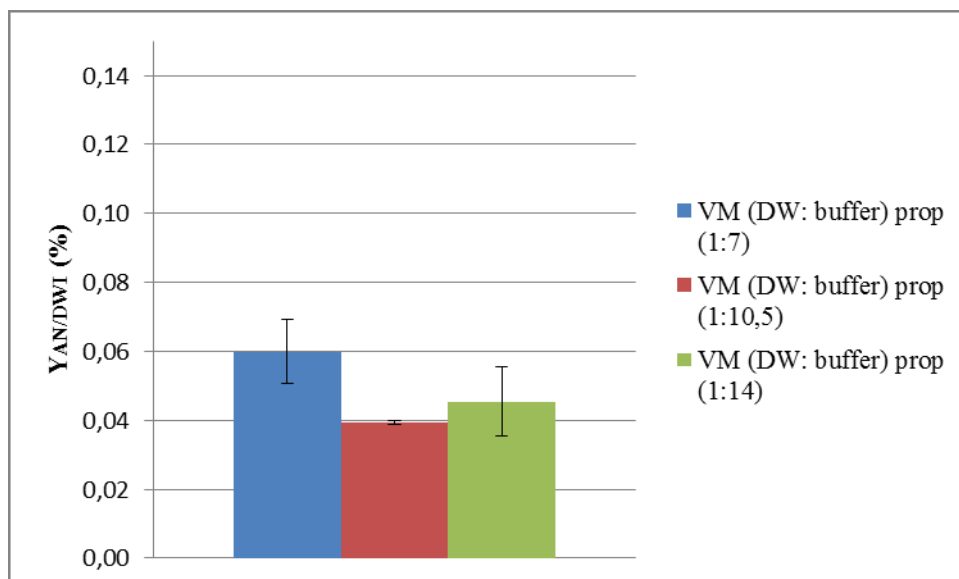


Figura 3.3: Rendimiento de AN usando diversas proporciones de peso seco vegetal: peso buffer.

Luego de haber finalizado esta extracción, fue decidido filtrar las muestras en las que fueron utilizadas las proporciones “DW matriz: peso buffer” de (1:7) y (1:14), como parte de un procedimiento no-estándar. Cada muestra fue filtrada con un filtro de jeringa (con diámetro de poro de $0,7 \mu\text{m}$).

Los resultados obtenidos luego de la filtración están reunidos en la tabla 3.6.

Tabla 3.6: Efecto de la filtración del extracto sobre la pureza, la concentración y rendimiento de AN.

	Post filtración		
	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/DW}$ (%)
1 VM, proporción (DW: buffer)			
(1:7)			
1.1	1,41	0,509	0,017
1.2	1,40	0,511	0,017
1.3	1,41	0,548	0,018
1.4	1,42	0,593	0,020
3 VM, proporción (DW: buffer)			
(1:14)			
3.1	1,41	0,589	0,020
3.2	1,40	0,608	0,020
3.3	1,42	0,775	0,026
3.4	1,44	0,907	0,030
3.5	1,43	0,820	0,027

Los resultados obtenidos después de la filtración muestran niveles de pureza más altos que previo a la filtración, cuyos valores aumentaron a 1,4 (de los previos 1,2). Esto significa que probablemente las proteínas (y otras biomacromoléculas, como los polisacáridos, que podrían estar presentes en la solución) son retenidas durante la filtración. Simultáneamente, los rendimientos de AN disminuyen significativamente con la filtración, cuyos valores se encuentran entre el 0,017% y 0,03%, implicando que parte del contenido de ácidos nucleicos también es retenido por el filtro. En la figura 3.4 se pueden comparar los rendimientos de los ácido nucleicos, previos y posteriores al proceso de filtración.

La diferencia que se puede observar respecto del procedimiento estándar, donde se utilizó la proporción DW: buffer (1:7) es el valor medio que de 0,06% descendió a menos de 0,02% después de la filtración, lo cual no se puede considerar insignificante. Para las otras muestras donde se usó la proporción (1:14), los valores del rendimiento disminuyeron de 0,045 a 0,025%, lo cual no es tan notorio como para las otras muestras, pero aun así es importante tomarlo en consideración.

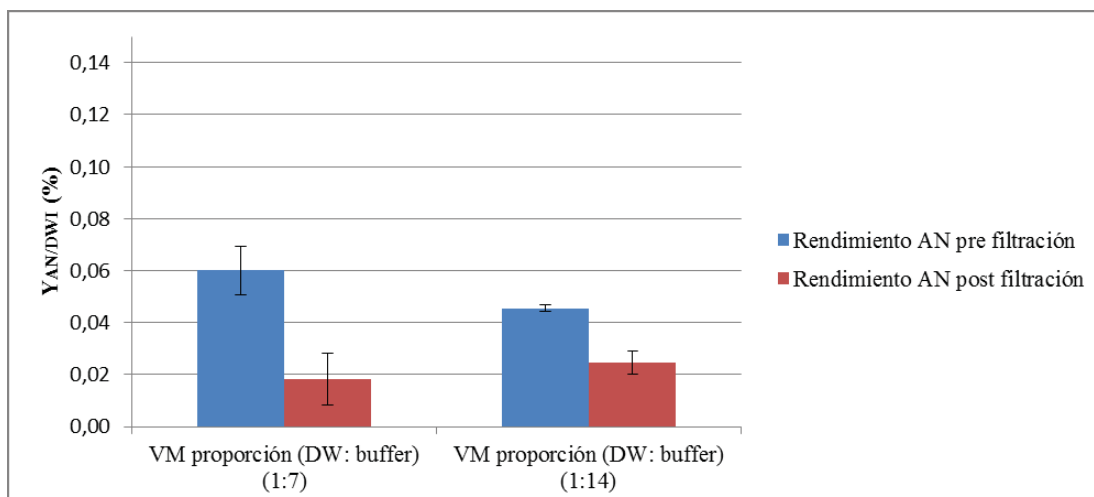


Figura 3.4: Rendimientos medios de AN obtenidos antes y después de la filtración

A este punto en el proceso de optimización, se realizó también una evaluación del contenido de proteínas. Esto fue realizado en las muestras finales del proceso de extracción y recuperación, inmediatamente después de la resuspensión del pellet y también después de la antes mencionada filtración.

La curva estándar utilizada para calcular la concentración de proteínas, y por ende contenido, es mostrada en la figura 3.5:

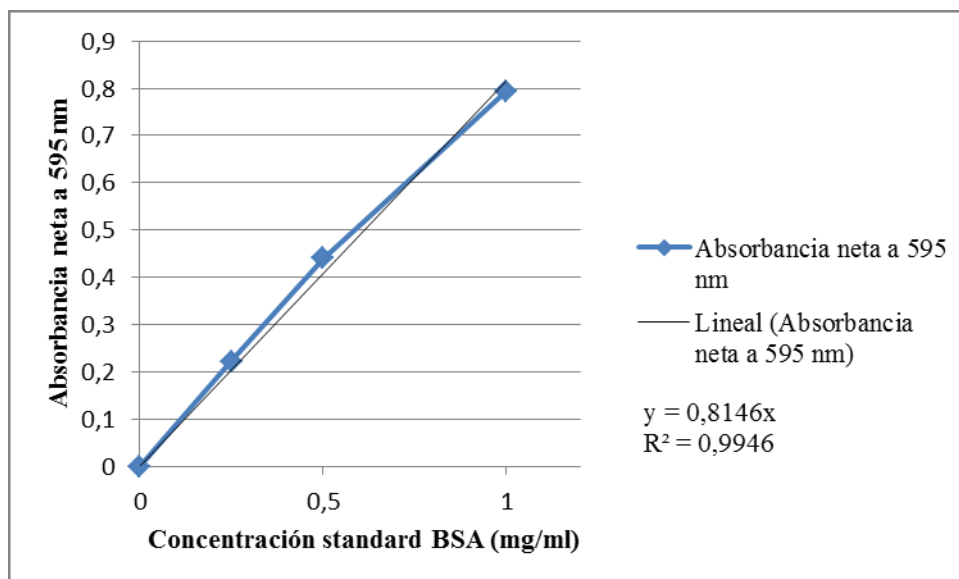


Figura 3.5: Estándar de BSA utilizado para la cuantificación de proteínas con el método de Bradford.

