

Validación de una metodología para determinar ácido láctico por UPLC en jugos de caña de azúcar

Soledad Medina*, Silvia Zossi*, Paula Diez* y Marcelo Ruiz*

RESUMEN

Se validó una metodología para determinar ácido láctico en jugos de caña de azúcar mediante una técnica de cromatografía líquida de ultra alta presión (UPLC) para emplear este metabolito como indicador de deterioro. Se determinaron los límites de detección y cuantificación (6 mg/L y 20 mg/L, respectivamente), el rango de trabajo (20 mg/L – 1000 mg/L) y la incertidumbre expandida (16%). Estos resultados, además de una recuperación promedio superior al 88% y los bajos valores de coeficiente de variación porcentual (CV%) obtenidos en la precisión intermedia, indicaron que es una técnica analítica adecuada para la determinación de ácido láctico en muestras de jugos de caña.

Palabras clave: validación, jugo de caña de azúcar, deterioro, ácido láctico

ABSTRACT

Validation of a methodology to determine lactic acid by UPLC to be used as an indicator of deterioration in sugarcane

A methodology was validated to determine lactic acid in sugar cane juices by means of an ultra high pressure liquid chromatography (UPLC) technique, to use this metabolite as an indicator of deterioration. The limits of detection and quantification were determined (6 mg / L and 20 mg / L, respectively), working range (20 mg / L - 1000 mg / L) and expanded uncertainty (16%). These results, in addition to an average recovery higher than 88% and the low values of variation coefficient (VC%) obtained in the intermediate precision, indicated that it is an adequate analytical technique for the determination of lactic acid in samples of cane juice.

Key words: validation, sugarcane juice, deterioration, lactic acid.

Fecha de ingreso: 5/02/18 - Fecha de egreso: 7/11/18

*Sección Química de Productos Agroindustriales_ EEAOC silviazossi@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

El deterioro en la caña de azúcar comienza cuando se lesiona, proceso que puede ocurrir en el campo por la acción de plagas o animales, heladas, quema o cosecha. Este deterioro es causado principalmente por las enzimas naturales presentes en los tallos o por polisacáridos que pueden formarse durante la cosecha de la caña en ausencia de infección bacteriana, presumiblemente por la acción de las enzimas presentes en el jugo (Van der Poel *et al.*, 1998; Rein, 2007). Dicho deterioro puede incrementarse por estacionamiento o condiciones climáticas (Eggleston *et al.*, 2008) y la magnitud de este dependerá de diversos factores: variedad de la caña, tipo de cosecha, suelo, clima, etc.

Varios autores (McMaster and Ravno, 1977; Eggleston, 2002; Eggleston and Monge, 2005; Eggleston *et al.*, 2008; Waldford and Nel, 2010;) coinciden en que la mayor contribución al deterioro de la caña de azúcar la realizan las bacterias ácido lácticas, principalmente *Leuconostoc mesenteroides*, que degradan por acción enzimática macromoléculas como disacáridos (sacarosa) y la convierten en azúcares simples (glucosa y fructosa), polisacáridos (dextranas), polialcoholes (manitol) y ácidos orgánicos, preferentemente ácidos láctico y acético.

Desde hace tiempo, en los principales países productores de caña de azúcar se propusieron indicadores de deterioro para predecir problemas que pueden ocurrir durante el proceso de fabricación de azúcar y tratar de cuantificar las pérdidas de sacarosa que ocasiona (Rein, 2007).

El Laboratorio de Investigaciones Azucareras de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) buscó implementar indicadores de deterioro para el sub Programa Mejoramiento Genético de la Caña de Azúcar, de manera de determinar variedades resistentes a este, principalmente al daño causado por heladas.

Se comenzó a trabajar en diferentes indicadores a partir del año 2008: azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) por cromatografía líquida (HPLC), pH, acidez y manitol.

El incremento en las concentraciones de glucosa y fructosa, como así también la disminución en el contenido de sacarosa y pureza real, indicaron niveles de deterioro en el jugo de caña.

Los resultados obtenidos en las mediciones de pH y acidez demostraron que aunque el pH disminuye y la acidez aumenta con el deterioro, sus valores absolutos no son sensibles ante el deterioro ya que en estas mediciones influyen la variedad de la caña, tipo de suelo y medio ambiente (Zossi *et al.*, 2010). Esto concuerda con lo expresado por Legendre *et al.* (1985) y Eggleston (2002).

