



INFORME PERIODO 2014-2015

1. APELLIDO: Garro

NOMBRES: María Laura

TÍTULO: Doctora en Ciencias Veterinarias...**Dirección Electrónica.** marialgarro@hotmail.com

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría: Profesional Asistente.....enero.....año.....2000

ACTUAL: Categoría: Profesional Adjunto.....noviembre..año.....2009

3. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN LOS CUALES COLABORA

a) Depilado libre de sulfuro de sodio .Empleo de preparados enzimáticos como agentes depilantes

b) Valorización de residuos sólidos de curtiembre: Biotransformación Fúngica del residuo pelo vacuno.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre: Hours, Roque

Cargo Institución: Vicedirector CENT. DE INV EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES- CINDEFI-.CONICET-UNLP. Investigador Independiente CONICET

Dirección: Calle 47 y 115 - Fac. Cs. Exactas UNLP. C.P...1900. Prov. Bs. As. Tel. 0221-483-3794, int. 112

Dirección Electrónica: hours@biotec.org.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Centro de Investigación y Tecnología del Cuero-CITEC.

Dependencia: INTI-CIC

Dirección: Calle: Campus Tecnológico CIC. Camino Centenario y 505, MB GONNET. (1897). Prov. Buenos Aires

Teléfono/Fax: (0221) 484-1876 / (0221) 484-0244

6. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....

Dependencia.....

Dirección: Calle.....Nº.....

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

Galarza, B.; Garro, ML.; Gortari, C.; Martegani, J. (2014). Tecnología limpia en la curtiembre; aplicación de enzimas fúngicas y su evaluación mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB). Biotecnología Moderna Avances. ISSN 1027-2860. Vol. 5. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba.

Galarza B., Garro ML., Martegani J., Hours R. "Characterization and evaluation of a fungal enzymatic pool with unhairing activity" en redacción para ser enviado a la revista Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, ISSN 0144-0322, Ed. University of Northampton, UK.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

Curso: Procesos Evolutivos de Residuos Orgánicos. Producción de Lombricompuesto. Dictado por el Profesor Jorge Lanfranco. 60 horas con evaluación: 10 puntos. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. La Plata, Segundo semestre de 2014.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

XVI Congreso y 13^{avas} Jornadas de Educación de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. 18 y 19 de septiembre 2014. Póster: "Preparación de muestras de piel bovina para su observación mediante Microscopía Electrónica de Barrido". Garro ML, Sarmiento P, Galarza BC, Hours RA.

IX Encuentro Anual Biólogos en Red. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata. 20 y 21 de noviembre de 2014. Póster: Comparación de metodologías de procesamiento y obtención de imágenes a partir de muestras de piel caprina. Su utilidad en la evaluación de los diferentes componentes tisulares en distintas etapas del proceso de producción de cueros". Scelsio N, Martegani J, Mazzilli G, Garro ML, Markán A, López L.

Trabajos enviados y aceptados durante el periodo para ser presentados en:

- II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental
II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental.
Buenos Aires, 1 al 4 de diciembre de 2015. Póster: Compostaje de un residuo sólido de curtiembre The tannery solid waste as compost. Garro ML; Galarza BC ; Sarmiento P; Greco A; Hours RA.
- XVII Congreso de Ciencias Morfológicas y 14º Jornadas de Educación - *Centro Científico y Tecnológico- CCT- CONICET- La Plata, Calle 8 N° 1467*. 10 y 11 de septiembre de 2015. Póster: Proceso de transformación del "residuo pelo" de bovino en compost.
Garro ML; Sarmiento P; Galarza BC; Hours RA
- 33th Congress of International Union of Leather Technologists and Chemists Societies
Universidade Feevale, Novo Hamburgo- RS (BRASIL). 24-27 November 2015. Póster: Characterization and evaluation of fungal enzymatic pool with unhairing activity.
Galarza B, Garro ML, Martegani J, Hours R.

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

No acreditado.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES. (En este punto se indicará todo lo que se considere de interés para una mejor evaluación de la tarea cumplida en el período).

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio)

ÍNDICE

Actividad desarrollada en el periodo:

- Valorización del residuo pelo mediante procesos de compostaje y vermicompostaje utilizando la especie

Eisenia foetida: p.5

Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido.p.5-7

Parámetros necesarios para lograr la

degradación biológica del residuo pelo.p.8-10

- Empleo de preparados enzimáticos como agentes depilantes....p.11-12

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO (Debe exponerse la actividad desarrollada, técnicas empleadas, métodos, etc. en dos carillas como máximo, en letra arial 12, a simple espacio

- **“Valorización del residuo pelo mediante procesos de compostaje y vermicompostaje utilizando la especie *Eisenia foetida*”**
 - Determinaciones: pH, Conductividad Eléctrica (CE), Concentración de Amonio Soluble (Método de la urea modificado), materia orgánica (MO), Concentración de proteínas (Bradford), Acidos húmicos (relación de absorbancias 472 nm/664 nm).
 - Muestras analizadas: 1/8, 8/8, 15/8, 29/9, 7/11 y 9/12.