El procedimiento utilizado para determinar el contenido de proteínas está descrito en el párrafo 2.7.3. La concentración de proteínas de cada muestra fue determinada utilizando la ecuación 3.1 que describe la curva estándar mostrada en la figura 3.5.

$$NetAbs_{595nm} = 0,8146 * C \left(\frac{mg}{ml} \right) \quad (\text{eq. 3.1})$$

La tabla 3.7 presenta los contenidos de proteína obtenidos al comparar los valores de absorbancia registrados para cada muestra con la ecuación obtenida con el estándar de BSA.

Tabla 3.7: Contenido de proteínas de las muestras pre y post filtración.

	Pre filtración		Post filtración	
	Contenido proteínas (mg)	Contenido proteínas (%)	Contenido proteínas (mg)	Contenido proteínas (%)
1 VM, proporción(DW: buffer) (1:7)				
1.1	-	-	-	-
1.2	0,953	0,032	0,064	0,002
1.3	1,185	0,040	0,051	0,002
1.4	1,373	0,046	0,052	0,002
3 VM, proporción (DW: buffer) (1:14)				
3.1	0,385	0,013	0,004	0,000
3.2	0,350	0,012	0,008	0,000
3.3	0,557	0,019	0,033	0,001
3.4	0,842	0,028	0,075	0,002
3.5	0,422	0,014	0,059	0,002

Los resultados que se obtuvieron por medio del método de cuantificación de proteínas concuerdan con las estimaciones realizadas con el parámetro de pureza, la razón $A_{260/280}$.

Los valores porcentuales correspondientes al contenido proteico fueron calculados sobre una base de miligramos de proteína presentes en la matriz vegetal seca (también en miligramos). El contenido de proteínas, determinado pre filtración, varía entre 0,0032 y 0,046% para las muestras con la proporción DW: buffer (1:7), y entre 0,012 y 0,028% para las muestras en las que se utilizó el buffer de extracción en la proporción (1:14). Sin embargo, estos valores cambian luego de la filtración, donde para ambos tipos de muestras el contenido de proteínas baja prácticamente a cero.

Se puede decir que en las muestras analizadas hay un contenido significativo de proteínas, las cuales son removidas prácticamente en su totalidad cuando se realiza la filtración, como se puede observar en la figura 3.6.

Como se ha visto que las proteínas también tienen un rol en la acción de retardo del fuego, su presencia en estas muestras se puede considerar conveniente más que perjudicial, haciendo por lo tanto que sea poco aconsejable realizar filtraciones adicionales. Esto simplemente ayuda a destacar el hecho que, como fue antes mencionado, la filtración también remueve cantidades significativas de ácidos nucleicos.

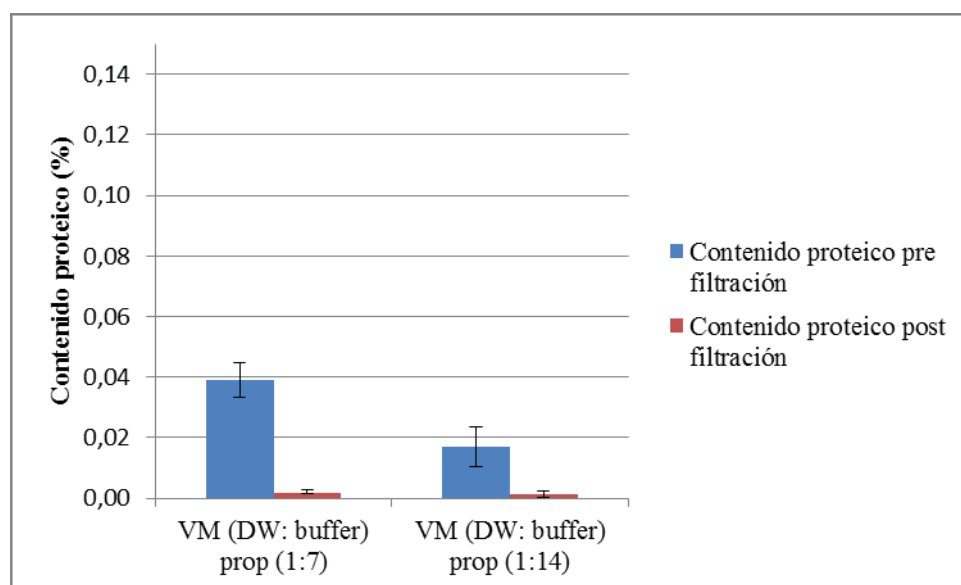


Figura 3.6: Contenidos proteicos medios pre y post filtración.

3.3 EXTRACCIÓN DE TEJIDOS VEGETALES MIXTOS II Y VERDURAS DE HOJA

Una vez que fueron definidos los parámetros relacionados con la temperatura de la precipitación en alcohol y con la proporción “DW matriz: peso buffer” para la extracción misma, se realizó un tercer set de ensayos utilizando y comparando dos nuevos lotes diferentes: uno consistía nuevamente de verduras mixtas (VM) mientras que el otro consistía de verduras de hoja (LV, proveniente de las palabras *leafy vegetables* en inglés).

Dado que la composición del lote de verduras mixtas era parecido, pero no igual al lote previo (ya descrito), debido a la variabilidad normal de los vegetales procesados, se debió realizar

una nueva determinación del peso seco. Simultáneamente, se realizó también una determinación del peso seco del lote de las verduras de hoja.

Al igual que antes, se tomaron muestras que fueron secadas a 105°C por 48 h que fue el tiempo en el que se obtuvo el peso constante.

Tabla 3.8: Peso seco para 100 g de material fresco.

	DW (g)
Verduras mixtas	7,43 ± 0,19
Verduras de hoja	6,94 ± 0,28

El hecho que el lote de verduras mixtas presente un peso seco (7,43 g) diferente al descrito previamente (9,08 g) podría ser explicado por la diferente composición de ambos, dado que el actual lote de verduras mixtas no presentaba el residuo del raspado de las líneas como el lote previo. Éste no tenía una influencia en el volumen del material, pero aparentemente sí influyó fuertemente en el peso, tanto húmedo como seco.

En este caso, ambos tipos de material presentan un peso seco bastante similar: 7,43 g las verduras mixtas y 6,94 g las verduras de hoja. Estos valores se ajustan a aquellos reportados en el punto 1.3 y la variabilidad que puede ser observada se debe la composición mixta de cada uno de los lotes de material residual, pero se mantienen en el rango del 11,4% y del 5% de peso seco que fue reportado para zanahorias y lechuga, respectivamente.

