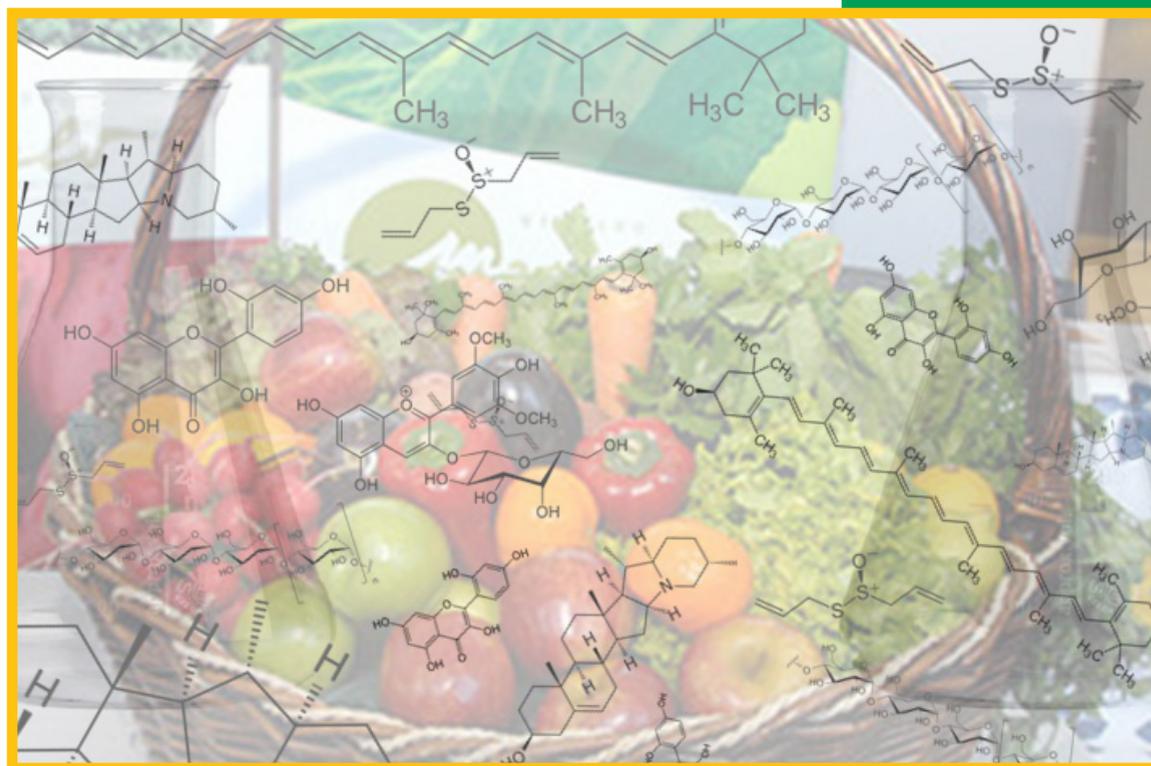




**INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA
URUGUAY**



**METABOLITOS
SECUNDARIOS CON
RELEVANCIA NUTRICIONAL
EN FRUTAS
Y HORTALIZAS FRESCAS**

Agosto, 2015

**SERIE
FPTA-INIA**

58

METABOLITOS SECUNDARIOS CON RELEVANCIA NUTRICIONAL EN FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS

Proyecto FPTA-277 Evaluación de la presencia de metabolitos secundarios con relevancia nutricional en frutas y hortalizas frescas consumidas por la población uruguaya

Responsable del Proyecto: Horacio Heinzen*

Institución Ejecutora: Facultad de Química, Universidad de la República

Equipo técnico de trabajo: Mariajosé Laprovitera, Ximena Arias

Ignacio Mígues, Andrés Pérez, Horacio Heinzen

Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, DQO,
Facultad de Química, UdelaR

Martín Masner, Ana Denicola

Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR

Pablo Pacheco - Comisión Administradora del Mercado Modelo

Andrea Medeiros - Departamento de Bioquímica, Facultad de
Medicina, UdelaR

*Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, DQO, Facultad de Química, UdelaR.