En el transcurso de este período continuamos con el análisis de los parámetros necesarios para lograr la degradación biológica del residuo pelo a escala de laboratorio y de este modo poner a punto una técnica de compostaje que permita transformar el residuo pelo de curtiembre en una enmienda con distintas aplicaciones. Las determinaciones se realizaron en las mezclas de las distintas combinaciones de este residuo (RP) (lavado y secado), con estiércol de conejo (E) y restos vegetales (V) [hojas de roble (*Quercus pubescens*) y álamo (*Populus alba*)] almacenadas en unidades compostadoras de 44 dm³ durante 36 semanas con volteos e hidratación periódicos. Con muestras extraídas a distintos tiempos se prepararon extractos acuosos con una proporción 1:4 (mezcla-agua bidestilada). Se determinaron pH, conductividad eléctrica (CE), concentración de amonio soluble (método de la urea modificado), concentración de proteínas solubles (método de Bradford), materia orgánica (MO) (combustión seca a 430°C) y la relación de absorbancias a 280 nm, 472 nm y 664 nm de los ácidos húmicos previa extracción con NaOH 1 M en condiciones reductoras de las Muestras: 1/8, 8/8, 15/8, 29/9, 7/11 y 9/12.

Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 1, 2 y 3 .Es posible concluir que a lo largo de todo el proceso el pH se mantuvo entre 6-8; la CE entre 4 mS/cm y 15 mS/cm; la máxima concentración de proteínas (576 ug/ml) se dio en el día 21 en la mezcla 1:6 RP, 1/6 V y 1/6 E; la producción de amonio alcanzó valores elevados durante todo el proceso (entre 400 y 4000 ppm); MO entre 75-80%; la relación de absorbancias a 472 nm/664 nm indicó un buen proceso de humificación en la mezcla (M4) con 2/3 partes de RP, 1/6 E, 1/6 V. A su vez la CE elevada restringe el uso como enmienda orgánica a pesar de haber logrado la humificación en la M4.

- Preparación de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido

Al mismo tiempo con el propósito de observar los cambios morfológicos generados después de 60 días de compostar el pelo bovino con hojas y estiércol de conejo, se prepararon muestras de esta mezcla según el siguiente protocolo: Porciones de mezcla compuesta en su mayoría por hojas (3 x 3mm) se colocaron dentro de tubos Eppendorf para ser deshidratadas, dentro del mismo recipiente se enjuagaron bajo agitación con tres cambios de 15 min en etanol (50 % y 70 %); el día de la observación microscópica se realizó un último cambio en etanol 100 %. Completado el procedimiento, el material fue montado bajo lupa y metalizado para la observación y fotografiado con Microscopio Electrónico de Barrido Jeol 6360 LV del Servicio de Microscopía Electrónica, Museo de La Plata. Fue posible observar la adherencia del pelo a la

superficie de la hoja (Fig. 1a) y la ruptura y separación de las capas que lo rodean en la semana 30 de incubación (Fig. 1b). Se adjuntan fotos del pelo recogido de depilado de curtiembre lavado y secado antes de incorporarse a la mezcla (Fig. 2 a y b).



Figura 1. Pelos incubados 60 días con hoja. **a.** Lupa estereoscópica 10X **b.** MEB 600X.