3.3.1 Efecto de las condiciones de almacenaje de la matriz vegetal: fresco o congelado.

Esta serie de ensayos fue realizada con el objetivo de determinar el efecto de la utilización del material vegetal en condiciones frescas y congeladas, que en este caso involucró muestras tanto de vegetales mixtos como de verduras de hoja.

Las variaciones en el tratamiento a las que fueron sometidas las muestras fueron todas al inicio del proceso de extracción, en las fases del pre-tratamiento.

El pre-tratamiento de las muestras fue realizado de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Las VM frescas fueron trituradas, primero en la licuadora, luego en el mortero.
- Las VM congeladas fueron congeladas enteras, descongeladas, trituradas en la licuadora y luego en el mortero.
- Las LV frescas fueron picadas con la medialuna y luego trituradas en el mortero.
- Las LV congeladas fueron congeladas enteras, descongeladas, picadas con la medialuna y luego trituradas en el mortero.

Posteriormente, el proceso de extracción fue igual para cada muestra, y realizado bajo las siguientes condiciones:

- Proporción DW matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 65°C por 30 min.
- Filtración con gasa.
- Precipitación en etanol durante la noche con proporción volumétrica 1:1, etanol con 99,8% pureza, temperaturas de -21°C.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 5 ml de agua destilada.

Los resultados obtenidos para cada muestra de estas pruebas se pueden ver en la siguiente tabla 3.9:

Tabla 3.9: Efecto del tratamiento inicial de la matriz en la pureza, concentración y rendimiento de los AN

	DW inicial (mg)	Pureza AN (A _{260/280})	AN extraídos (mg)	Y _{AN/DW} (%)
1 VM congeladas				
1.1	3113	1,17	4,303	0,14
1.2	3113	1,16	4,063	0,13
1.3	3117	1,17	4,351	0,14
2 VM frescas				
2.1	3148	1,14	1,999	0,06
2.2	3133	1,14	2,359	0,08
2.3	3126	1,14	2,256	0,07
2.4	3165	1,14	2,261	0,07
3 LV congeladas				
3.1	3323	1,13	3,518	0,11
3.2	3304	1,12	3,845	0,12
3.3	3302	1,13	3,852	0,12
3.4	3302	1,13	4,341	0,13
4 LV frescas				
4.1	3301	1,14	1,563	0,05
4.2	3271	1,12	2,261	0,07
4.3	3287	1,12	2,282	0,07
4.4	3286	1,14	2,229	0,07

A partir de estos resultados se puede observar que los rendimientos son más elevados para las matrices previamente congeladas. En ambos casos, es decir, verduras mixtas congeladas y verduras de hoja congeladas, los valores del rendimiento se encuentran en un rango entre 0,13 y 0,14% para las VM y 0,11 y 0,13% para las LV. Estos son valores prácticamente doblados respecto de los valores obtenidos para sus homólogos frescos, los cuales varían entre 0,06-0,8% y 0,05-0,07% para las verduras mixtas y las verduras de hoja, respectivamente. Estas diferencias pueden ser apreciadas más claramente en la figura 3.7.

También se puede observar una ligera diferencia entre los rendimientos obtenidos de las verduras mixtas y de las verduras de hoja: las primeras mostraron valores en torno al 0,135%

mientras que las segundas en torno al 0,125%, en ambos casos para las muestras inicialmente congeladas (como se muestra en la figura 3.7).

Al ser comparados los niveles de pureza de los extractos, dados por la relación $A_{260/280}$, los valores no fueron significativamente diferentes entre ellos, mostrando valores entre 1,12 y 1,17. Estos valores son similares a aquellos obtenidos en los ensayos previamente reportados (tabla 3.5, por ejemplo).

Los rendimientos más elevados calculados para las matrices congeladas se deben probablemente a la ruptura celular que ocurre durante los procesos de congelamiento y descongelamiento, lo cual es una ventaja para el proceso completo; esto es adicional a la ventaja que significa el congelamiento para la preservación del material.

El proceso de congelamiento también causa el reblandecimiento de los tejidos vegetales, tanto en las verduras mixtas como en las de hoja, pero es especialmente notorio en las hojas de ensalada que se vuelven muy fáciles de tratar.

Los rendimientos de AN obtenidos se pueden observar y comparar gráficamente en la figura 3.7. Como fue mencionado previamente, es fácil observar la diferencia de rendimiento entre las mismas matrices con diverso tratamiento inicial: congeladas (en azul y verde), las cuales prácticamente doblan a sus respectivas muestras frescas (en rojo y morado). Simultáneamente, las similitudes respecto de los tratamientos iniciales, no pueden ser ignoradas.

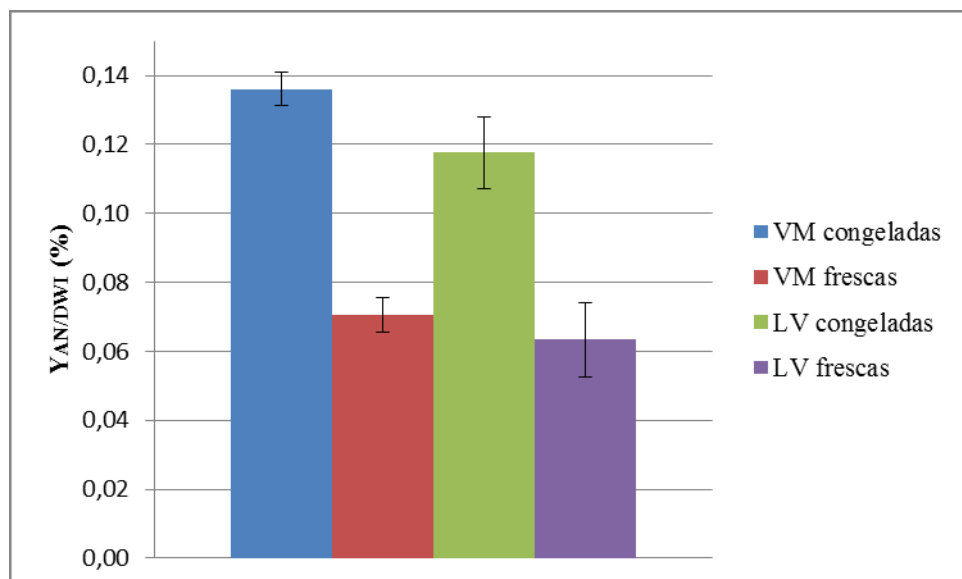


Figura 3.7: Influencia del pre-tratamiento en el rendimiento de AN.

3.3.3 Efecto de la pureza del etanol.

Este set de pruebas fue realizado para determinar la influencia de la pureza del etanol (99,8%; 96%, y 90%) en el proceso de precipitación. Esto podría servir a un doble propósito: si uno de ellos presenta una mejor tasa de precipitación de AN y, en consecuencia, un mejor rendimiento, se consigue un proceso más eficiente; en el caso de no observarse ningún impacto, serviría para desarrollar un proceso más económicamente rentable.

Las muestras fueron tomadas de hojas que habían sido congeladas enteras, descongeladas, picadas con medialuna y luego trituradas en mortero.

El proceso de extracción fue desarrollado bajo las siguientes condiciones:

- Proporción DW matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 65°C por 30 min.
- Filtración con gasa.
- Precipitación en etanol durante la noche con proporción volumétrica 1:1, etanol con 99,8%; 96%; y 90% de pureza, temperaturas de -21°C.

- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 5 ml de agua destilada.