A partir de la campaña 2007 hasta el año 2011, se

realizaron determinaciones de manitol para estudiar el deterioro por heladas en diferentes variedades de caña de azúcar (Zossi *et al.*, 2010). Esta metodología rápida y sencilla, desarrollada por Eggleston y Harper (2006), es un indicador muy sensible a todo tipo de deterioro. Pero emplea una enzima, manitol deshidrogenasa, que es costosa, con período corto de vida útil y difícil de adquirir por la EEAOC, lo que ha impedido que se continuara con su implementación en nuestro laboratorio.

En la literatura se mencionan otros indicadores de deterioro de jugo de caña de azúcar, tales como la formación de oligosacáridos (Morel Du Boil, 1991; 1995; Eggleston *et al.*, 2004; Eggleston *et al.*, 2008), etanol, principalmente en Sudáfrica (Lionnet and Pillay, 1987; 1988) y ácido láctico (McMaster and Ravno, 1977; Saska, 2002; Waldford and Nel, 2010).

Debido a que el ácido láctico es un metabolito de una infección bacteriana y no un constituyente natural del jugo de caña de azúcar, no es comúnmente encontrado en jugo de caña fresco (McMaster and Ravno, 1977; Naidoo and Waldford, 2013). Esto lo hace un indicador apropiado de deterioro de caña de azúcar.

Por este motivo se decidió implementar una metodología por cromatografía líquida que permita emplear ácido láctico como indicador de deterioro en los ensayos de caña de azúcar que se realizan en la EEAOC, aunque en la literatura existe una técnica para su cuantificación por cromatografía gaseosa (Naidoo and Waldford, 2013).

El objetivo de este trabajo fue validar la metodología para determinación de ácido láctico mediante un cromatógrafo de ultra alta presión (UPLC) para su uso como indicador de deterioro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para validar este método se emplearon soluciones patrón preparadas con ácido láctico pro análisis marca Sigma. Se preparó una solución patrón de 1000 mg/L y a partir de ella se realizaron diluciones con agua destilada.

En su elaboración se emplearon:

- Material de vidrio clase A
- Pipeta automática de 200 μ L
- Pipetas graduadas de 2, 5, 20 y 50 mL
- Cromatógrafo líquido Acquity UPLC de Waters

con software Empower

- Columna BEH C18
- Detector UV Aquity de Waters

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Sistema: isocrático
- Fase Móvil: H_2SO_4 5 mM
- Flujo: 0,5 mL/min
- Volumen de inyección: 4 μ L

- Temperatura de columna: 35°C
- Temperatura de muestra: 15°C
- Longitud de onda: 210 nm

Los parámetros que se validaron fueron:

• **Límite de detección (LD).** Se calculó como tres veces la relación señal/ruido (s/n), preparándose soluciones de distintas concentraciones de ácido láctico. Se determinó la relación s/n para cada una de ellas a partir del software Empower y luego se sacó un promedio de estas.

• **Límite de cuantificación (LC).** Se calculó como 10 veces la relación señal s/n (Quattrochi, 2015)

• **Linealidad del método.** Se prepararon cinco soluciones de ácido láctico, por triplicado, cuyas concentraciones estaban incluidas en el intervalo comprendido entre 20 mg/L(LC) y 1000 mg/L, valor considerado como normal en jugo de caña deteriorado, aunque pueden encontrarse valores de hasta 5000 mg/L (Saska, 2002). Con los datos obtenidos se graficó el área de la respuesta del ácido láctico de los correspondientes cromatogramas en función de la concentración de la solución en mg/L.

• **Precisión en condiciones de repetibilidad y precisión intermedia (OAA, 2013).**

- En condiciones de repetibilidad se prepararon tres muestras a tres niveles de concentración dentro del rango de trabajo. La estimación de este parámetro se realizó mediante el cálculo del CV% de las respuestas obtenidas.

- La precisión intermedia se analizó en una misma muestra en dos días distintos y por dos analistas diferentes. La muestra se preparó independientemente 10 veces cada día. La estimación de la precisión intermedia se realizó con el cálculo de distribución de F, que permite identificar si existe una diferencia significativa entre dos varianzas.