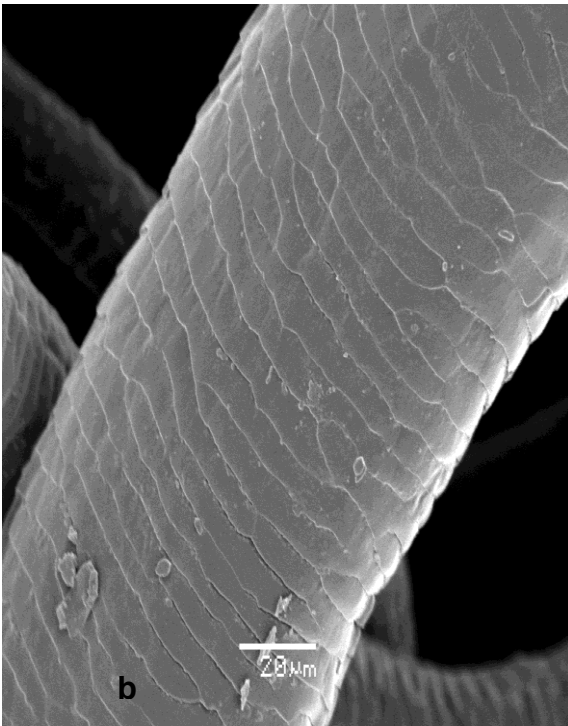
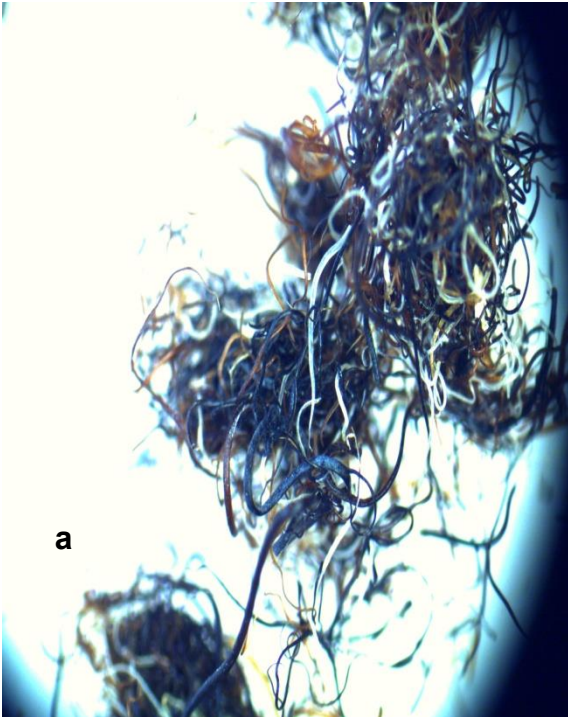


Figura 2. Pelo lavado y secado sin tratar. **a.** Lupa estereoscópica 4X .**b** MEB 850X

Tabla 1: Caracterización del compostaje de mezclas de residuo pelo vacuno (P), estiércol de conejo (E) y hojas (V) al 01/agosto/2014 y 08/agosto/2014. Determinaciones: pH, Conductividad Eléctrica (CE), Concentración de Amonio Soluble (Método de la urea modificado), Concentración de proteínas (Bradford), Acidos húmicos (relación de absorbancias 472 nm/664 nm).

Muestra 1/8/14 (P)(E)(V)	%MO	pH	CE	NH ₄ ppm	Prot µg/ml	Ác. Húmicos A _{472/664}
1 1/6-1/6-1/6	77.7	7	7,56	646,25	172,48	6,02
2 1/6-2/3-1/6	78,25	7,5	8,01	428,25	139,16	5,10
3 1/6-1/6-2/3	81	9	7,3	635	270,83	1,55
4 2/3-1/6-1/6	79.35	9	12,95	6545	144,16	4,26

Muestra 8/8/14 (P)(E)(V)	%MO	pH	CE	NH ₄ ppm	Prot µg/ml	Ác. Húmicos A _{472/664}
1 1/6-1/6-1/6	76.5	7,5	5,54	323,75	395,83	5,00
2 1/6-2/3-1/6	78,8	8	8,01	316	227,5	5,39
3 1/6-1/6-2/3	81	9	7,3	348,75	129,16	6,69
4 2/3-1/6-1/6	79,35	9	12,95	363,75	76,75	7,02

Muestra 15/8/14	%MO	pH	CEm S	NH ₄ ppm	Prot µg/ml	Ác. Húmicos A _{472/664}
1	77.85	8	7,46	3118,75	576,75	6,14
2	77	7	7,98	2350	474,07	5,60
3	79,3	7,5	4,68	2856	269,01	8,49
4	82,8	8	7,11	2312,5	357,45	6,75

Muestra 29-9-14	%MO	pH	CEmS	NH ₄ ppm	Prot µg/ml	Ác. Húmicos A _{472/664}
1	76,25	7,5	10,59	3000	399,55	4,89
2	83.9	7,5	10,3	3681,25	264,47	5,37
3	75,75	8	6,34	3681,25	47,145	7,62
4	77.3	7	9,17	3850	135,52	6,87

Tabla 2: Caracterización del compostaje de mezclas de residuo pelo vacuno (P), estiércol de conejo (E) y hojas (V) al 15/agosto/2014 y 29/setiembre/2014. Determinaciones: pH, Conductividad Eléctrica (CE), Concentración de Amonio Soluble (Método de la urea modificado), Concentración de proteínas (Bradford), Acidos húmicos (relación de absorbancias 472 nm/ 664 nm).