Los resultados, comparando el efecto de los tres tipos de etanol en los dos tipos diferentes de matrices, verduras mixtas (VM) y verduras de hoja (LV), están reunidos en la tabla 3.10:

Tabla 3.10: Efecto de la pureza del etanol en la pureza, concentración y rendimiento de los AN.

	DW inicial (mg)	Pureza AN (A _{260/280})	AN extraídos (mg)	Y _{AN/DW} (%)
1 VM, etanol 99,8%				
1.1	3113	1,17	4,303	0,14
1.2	3113	1,16	4,063	0,13
1.3	3117	1,17	4,351	0,14
2 VM, etanol 96%				
2.1	3107	1,16	4,135	0,13
2.2	3114	1,17	3,067	0,10
2.3	3109	1,17	3,375	0,11
3 VM, etanol 90%				
3.1	3136	1,17	7,176	0,23
3.2	3140	1,17	4,908	0,16
3.3	3083	1,17	7,168	0,23
4 LV, etanol 99,8%				
4.1	3149	1,13	3,518	0,11
4.2	3131	1,12	3,845	0,12
4.3	3129	1,13	3,852	0,12
4.4	3130	1,13	4,341	0,13
5 LV, etanol 96%				
5.1	3117	1,14	4,118	0,13
5.2	3117	1,11	3,745	0,12
5.3	3106	1,12	4,568	0,15
5.4	3110	1,12	3,321	0,11
6 LV, etanol 90%				
6.1	3110	1,14	3,302	0,11
6.2	3117	1,15	4,741	0,15
6.3	3120	1,10	3,254	0,10
6.4	3117	1,09	6,345	0,20

Cuando se hace una comparación de los resultados que fueron obtenidos de este set de ensayos, es notable que los tres tipos de alcohol entregan buenos rendimientos, los cuales se encuentran en el rango de 0,1-0,23%, lo que significa que pueden ser comparados entre sí. De acuerdo a estos resultados, no existen diferencias notables al usar uno u otro tipo de etanol.

Se destaca, sin embargo, que el etanol de menor pureza (90%) muestra valores de rendimiento ligeramente más altos (entre 0,16-0,23%) que los otros dos (que varían entre 0,1 y 0,2%), aunque la variabilidad entre las muestras en las que se usó el etanol de menor pureza es significativamente más elevada que para los otros dos casos, lo cual puede ser observado en la figura 3.8. Este hecho apunta a la dificultad de la fase de recuperación del etanol, especialmente del de menor pureza.

Una vez más, la matriz consistente de verduras mixtas dio los resultados de rendimiento ligeramente más elevados, con valores alrededor del 0,21%, cuando se comparan las dos condiciones con los rendimientos más altos, pero las verduras de hoja constituyen la matriz que resulta más fácil de procesar. Y presentan un valor de rendimiento cercano al 0,14% (con una significativa variabilidad), el cual no es significativamente más bajo como para sacrificar la facilidad de su procesamiento.

Este comportamiento reúne las dos condiciones ideales que se esperaba poder analizar al principio de la experiencia: obtener mayores rendimientos a menores costos, dado que el etanol de menor nivel de pureza (90%) es también de costo significativamente menor que las otras dos formulaciones de mayor grado de pureza (99,8 y 96%).

Al analizar la pureza de los AN extraídos, los valores de la razón $A_{260/280}$ se encuentran en el rango 1,11-1,17 y parecen ser bastante similares en la mayoría de las muestras y también constantes respecto de los experimentos reportados previamente (vistos en las tablas 3.5 y 3.9).

Una vez más, los rendimientos pueden ser comparados visualmente en la figura 3.8, donde resulta evidente que las verduras mixtas recuperadas con el etanol al 90% (en verde) muestran rendimientos más elevados mientras que todas las otras muestras son bastante constantes en sus resultados.

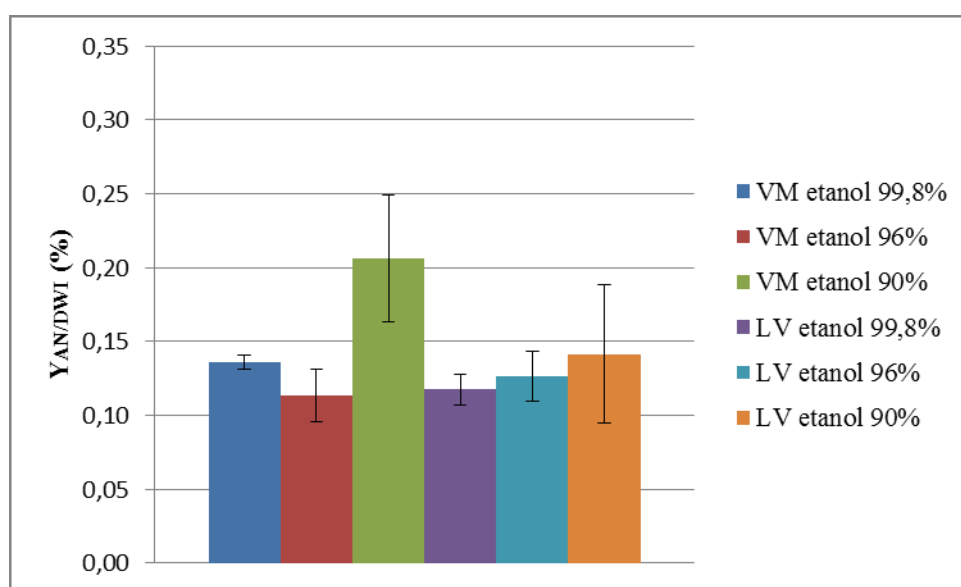


Figura 3.8: Rendimiento de AN obtenidos usando etanol con diversos grados de pureza.

3.4 EXTRACCIÓN ESCALADA DE HOJAS DE ENSALADA.

Todas las experiencias reportadas previamente y sus respectivos resultados tenían como objetivo la evaluación de la aplicabilidad del método de extracción elegido, y su potencial optimización.

La aplicabilidad fue probada, y con cada nuevo ensayo, un parámetro básico importante era evaluado y establecido, tal como la condición inicial de la matriz vegetal, el volumen del buffer (o la relación DW: buffer), temperatura y nivel de pureza del etanol a utilizar durante la precipitación.

Fue también decidido que el mejor material de extracción estaba constituido por los vegetales de hoja (también llamadas hojas de ensalada) ya que presentaban una mayor facilidad en su procesamiento y su relativamente alto rendimiento de extracción de AN.

Dado que todos estos parámetros ya estaban definidos, fue posible llevar a cabo un primer escalamiento del proceso aumentando cinco veces la cantidad inicial de material. Esto significó el cambio de algunas partes adicionales del proceso de modo de acomodar los nuevos volúmenes tratados, ya que algunos de los materiales previamente empleados no presentaban la capacidad requerida para las nuevas condiciones.

3.4.1 Evaluación del comportamiento térmico durante el escalamiento.

El proceso de escalamiento implica un aumento de volumen de los recipientes que se utilizan durante la extracción, o más específicamente, un aumento del diámetro. En este caso, el componente más afectado es el vaso precipitado que es utilizado durante la incubación con el buffer de extracción, lo que significa que un diámetro mayor aumenta el volumen y por ende el volumen de material tratado. Una cantidad diferente de material a tratar va a presentar un comportamiento diferente, en este caso, relacionado con los tiempos y patrones de calentamiento.

Dado que el proceso de calentamiento es diferente cuando los tamaños de las muestras cambian, es de suma importancia la reproducción a mayor escala del tiempo de incubación de la extracción, así como la homogeneidad térmica, de modo que para obtenerlas, debieron ser realizadas algunas pruebas considerando el proceso de calentamiento de las muestras.