• **Exactitud evaluada como recuperación.** Se prepararon cuatro muestras de jugo con adición de estándar de referencia de ácido láctico 50 mg/L, 100 mg/L, 700 mg/L y 1000 mg/L (jugo fortificado). Para determinarla se analizó cada solución por triplicado, obteniéndose la desviación estándar para cada concentración. La recuperación se calculó a partir de la siguiente ecuación (Harvey, 2009):

$$\% \text{ Recuperación} = (A - B) / C * 100 \quad (\text{Ec 1})$$

Donde:

- A = Concentración de jugo fortificado
- B = Concentración de jugo sin fortificar
- C = Concentración agregada

• **Incertidumbre relativa expandida.** Para el cálculo de la incertidumbre se utilizó una evaluación global

del método teniendo en cuenta dos contribuciones: sesgo y precisión intermedia. Se calculó la incertidumbre a partir de las recuperaciones porcentuales de ácido láctico para distintos niveles de fortificación correspondientes al rango de trabajo.

- Incertidumbre del Sesgo (μ_{sesgo}). Para estimarla se tuvieron en cuenta dos componentes: a) El sesgo como diferencia porcentual con el valor nominal o el valor certificado; y b) La incertidumbre del valor nominal/certificado (μ_{CRef}). El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente expresión (OAA, 2013):

Donde:

$$\mu_{\text{sesgo}} = \sqrt{\text{sesgo}^2 + \left(\frac{S_{\text{sesgo}}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \mu_{\text{Cref}}^2} \quad (\text{Ec 2})$$

sesgo es el promedio de las diferencias porcentuales entre el valor experimental y el valor nominal.

S_{sesgo} es el desvío estándar de las n mediciones que se realizan para determinar el sesgo.

μ_{Cref} es la incertidumbre del material de referencia que se obtiene dividiendo en 2 el valor indicado por el proveedor.

• **Incertidumbre de precisión intermedia.** Se calculó a partir de los valores obtenidos para determinar la precisión intermedia como:

$$\mu_{\text{prec. Int.}} = \sqrt{\Sigma(\text{CVi}/ni)^2} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

CVi son los promedios de los coeficientes de variación obtenidos por cada analista

ni es el número de analistas participantes del ensayo

• **Incertidumbre combinada (μ_c)**

Para el cálculo de este parámetro se combinaron las incertidumbres aportadas por el sesgo y la precisión intermedia, mediante la siguiente fórmula (OAA, 2013):

$$\mu_c = \sqrt{\mu_{\text{sesgo}}^2 + \mu_{\text{prec int}}^2} \quad (\text{Ec. 4})$$

Para realizar la validación se siguió la guía para la validación de ensayos del Organismo Argentino de Acreditación (OAA, 2013).

• **Incertidumbre relativa expandida (U_{exp}).** Se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$U_{\text{exp}} = K \times \mu_c \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde K es un factor de cobertura considerado igual a 2 para un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Límites de detección y cuantificación

El límite de detección se define como la concentración mínima de sustancia que puede ser detectada por un método analítico determinado; y el límite de cuantificación, como la mínima concentración del analito que puede determinarse con exactitud y precisión bajo las condiciones establecidas en el análisis.

Los resultados obtenidos para ambos límites se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Límite de Detección y Cuantificación

Relación s/n = 1,946
Límite de detección = 6 mg/L
Límite de cuantificación = 20 mg/L

Rango de trabajo y linealidad del método

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado rango, de dar una respuesta proporcional a la cantidad de analito por determinar. El rango de trabajo para el ácido láctico se estableció entre 20 mg/L, LC del método, y 1000 mg/L, como se muestra en la Figura 1.

Empleando regresión lineal se obtuvo la siguiente ecuación de correlación

$$Y = 0,004x + 8,585$$

El valor del coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable (concentración) y la respuesta (área). Si es cercano a la unidad, significa que

existe correlación con una probabilidad elevada. En este caso para el rango entre 20 mg/L y 1000 mg/L el valor de R^2 fue de 0,999, siendo el valor recomendado del mismo mayor o igual a 0,99 (Paho, 2008). El valor de R^2 determinado muestra que existe una relación lineal altamente significativa entre la concentración del analito y el área obtenida, lo que fue comprobado además mediante análisis de residuos y prueba F (datos no mostrados).