Título: METABOLITOS SECUNDARIOS CON RELEVANCIA NUTRICIONAL EN FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS

Responsable del Proyecto: Horacio Heinzen

Institución Ejecutora: Facultad de Química, Universidad de la República

Equipo técnico de trabajo: Mariajosé Laprovitera, Ximena Arias, Ignacio Miguez, Andrés Pérez, Martín Masner, Pablo Pacheco, Andrea Medeiros, Ana Denicola, Horacio Heinzen

Serie: FPTA N° 58

© 2015, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología del INIA

Andes 1365, Piso 12. Montevideo - Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Esta publicación no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T. V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18º de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 40/00 del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.

b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.

c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos. De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
EXPERIMENTAL	10
Materiales y reactivos	10
Obtención de los extractos	10
Actividad antioxidante	11
Determinación de compuestos fenólicos totales	11
Actividad antiproliferativa	11
RESULTADOS	11
Actividad Antioxidante, polifenoles totales y actividad antiproliferativa	11
Análisis Fitoquímico	14
CONCLUSIONES	16
BIBLIOGRAFÍA	16

Mariajosé Laprovitera¹, Ximena Arias¹, Ignacio Miguez¹, Andrés Pérez¹, Martín Masner², Pablo Pacheco³, Andrea Medeiros⁴, Ana Denicola², Horacio Heinzen¹

¹Facultad de Química.

²Facultad de Ciencias.

³Mercado Modelo.

⁴Facultad de Medicina.

Metabolitos secundarios con relevancia nutricional en frutas y hortalizas frescas

Proyecto FPTA 277

Período de Ejecución: Jun. 2009 - May. 2012

RESUMEN

Además de lípidos, proteínas y azúcares, los alimentos poseen componentes no esenciales en la dieta que son beneficiosos para la salud, que son componentes distintivos de los llamados «functional-foods» fundamentales para la buena nutrición. Combinado entonces un estilo de vida saludable, el consumo de alimentos funcionales puede ser una muy buena contribución a la salud humana.

El desarrollo del mercado de alimentos funcionales en el mundo va de la mano de la comprobación del importante rol que alimentos como frutas, hortalizas, cereales integrales, productos lácteos, entre otros, juegan en la prevención de enfermedades. Se ha logrado correlacionar la presencia de antioxidantes y la combinación de sustancias protectoras de las plantas con estas propiedades.

La información nutricional sistemática de los alimentos que consume la población, especialmente aquella referida a la presencia de compuestos bioactivos (antioxidantes, pro vitaminas, anticancerígenos) es muy escasa en el Uruguay, a pesar de que se observa una tendencia generalizada de los consumidores a seleccionar aquellos productos reconocidos como benéficos para la salud. Por lo tanto, es importante identificar dichos alimentos funcionales con propiedades potenciales para el mejoramiento de la salud y el cuidado del ser humano, reduciendo el riesgo o demorando la aparición de enfermedades. La evaluación de estas propiedades le agrega valor a los productos cosechados en nuestro país.

Es posible correlacionar el nivel de metabolitos secundarios vegetales con propiedades antioxidantes y anticancerígenos, estas sustancias son las responsables de la función de adaptación al medio, y son una respuesta fenotípica al momento y lugar que vive el vegetal. La concentración de estos metabolitos no es constante entre variedades e inclusive dentro de una misma variedad: puede variar su expresión como resultados de distintas prácticas de cultivo.

En este trabajo se prepararon extractos de diferentes muestras de frutas y hortalizas según su origen, variedad, tipo de cultivo empleado. La determinación de la capacidad antioxidante in vitro se llevó a cabo por el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y el estudio de capacidad antiproliferativa se realizó en cultivos celulares de la línea de cáncer de colon humano HT-29. La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en cada muestra se realizó por HPLC-DAD y por TLC para la determinación de polifenoles.