El progreso de las temperaturas fue controlado tanto en las muestras a escala pequeña (de acuerdo al peso de la matriz tratada) como en las muestras de mayor volumen, las cuales corresponden a las antiguas y nuevas dimensiones. La temperatura del agua fue establecida de modo de obtener la misma en las muestras de ambas dimensiones.

El comportamiento de cada muestra de verduras de hoja (LV) puede ser observado en la figura 3.9, basado en la temperatura registrada a cada tiempo de medición.

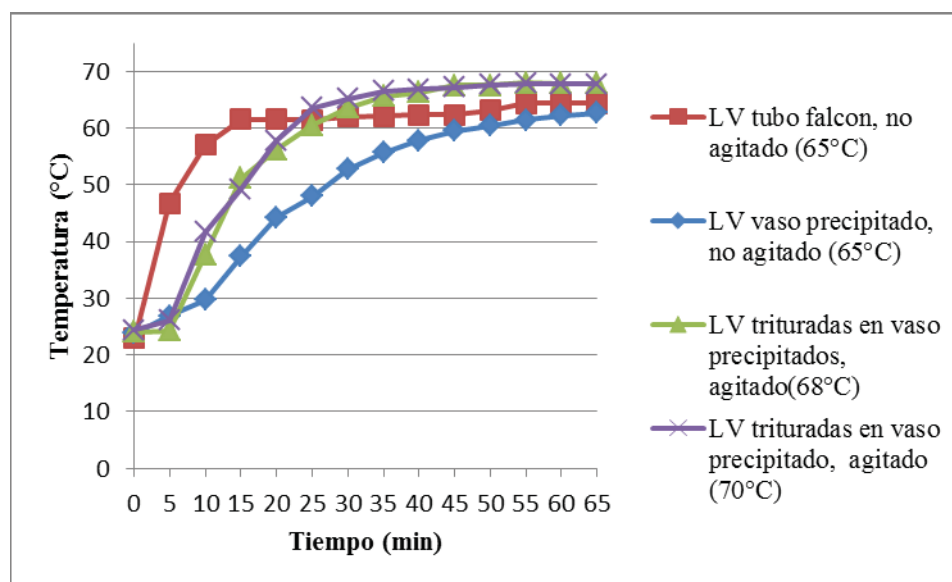


Figura 3.9: Tendencia de calentamiento de muestras de verduras de hoja de diversas dimensiones a varias temperaturas del baño de agua.

Todas las muestras comenzaron su proceso de calentamiento a temperaturas similares, 21 ó 22°C, la cual era la temperatura ambiental al interior del laboratorio. La curva roja representa el comportamiento térmico de las muestras originales incubadas en los tubos falcon: se puede observar que alcanzaron la temperatura máxima en un tiempo de entre 15-20 min. Dejando las muestras de mayor dimensión bajo las mismas condiciones (no agitadas en baño de agua a 65°C), tardaron alrededor de 60-65 min en alcanzar la misma temperatura máxima (curva azul).

Dado que el objetivo era alcanzar los 65°C para la extracción, se analizaron dos muestras más, con el baño de agua a 68°C y a 70°C, representadas por las curvas verde y morada, respectivamente. Ambas muestras fueron agitadas durante el proceso, por lo que alcanzaron los 60°C en prácticamente 25 min, y la temperatura constante en 40 min. De esta manera, durante todo el tiempo restante, las muestras quedaron a 68°C y 65°C estando en los baños de agua a 70°C y 68°C, respectivamente.

Este proceso de evaluación permitió definir la nueva temperatura del baño de agua y el tiempo requerido para la incubación, los cuales fueron fijados a 68°C y 60 min, respectivamente.

3.4.2. Extracción escalada.

El primer paso llevado a cabo al realizar el escalamiento fue el de comparar el procedimiento original con el procedimiento a escala superior, bajo las mismas condiciones o lo más similares como fuera posible.

Las muestras fueron tomadas de hojas de ensaladas (LV) que fueron congeladas, descongeladas, picadas con medialuna y luego trituradas en el mortero.

La extracción fue llevada a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Proporción PS matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 68°C por 60 min.
- Filtración con medias de nylon adaptadas y papel filtro.
- Precipitación en etanol durante la noche con proporción volumétrica 1:1, etanol con 90% de pureza, a temperaturas de -21°C.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 15 ml de agua destilada.

Los resultados obtenidos se observan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11: Efecto del escalamiento en la pureza, concentración y rendimiento de los AN.

	DW inicial (mg)	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/DW}$ (%)
1 LV, escala inicial				
1.1	3110	1,14	3,302	0,11
1.2	3117	1,15	4,741	0,15
1.3	3120	1,10	3,254	0,10
1.4	3117	1,09	6,345	0,20
2 LV, escala superior				
2.1	14004	1,11	18,3	0,13
2.2	14007	1,10	32,0	0,23
2.3	14000	1,10	35,7	0,25

El escalamiento superior, bajo las mismas condiciones, resultó ser exitoso. Los rendimientos obtenidos en el experimento escalado fueron buenos, variando entre 0,13 y 0,25%, que son valores ligeramente más altos que aquellos obtenidos en las extracción a escala inicial, donde los valores oscilan entre el 0,1 y 0,2%. Estos resultados comparados entre sí, pueden ser observados en la figura 3.10.

Los valores de la pureza obtenidos en el procedimiento escalado prácticamente no cambiaron respecto de la extracción realizada a escala original. El parámetro de pureza mantuvo sus valores en torno a 1,1; los cuales son marginalmente más bajos que los valores reportados previamente (tablas 3.9 y 3.10).

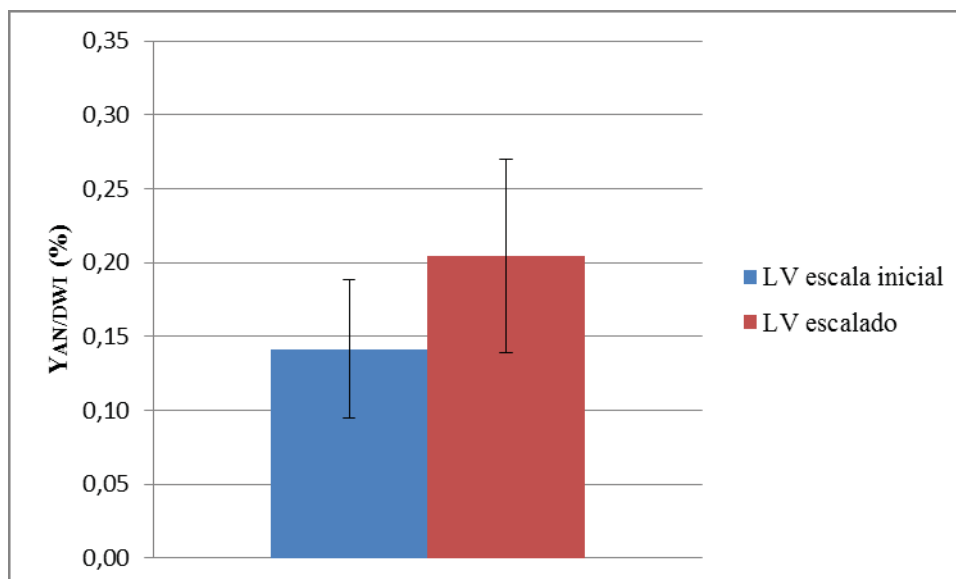


Figura 3.10: Rendimientos de AN obtenidos a diversa escala.