La probabilidad obtenida del análisis de regresión fue $P = 0,009 < 0,01$, lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre las áreas obtenidas de los cromatogramas y las concentraciones de ácido láctico, a un nivel de confianza del 99% (Paho, 2008).

Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor aceptado convencionalmente como valor verdadero o valor de referencia y el valor experimental encontrado. Se expresa como porcentaje de recuperación de la valoración de una cantidad conocida de analito añadido sobre la muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Se puede observar que la recuperación promedio está dentro del rango de aceptación establecido por el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2003), que establece que para concentraciones mayores a 1 mg/L la recuperación debe estar comprendida entre 70 y 110%.

Precisión

La precisión expresa el grado de dispersión entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. A través del estudio de la precisión se puede conocer la variabilidad debida a los errores aleatorios inherentes a

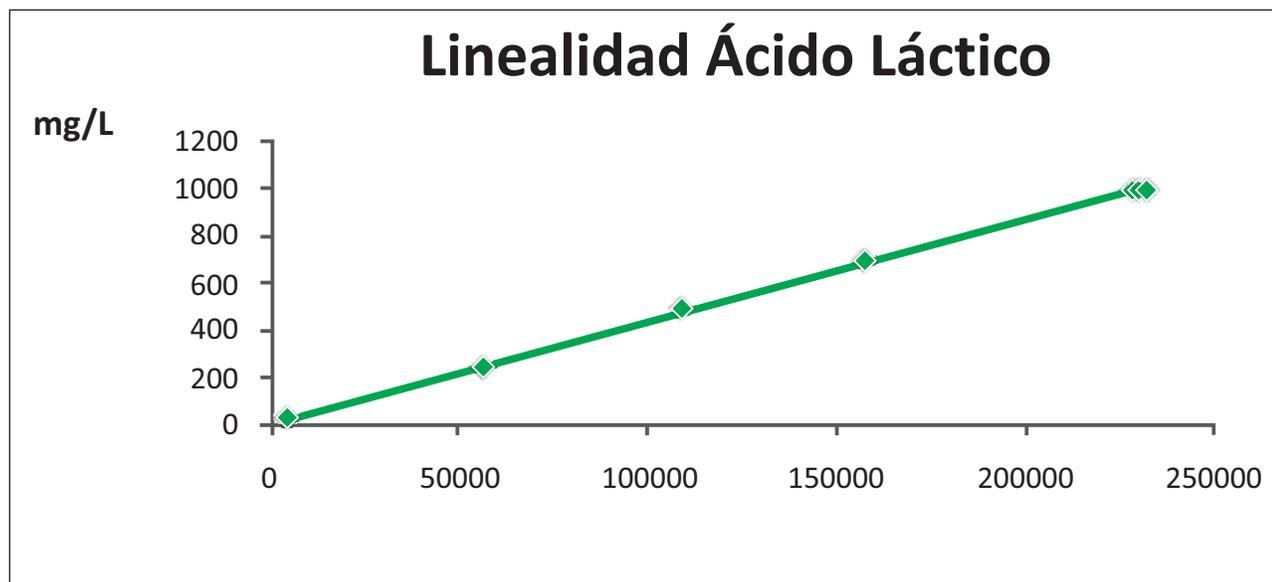


Figura 1. Relación entre respuesta (área) y concentración de ácido láctico

Tabla 2. Porcentajes de ácido láctico recuperado en una muestra de jugo de caña con cuatro niveles de fortificación

Muestra	Nivel 1 50 mg/L	Nivel 2 100 mg/L	Nivel 3 700 mg/L	Nivel 4 1000 mg/L
M1	90,54	82,41	93,62	93,96
M2	78,31	81,79	91,8	94,38
M3	82	85	91,85	93,22
Promedio	83,62	83,07	92,42	93,85
%CV	7,5	2,05	1,12	0,63
%Recuperación total promedio			88,25	
%CV promedio			2,83	

todo método de ensayo.

La precisión engloba diferentes tipos de estudio:

- **Repetibilidad:** estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en las mismas condiciones operativas, por un mismo analista, con los mismos aparatos y reactivos, en un mismo laboratorio y en un período de tiempo corto.

- **Precisión Intermedia:** su estudio tiene como objetivo determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre una misma muestra, en un mismo laboratorio pero en condiciones operativas diferentes (día, analista, etc.).