Tabla 3: Caracterización del compostaje de mezclas de residuo pelo vacuno (P), estiércol de conejo (E) y hojas (V) al 07/noviembre/2014 y 09/diciembre/2014. Determinaciones: pH, Conductividad Eléctrica (CE), Concentración de Amonio Soluble (Método de la urea modificado), Concentración de proteínas (Bradford), Acidos húmicos (relación de absorbancias 472 nm/ 664 nm).

Muestra 7-11-14	%MO	pH	CE mS	NH4 ppm	Prot, µg/ml	Ac. Húmicos <small>A_{472/664}</small>
1	70.3	7	15.03	2968,75	38,75	7,40
2	71.8	7	12.32	2700	92,79	5,74
3	74.3	7	5.73	2862,5	ND	5,44
4	75.9	7	13,80	2831,25	16,75	6,38

Muestra 9-12-14	%MO	pH	CE mS	NH4	Prot, µg/ml	Ac. Húmicos <small>A_{472/664}</small>
1	69.7	7	8.54	2543,75	ND	5,29
2	71.2	7	9.31	4368,75	ND	5,8
3	75	8	7.69	3493,75	ND	6,12
4	72.7	6	11.60	2612,5	ND	4,9

- **Empleo de preparados enzimáticos como agentes depilantes**

Continuando con lo realizado en la etapa anterior con el objetivo de confinar la actividad proteolítica de las enzimas a la epidermis, folículo piloso/pelo y membrana basal para ocasionar una completa remoción de estos componentes, en este periodo se procesaron muestras recolectadas al finalizar cada una de los pretratamientos aplicados del lado pelo sobre trozos de 9 cm de diámetro de piel bovino (fresca y conservada en sal) colocados sobre placa de petri de modo tal de permitir el contacto con el lado pelo de los siguientes reactivos:

Durante 2 horas: **1)** Sulfito de sodio 0,123 g/100 ml (1,23 g/l) y **2)** Tensioactivo Isogras AN 1%. **3)** En una tercera muestra en la primera etapa se le agregó solución de sulfito de sodio igual a **(1)** durante 2 horas, a continuación se extrajo esta solución con pipeta de plástico descartable y se cubrió con 20 ml de enzima comercial “purga enzimática R2-48582” (0,5 g/l) durante 3 horas.

Se utilizó como control **(4)** piel cubierta con 20 ml de buffer bicarbonato durante 5 horas. Las diluciones se realizaron con buffer bicarbonato 3 g/l pH 8,5.

A continuación las pieles se sumergieron en fulones de 5 litros en los que se sometieron durante 24 horas a las etapas de “Remojo” utilizando tensioactivo Azymol 6SE (Pellital SA, Argentina) y biocida y “Depilado” con sulfuro de sodio y cal hidratada.

Al finalizar las etapas mencionadas las muestras fueron fijadas en formol 10 % y siguieron los pasos de procesamiento de tejidos para su observación con microscopía óptica: deshidratación progresiva en alcoholes 70, 96 y 100 % e infiltración en parafina, cortes de 6 μm de espesor, y coloración de hematoxilina eosina (Figura 3).

A su vez fue analizado el preparado enzimático comercial (R2- 48582) aplicado durante el pretratamiento anterior a las etapas de remojo y depilado:

Se lo disolvió al 5 % (p/v) en buffer NaCO_3H 0,035 M (3 g/l) y se determinaron la concentración proteica (Método de Bradford) y la actividad caseinolítica utilizando como sustrato azocaseína (sulphamide azocasein, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

El protocolo para la determinación fue el siguiente: 150 μl de solución enzimática se incubaron durante 30 min con 250 μl de una solución de azocaseína al 1% en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9 a 37°C. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 10 % (p/v) y posterior centrifugación a 3000 g, 15 min. Luego a 0,9 ml del sobrenadante se le agregó 1 ml de NaOH, se agitó y se midió a 440 nm. Para el blanco de enzima, se la inactivó por calentamiento a 100°C durante 5 min. Se definió la unidad de actividad enzimática (U_{azo}) como la cantidad de enzima que en las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,1 Abs a 440 nm por min.

Los valores encontrados fueron: conc. prot.: 0,083 $\mu\text{g/ml}$; act. azocas.: 0,28 U_{azo} .



**Figura 3. Microscopía óptica de piel bovina.
Hematoxilina Eosina.**

a. Piel salada después del remojo pretratada con buffer bicarbonato 10X. La flecha señala los estratos de la epidermis.

b. Piel fresca pretratada con tensioactivo y depilada con sulfuro de sodio 4X. La flecha señala los folículos pilosos sin pelo.