3.4.3 Efecto de la duración de la precipitación en etanol.

Ya que el proceso de escalamiento se puede considerar exitoso, se puede tratar de optimizar otro parámetro.

El tiempo de precipitación que ha sido utilizado en todos los experimentos previamente reportados correspondía a una duración de toda la noche (overnight), lo cual es un periodo bastante extendido, y por lo mismo, genera una elevada pérdida de tiempo. Por esto se decidió probar diferentes tiempos de precipitación, de menor duración, para determinar si esto podría presentar algún impacto en el proceso de extracción y recuperación completo.

Las hojas de ensalada fueron congeladas, descongeladas, picadas con medialuna y finalmente, trituradas con la licuadora manual, para ser tomadas las muestras.

Las condiciones bajo las cuales fue realizada la extracción, fueron las siguientes:

- Proporción PS matriz: buffer igual a (1:7).
- Incubación a 68°C por 60 min.
- Filtración con medias de nylon adaptadas y papel filtro.

- Precipitación en etanol con proporción volumétrica 1:1, etanol con 90% de pureza, a temperaturas de -21°C , con duración de 1, 2, 3 y 4 h.
- Recuperación de AN con centrifugación a 4100 RPM por 10 min y resuspensión del pellet en 15 ml de agua destilada.

Las muestras utilizadas en esta experiencia y sus respectivos resultados se reúnen en la tabla 3.12.

Tabla 3.12: Efecto de la duración de la fase de precipitación en la pureza, concentración y rendimiento de los AN.

	DW inicial (mg)	Pureza AN ($A_{260/280}$)	AN extraídos (mg)	$Y_{AN/DW}$ (%)
1 LV precipitación 4h				
1.1	14007	1,11	46,3	0,33
1.2	14004	1,10	47,8	0,34
1.3	13997	1,11	46,6	0,33
1.4	14067	1,11	40,8	0,29
1.5	13976	1,11	36,8	0,26
2 LV precipitación 3h				
2.1	14018	1,12	32,6	0,23
2.2	14014	1,07	32,5	0,23
3.2	14018	1,00	30,6	0,22
3 LV precipitación 2h				
3.1	14025	1,12	26,3	0,19
3.2	14025	1,11	35,7	0,25
3.3	14049	1,11	24,3	0,17
4 LV precipitación 1h				
4.1	14004	1,08	11,5	0,08
4.2	14007	1,09	12,8	0,09

De los resultados obtenidos se puede concluir rápidamente que la duración de la precipitación tiene un efecto significativo en el rendimiento de la extracción. Los mejores rendimientos, cuyos valores se encuentran entre el 0,26 y 0,33%; son obtenidos con una fase de precipitación de 4 h de duración. Los valores del rendimiento decrecen con cada periodo más corto de precipitación: del 0,225% con 3 h a un valor mínimo del 0,08% con 1 h de precipitación.

La precipitación de 4 h de duración entrega valores de rendimiento incluso más altos que la extracción escalada original descrita en el punto 3.4.2. Los valores de rendimiento, en torno al 0,21-0,22%, para las muestras con la precipitación de 3 y 2 horas, respectivamente, son similares a los valores obtenidos con la precipitación *overnight* del proceso escalado (figura 3.10).

Por alguna razón, los valores de la pureza también presentan una muy ligera disminución correspondiente a la disminución de los tiempos de precipitación, pero en general se mantienen bastante constantes en torno al valor 1,1.

En la figura 3.11 se muestran estos resultados, en los cuales se evidencia además la disminución del rendimiento respecto de la reducción del tiempo de precipitación.

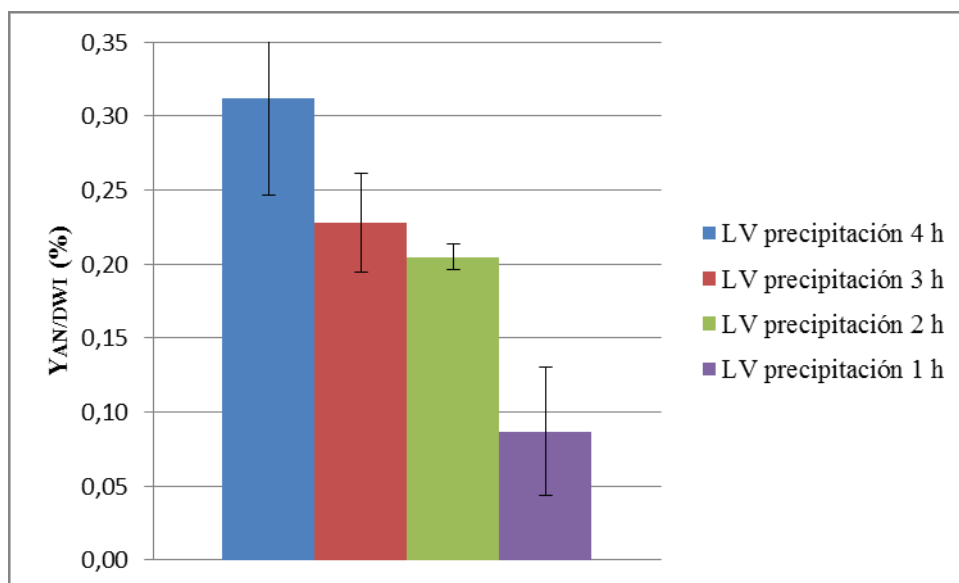


Figura 3.11: Rendimientos medios de AN obtenidos con diversos tiempos de precipitación.

3.5 RESISTENCIA AL FUEGO DE MUESTRAS DE TELA TRATADA.

Los trozos de algodón que servían como muestras fueron tratados como fue descrito en el capítulo 2.6 y luego sometidos a las pruebas, también descritas previamente, en el punto 2.7.4.

La solución, con la cual fueron tratados los trozos de algodón, fue una combinación de los extractos de tres de los experimentos escalados. La solución tenía un volumen de 120 ml y presentaba una concentración de 1,7 mg AN/ml.

Después de la impregnación, los trozos de algodón presentaron un aumento de peso del 5% (imperceptible al tacto) y que está registrado en la tabla 3.13, en la quinta columna. La textura de la tela cambió de suave, liviana y flexible a ser tiesa, similar a un trozo de cartón delgado. El color cambió del típico blanco crema del algodón sin teñir a un café verdoso poco atractivo. Las muestras recién impregnadas pueden ser observadas en la figura 3.12.

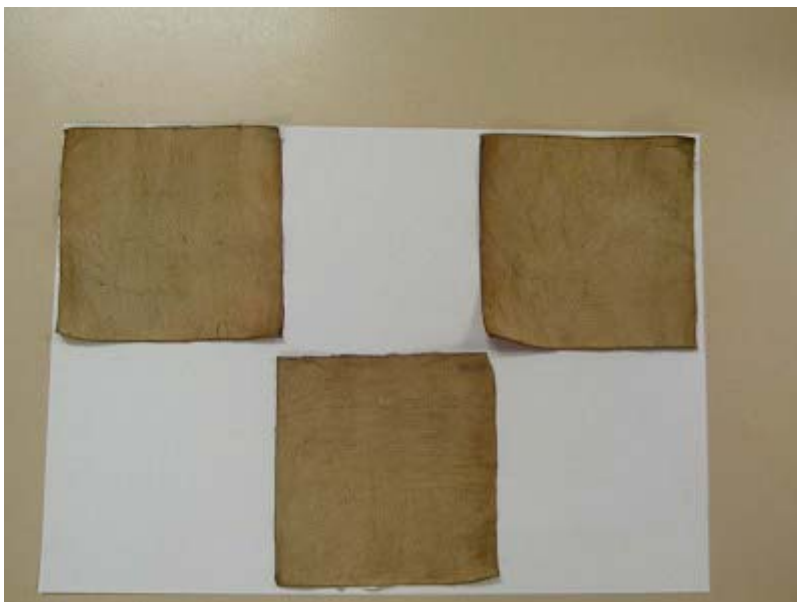


Figura 3.12: Trozos de algodón impregnados con el extracto de hojas de ensalada, sobre una hoja de papel.