Repetibilidad. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Precisión Intermedia

Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Tablas 4 y 5).

El valor F se comparó con el valor tabular de la distribución F, con un nivel de significación α .

Los valores de coeficientes de variación (CV%) obtenidos en los análisis para la repetibilidad fueron de 3,67; 1,09 y 2,07 y para la precisión intermedia se obtuvo un F de 1,04, el cual es menor que el F crítico 3,18; con un nivel de significancia de 0,05. Estos parámetros aseguran

que el método y el equipo empleado cumplen con los parámetros en estudio.

Incertidumbre relativa expandida

Tabla 4. Repeticiones de una muestra de jugo de caña realizada en condiciones de reproducibilidad.

Muestra	Concentración (mg/L)	
	Analista 1	Analista 2
1	497	521
2	490	561
3	520	553
4	507	521
5	505	549
6	534	505
7	525	522
8	541	529
9	538	515
10	488	509
Promedio	514,7	528,6
Desv. Est.	19,9	19,5
%CV	3,9	3,7

Tabla 3: Cálculo del CV% en muestras de jugo de caña a tres niveles de concentración (jugo fortificado).

Nivel	Muestra	Ac. Láctico (mg/l)	Promedio (mg/l)	DesvíoEstándar	CV%
1	M1	52,65	51,94	1,91	3,67
		49,78			
		53,38			
2	M2	504,18	510,33	5,58	1,09
		515,06			
		511,74			
3	M3	722,41	739,64	15,30	2,07
		744,80			
		751,68			

Tabla 5: Resultado de prueba F para estimación de precisión intermedia

Prueba F para varianzas de dos muestras		
	Variable 1	Variable 2
Media	515	529
Varianza	394	379
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1,04	
P(F<=f) una cola	0,48	
Valor crítico para F (una cola)	3,18	

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mensurando (OAA, 2012)

Empleando la Ec. 2, con los valores obtenidos en la Tabla 2 se determinó que la incertidumbre del sesgo fue de 6,88%; mientras que el valor de la incertidumbre de la precisión intermedia, calculada con la Ec. 3 a partir de los resultados indicados en la Tabla 4, fue de 3,77%. De esta manera, la incertidumbre combinada del método, calculada mediante la Ec. 4, resultó igual a $\pm 8\%$. Aplicando la Ec. 5, el resultado de la incertidumbre expandida fue 16%.

Esta determinación realizada por cromatografía líquida resulta mucho más sencilla de llevar a cabo que aquella propuesta por Naidoo y Walford (2013) realizada mediante cromatografía gaseosa. No requiere preparación previa de la muestra ni derivatización post-columna, solamente dilución, resultando en economía de tiempo y reactivos.

Con esta metodología fueron analizadas 180 muestras de jugo de caña de azúcar colectadas desde mayo a septiembre en la localidad de Santa Ana (Tucumán), donde ocurrieron heladas durante los meses de junio y julio. Las fechas, intensidad y duración de las heladas se indican en la Tabla 6 (Sección Agrometeorología, 2017).

En todas las muestras analizadas la concentración de ácido láctico fue menor al límite de cuantificación, 20 mg/L. Estos resultados podrían deberse a que las heladas no fueron severas y de corta duración y a que las muestras fueron cosechadas y procesadas con un estacionamiento menor a 24 horas.

CONCLUSIONES

Los resultados de la validación mostraron parámetros estadísticos consistentes que permiten considerar la aptitud de la técnica analítica propuesta para

Tabla 6. Fecha, intensidad y duración de heladas en Santa Ana (Tucumán). Año 2017.

Mes	Fecha	Temperatura (°C)	Duración (h)
Junio	19	-1	01:45
	20	-0,7	02:15
Julio	17	-0,4	01:15
	18	-2,5	09:00
	19	-1	04:30

la determinación de ácido láctico en muestras de jugos de caña.

El método mostró un valor de incertidumbre expandida igual a $\pm 16\%$ para el intervalo de trabajo validado comprendido entre 20 y 1000 mg de ácido láctico por L de solución.