Los trozos de algodón tratados fueron cortados por la mitad para realizar las pruebas de inflamabilidad, las cuales fueron llevadas a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.7.4. Los resultados obtenidos de estas pruebas se muestran en la tabla 3.13 y en la figura 3.13.

Tabla 3.13: Pruebas de resistencia al fuego.

Muestra	Tiempo combustión (s)	Velocidad combustión (mm/s)	Residuo (%)	AO%
Algodón no tratado	72	1,5	0	-
1 ^a	85	1,18	4	4,79
1b	86	1,16	4	4,79
2 ^a	82	1,22	6	4,96
2b	73	1,37	3	4,96
3 ^a	84	1,19	5	4,91
3b	79	1,27	4	4,91

Los valores del *add-on* están todos en torno al 5%, los cuales, como fue dicho previamente, fueron los valores máximos que se pudieron obtener. El proceso de impregnación para estos trozos fue repetido 5 veces, y la diferencia en los valores del *add-on* entre la cuarta y quinta repetición, fue despreciable, por lo que quedaba claro que las muestras ya no absorberían cantidades significativas del extracto, o incluso podrían haber comenzado el proceso inverso, de lavado.

Los tiempos de combustión para todas las muestras, exceptuando una, se encuentran sobre los 80 s, mayores que los del algodón no tratado. Al mismo tiempo, las velocidades de combustión, variantes entre 1,16 y 1,37 mm/s, son menores para las muestras tratadas que para la tela no tratada, cuyo valor es de 1,5 mm/s.



Figura 3.13: Residuos de tela de algodón después de las pruebas de Resistencia al fuego.

Los residuos que quedaron luego de las pruebas de resistencia son prácticamente despreciables, los restos rectos de color café claro, que pueden ser observados en la figura 3.13, son las partes de las muestras que estaban siendo sujetadas por el marco durante la prueba misma.

4 CONCLUSIONES.

Con respecto al desarrollo del proceso de extracción y recuperación de biomacromoléculas de materia residual vegetal, se logró desarrollar un método que puede ser considerado simple, económico y con bajo impacto ambiental. Los pasos constituyentes de este proceso de extracción fueron pocos y simples, para los cuales tampoco fueron necesarios implementos complejos ni aparatosos para llevarla a cabo. En ese mismo sentido, las dos soluciones necesarias para completar, primero, la extracción y, luego, la recuperación de los ácidos nucleicos, son fáciles de obtener y preparar (en el caso del solvente de extracción), de bajos costos y con muy bajas propiedades nocivas o contaminantes.

Las hojas de ensalada fueron la matriz de extracción que se consideró como la más adecuada de entre las varias diferentes que fueron probadas. Aun cuando algunos de los tejidos vegetales mixtos mostraron rendimientos de extracción ligeramente más altos que las verduras de hoja, su procesamiento era más fácil y rápido, al tiempo que su selección y recolección desde las líneas de producción y residuos, resultaba mucho más simple. Otro factor de especial relevancia hace referencia a la naturaleza estacional de las verduras: las verduras mixtas presentan una significativa mayor variabilidad estacional que las hojas de verdura, las cuales nuevamente las define como más apropiadas para el uso como matriz de extracción proveniente de los residuos de la agroindustria.

Durante el desarrollo del proceso fue posible establecer las mejores condiciones para la extracción y recuperación. Específicamente:

- Utilizando una matriz vegetal inicial congelada y triturada en dos instancias.
- Usando una proporción de “peso seco de la matriz: peso del buffer” equivalente a 1:7.
- Usando un etanol al 90% para la precipitación de los ácidos nucleicos.
- Realizando la precipitación en etanol a -21°C durante 4 horas.

La matriz vegetal congelada inicialmente presentó la ventaja de una ruptura más fácil del tejido vegetal a la vez de rendimientos de extracción más elevados. La proporción del buffer de extracción definitiva presentó la ventaja de ser un volumen relativamente reducido al tiempo que presentaba rendimientos de extracción ligeramente mayores que las otras proporciones probadas. El etanol al 90% de pureza mostró la ventaja de un desempeño levemente mejor que aquellas soluciones de mayor grado de pureza durante el proceso de extracción y un costo significativamente menor. Las condiciones de precipitación fueron definidas debido a los rendimientos de extracción obtenidos y a los intervalos de tiempo requeridos durante el proceso, los cuales fueron reducidos significativamente del proceso “*overnight*” que había sido el inicialmente establecido como estándar.

De los diversos ensayos realizados, para optimizar el proceso de extracción, a medida que se progresaba, se obtuvieron mejores resultados con cada nueva experiencia, al menos en cuanto al rendimiento de extracción, y en menor grado también la pureza del extracto. Los rendimientos obtenidos, en particular de las pruebas escaladas, cuando fueron comparadas con los datos encontrados en literatura y reportados en el capítulo 1.3, se encuentran dentro de los rangos entregados (0,02-0,7 μg DNA/ mg tejido fresco). Sin embargo, los valores obtenidos durante estos experimentos corresponden a extractos que no son de alta pureza, lo cual puede presentar algunas desviaciones respecto de los valores reales. Estas desviaciones pueden ser causadas por interferencias durante las mediciones de absorbancia, pero aun tomando en cuenta estos factores, los valores de rendimiento obtenidos se encuentran dentro de los rangos esperados.

La presencia de proteínas es significativa en la solución recuperada, pero en ningún caso indeseable, ya que presentan un efecto similar a los ácidos nucleicos cuando son utilizados como agentes de retardo al fuego. Y aun si se trata de removerlas mediante filtración, este proceso no solo elimina proteínas, sino también los ácidos nucleicos, lo cual es contraproducente para todo el proceso de recuperación.

En cuanto a la resistencia al fuego de los trozos de algodón tratados con los extractos obtenidos de las hojas de ensalada, éstos no se comportaron de la manera esperada. Se quemaron dejando residuos mínimos, aunque a una velocidad reducida respecto del algodón no tratado. Esto quiere decir que, bajo las presentes condiciones, los extractos vegetales no son muy eficientes como agentes de retardo del fuego. Serían necesarios algunos ensayos adicionales para obtener respuestas más definidas. Algunos pasos de purificación adicionales podrían resultar útiles también para eliminar, al menos parcialmente, los agentes colorantes presentes en el extracto y que podrían estar colaborando con la combustión al tiempo que manchan la tela.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2004. *Public Health Statement: Polybrominated Diphenyl Ethers*, s.l.: Department of Health and Human Services, Public Health Service.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2009. *Draft Toxicological Profile for Phosphate Ester Flame Retardants.*, s.l.: United States Department of Health and Human Services.

Alongi, J. y otros, 2014. Caseins and Hydrophobins as novel green flame retardants for cotton fabrics.. *Polymer Degradation and Stability*, pp. 111-117.

Alongi, J. y otros, 2013. DNA: a novel, green, natural flame retardant and suppressant for cotton.. *Journal of materials Chemistry*, pp. 4779-4785.

Andresen, J., Grundmann, A. & Bester, K., 2004. Organophosphorus flame retardants and plasticisers in surface waters. *Science of the total Environment*, pp. 332:155-166.

Bosco, F. y otros, 2013. Thermal stability and flame resistance of cotton fabrics treated with whey proteins. *Carbohydrate Polymers*, pp. 372-377.

Bradford, . M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, p. 248–254.

Briard, M. y otros, 2000. Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP analysis using silver stain or radioisotopes.. *Plant Molecular Biology Reporter*, pp. 235-241.

Camarasa, J. G. & Serra-Baldrich, E., 1992. Allergic contact dermatitis from triphenyl phosphate. *Contact Dermatitis*, 26(4), pp. 264-265.

Carboni, G., 2007. *How to extract DNA from fruits*. [En línea] Disponible en: http://www.funsci.com/fun3_en/dna/dnaen.htm [Último acceso: Octubre 2015].

Chapin, R. E., Sloane, R. A. & Haseman, J. K., 1997. The relationships among reproductive endpoints in Swiss mice, using the reproductive assessment by Continuous Breeding database.. *Fundamental and applied Toxicology*, pp. 38:129-142.

- Cheng , Y.-J. y otros, 2003. An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus species.. *Plant Molecular Biology Reporter*, pp. 177a-177g.
- De Nola, G., Kibby, J. & Mazurek, W., 2008. Determination of ortho-cresyl phosphate isomers of tricresyl phosphate used in aircraft turbine engine oils by gas chromatography and mass spectrometry.. *Journal of Chromatography A.*, Volumen 1200 (2), pp. 211-216.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks, J. B., 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, pp. 19-21.
- DuPont, s.f. *Flame resistant technology, Inherent versus treated flame resistant fabrics*. [En línea] Disponible en: <http://www.dupont.com/products-and-services/personal-protective-equipment/thermal-protective/articles/flame-resistant-technology.html> [Último acceso: 25 Agosto 2015].
- Echevarría-Machado, I. y otros, 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, pp. 129-135.
- Enachescu Dauty, M., 1995. Fruit and vegetable processing. *FAO Agricultural Services Bulletin, No.119*.
- Gigli, A. & Rosace, G., 2013. *Finissaggi tessili ritardanti di fiamma*, s.l.: s.n.
- Guillemaut, P. & Maréchal-Drouard, L., 1992. Isolation of Plant DNA: a fast, inexpensive, and reliable method. *Plant Molecular Biology Reporter*, pp. 60-65.
- Hartmann, P. C., Bürgi, D. & Giger, W., 2004. Organophosphate flame retardants and plasticizers in indoor air.. *Chemosphere*, p. 57: 781–787.
- Hites, R. y otros, 2004. Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon.. *Environmental Science and Technology*, pp. 4945-4949.
- Kimbrough, K. y otros, 2009. *An assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Sediments and Bivalves of the U.S. Coastal Zone.*, Silver Spring, MD: s.n.
- Lassen, C. & Lokke, S., 1999. *Brominated Flame Retardants: Substance Flow Analysis and Assessment of Alternatives. DK EPA Report No. 494*, s.l.: Danish Environmental Protection Agency (EPA),.

- Lassen, C. & Lokke, S., 1999. *Danish Environmental Protection Agency (EPA), Brominated Flame Retardants: Substance Flow Analysis and Assessment of Alternatives.*, s.l.: DK EPA Report No. 494.
- Latendresse, J. R., Brooks, C. L. & Capen, C. C., 1994. Pathologic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate on the adrenal gland, ovary, and testis in the Fischer-344 rat.. *Toxicologic Pathology*, pp. 22:342-352.
- Leisewitz, A., Kruse, H. & Schramm, E., 2000. *Substituting Environmentally Relevant Flame Retardants: Assessment Fundamentals. Results and Summary Overview.*, s.l.: Environmental Research Plan of the German Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety, Research, Report 297 44 542 (Diciembre).
- Lintas, C., 1992. Nutritional aspects of fruit and vegetable consumption. *Les fruits et légumes dans les économies méditerranéennes : actes du colloque de Chania*, pp. 78-87.
- Murray, M. & Thompson, W., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, pp. 4321-4325.
- Ni, Y., Kumagai, K. & Yaganisawa, Y., 2007. Measuring emissions of organophosphate flame retardants using a passive flux sampler.. *Atmospheric Environment*, p. 41: 3235–3240.
- Pakalin, S. y otros, 2007. *Review on Production Processes of Decabromodiphenyl Ether (decaBDE) Used in Polymeric Applications in Electrical and Electronic Equipment, and Assessment of the Availability of Potential Alternatives to decaBDE*, s.l.: European Report EUR 22693 EN.
- Regnery, J. & Püttman, W., 2010. Occurrence and fate of organophosphorus flameretardants and plasticizers in urban and remote surface waters in Germany.. *Water Research*, pp. 44:4097-4104.
- Rodríguez, I. y otros, 2006. Suitability of solid-phase microextraction for the determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in water samples. *Journal of Chromatography A*, pp. 1108:158-165.
- Saboori, A., Lang, D. & Newcombe, D., 1991. Structural requirements for the inhibition of human monocyte carboxylesterase by organophosphorus compounds.. *Chemico-Biological Interactions*, 80(3), pp. 327-338.

Sew What? Inc., s.f. *Flame Retardancy, Fabric Flammability*. [En línea] Disponible en: http://www.sewwhatinc.com/fr_flammability.php [Último acceso: 25 Agosto 2015].

Shewfelt, R. L., 1990. Sources of variation in the nutrient content of agricultural commodities from the farm to the consumer.. *Journal of Food Quality*., pp. 37-54.

Sigma Aldrich, 2011. *Sigmaaldrich*. [En línea] Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com> [Último acceso: Septiembre 2015].

Suquilanda, M., 2003. *Produccion organica de hortalizas*.. Quito: Publiasesores.

Tilson, H., Veronesi, B., McLamb, R. & Mathews, H., 1990. Acute exposure to tris(2-chloroethyl) phosphate produces hippocampal neuronal loss and impairs learning in rats.. *Toxicology and applied pharmacology*, Issue 106 (2), p. 254–269.

TyndaleFRC, 2014. *ASTM D6413: Vertical Flame test for flame resistance of textiles*. [En línea] Disponible en: <http://blog.tyndaleusa.com/2014/02/10/astm-d6413-vertical-flame-test-for-flame-resistance-of-textiles/> [Último acceso: Agosto 2015].

Umezu, T., Yonemoto, J. & Suzuki, T., 1998. Tris(2-chloroethyl)phosphate increases ambulatory activity in mice: pharmacological analyses of its neurochemical mechanism.. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Issue 148(1), pp. 109-116.

van der Veen, I. & de Boer, J., 2012. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis.. *Elsevier Chemosphere*, pp. 1119-1153.

Wan, Y., Hu, J., Zhang, K. & An, L., 2008. Trophodynamics of polybrominated diphenyl ethers in the marine food web of Bohai Bay, North China.. *Environmental Science and Technology*, p. 1078–1083 .

WHO, 1998. *EHC 209: Flame Retardants: Tris-(Chloropropyl)Phosphate and Tris-(2-Chloroethyl)phosphate*, Geneva, Switzerland.: s.n.