Se puede destacar la simpleza analítica del método como así también su bajo tiempo de ejecución, su especificidad en la reacción y su alta reproducibilidad y repetibilidad. Estas cualidades hacen que esta metodología sea adecuada para determinar ácido láctico en jugos de caña.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Eggleston, G. 2002.** Deterioration in cane juice – sources and indicators. Food Chem., 78 (1): 95 – 103.
- Eggleston, G. and A. Monge. 2005.** Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Process Biochemistry, 40: 1881 – 1894.
- Eggleston, G. and W. Harper. 2006.** Determination of sugarcane deterioration at the factory: development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to determine mannitol. Food Chem., 92 (2): 366 – 367.
- Eggleston, G. P. G. Morel du Boil and S. N. Waldforf. 2008.** A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 81: 72 – 85.
- Eggleston, G.; B. Legendre and T. Tew. 2004.** Indicators of freeze – damaged sugarcane varieties which can predict processing problems. Food Chemistry, 87: 119 – 133.
- Food and Agriculture Organization/ Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). 2003.** Codex Alimentarius. Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas. Secretaría del Programa Conjunto FAO/ OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma, Italia.
- Harvey, D. 2009.** Analytical Chemistry 2.0. Electronic Version. En. http://dpuadweb.depauw.edu/harvey_web/eTextProject/version_2.0.html. Consultado el 29 de Junio de 2015.
- Legendre, B. L.; W. S. C. Tsang and M. A. Clarke. 1985.** Changes in juice composition of sugarcane as affected

- by post – freeze deterioration. En: Proc. Sug. Proc. Res Conf.: 92 – 107.
- Lionnet, G. R. E. and J. V. Pillay. 1987.** Ethanol as an indicator of burn to crush delay. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., June, 1 – 5.
- Lionnet, G. R. E. and J. V. Pillay. 1988.** Ethanol as an indicator of cane delays under industrial conditions. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 62: 6 – 8.
- McMaster, L. and A. B. Ravno. 1977.** The occurrence of lactic acid and associated micro-organisms in cane sugar processing. En: Proc. ISSCT Congress, Sao Paulo, Brazil, 16, 2679 – 2693.
- Morel du Boil, P. G. 1991.** The role of oligosaccharides in crystal elongation. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., June, 171 – 178.
- MorelduBoil, P. G. 1995.** Cane deterioration – oligosaccharides formation and some processing implications. En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., June, 146 – 154.
- Naidoo, Y. and S. Walford. 2013.** The development of juice NIRS predictions for minor constituents. En: Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol., Sao Paulo, Brazil, 28, 2013.
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2012.** Criterios específicos para evaluar la incertidumbre en procesos de medición en laboratorios químicos. Código CE – LE 05, Versión 3, Fecha de entrada en vigencia: 13 de agosto de 2012.
- Organismo Argentino de Acreditación (OAA). 2013.** Guía para validación de métodos de ensayo. Código GUI – LE 03, Versión 1, Fecha de entrada en vigencia: 226 de junio de 2013.
- Paho. 2008.** Validación de métodos analíticos. Buenas Prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico. Anexo 3, informe 36, 2002. Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoquicos.pdf. Consultado el 19-01-2018.
- Quattrochi, Oscar. 2015.** Validación, Verificación y Transferencia de Procedimientos Analíticos. D'Amico Sistemas S.A. 7 y 8 de Abril de 2015.
- Rein, P. 2007.** Cane sugar engineering. Bartens, Berlin, Germany.
- Sección Agrometeorología, EEAOC. 2017.** Disponible en: www.eeaoc.org.ar/agromet/. Consultado el 17-01-2018.
- Saska, M. 2002.** Ethanol and acid lactic levels as a measure of post harvest cane deterioration in different harvesting schemes. Int. Sugar J., 104 (1237): 10 – 13, 42.
- Van der Poel, P. W.; H. Schiweck and T. Schwartz. 1998.** Sugar technology. Beet and cane sugar manufacture. Bartens, Berlin, Germany.
- Walford, S. N. and S. Nel. 2010.** Are mannitol and lactic acid indicators of sugarcane deterioration in a South Africa context? En: Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass., 83: 410 – 421.
- Zossi, S.; M. Sastre; N. Sorol y M. Ruiz. 2010.** Algunos indicadores de deterioro en caña de azúcar. Trabajo presentado en la XVI Reunión de Técnicos de la Caña de Azúcar (SATCA), Tucumán, 29 y 30 de abril de 2010.