Palabras clave: actividad antioxidante, actividad antiproliferativa, metabolitos secundarios

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del mercado de alimentos funcionales en el mundo va de la mano de la comprobación del importante rol que alimentos como frutas, hortalizas, cereales integrales, productos lácteos, juegan en la prevención de enfermedades. Se ha logrado correlacionar la presencia de compuestos bioactivos (antioxidantes, pro vitaminas, anticancerígenos) con estas propiedades. Estas sustancias son los metabolitos secundarios, los cuales son responsables de la función de adaptación al medio de los vegetales, y son una respuesta fenotípica al momento y lugar en el que estos viven. Estos compuestos cumplen diversas funciones protectoras; desde la defensa contra pestes y plagas, la excesiva radiación o la inhibición de vegetales vecinos que compiten por nutrientes, hasta la comunicación por volátiles para atraer polinizadores.

Dada la creciente sensibilidad del público consumidor a consumir «alimentos más sanos» la recolección y difusión de datos como ser capacidad antioxidante, contenido en vitaminas, polifenoles, glicosinolatos, etc permite una sub-clasificación de frutas y hortalizas en base a estas propiedades, la que se verá reflejada luego en el valor de cada una de ellas; contribuyendo a la educación del comprador así como orientándolo en su elección.

Los polifenoles y los carotenos son a grandes rasgos, las principales moléculas responsables de la capacidad antioxidante en la gran mayoría de frutas y hortalizas. El contenido y por lo tanto el perfil de flavonoides varía por ser metabolitos secundarios, fundamentalmente con las condiciones en que el alimento es producido. La época del año es también un factor importante de variabilidad. La variación estacional, la temperatura, la luminosidad, la humedad y el suelo junto con el cultivar, son causas del distinto contenido en estas moléculas de importancia nutricional. Particularmente el no empleo de agroquímicos hace que los vegetales desarrollen su metabolismo defensivo a base de metabolitos secundarios. Esto está firmemente probado para diversas especies como tomates y

frutillas donde el contenido en antioxidantes y vitaminas de estos vegetales es mayor cuando se cultivan en regímenes de manejo integrado u orgánico en comparación con los cultivados con manejo convencional. En Uruguay existen nuevas variedades de frutas y hortalizas así como también variedades tradicionales, pero las características nutricionales reseñadas no se conocen en cada caso.

En este trabajo se prepararon distintos tipos de extractos de diferentes muestras de frutas y hortalizas de producción nacional según su origen, variedad, práctica de cultivo empelada. La caracterización de los metabolitos secundarios presentes en cada muestra se realizó por HPLC-DAD, GC?? y TLC para la determinación de polifenoles. La determinación de la capacidad antioxidante in vitro se llevó a cabo por el método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y el estudio de capacidad antiproliferativa se realizó en cultivos celulares de la línea de cáncer de colon humano HT-29.

EXPERIMENTAL

Materiales y reactivos

Todos los solventes utilizados fueron puros para análisis.

Las muestras de frutas y hortalizas cosechadas en Uruguay fueron entregadas por el Mercado Modelo de acuerdo a un modelo estipulado antes del comienzo del proyecto teniendo en cuenta tipo de cultivo y variedades.

Obtención de los extractos

A partir de 200 gramos de muestra congelada y picada se realizaron los extractos con una mezcla acetona:agua (50:50) con agitación durante 24 h a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos fueron filtrados, evaporados a presión reducida hasta eliminación total de la acetona y luego liofilizados. Los liofilizados obtenidos fueron almacenados bajo atmósfera de nitrógeno, protegidos de la luz y a -14 °C hasta su análisis.

Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos fue evaluada utilizando el método ORAC (oxygen radical absorbance capacity) como se describe en Huang, D. et al y Alarcón, D. et al. Las muestras para el ensayo biológico se preparan disolviendo entre 5 mg y 10 mg de extracto liofilizado en 1ml del mismo solvente utilizado para la extracción.

Las curvas de decaimiento de la fluorescencia obtenidas se relativizan sobre la intensidad de la fluorescencia inicial y se integran para obtener el valor de área bajo la curva. Se construyen las curvas estándar con los valores de los pocillos donde se empleó Trolox como antioxidante en sus distintas concentraciones. Los resultados obtenidos se expresan como equivalentes de Trolox por gramo de material vegetal fresco (eq Trolox/g fresco).

Determinación de compuestos fenólicos totales

La determinación se realizó por el método de *Folin-Ciocalteu*, por duplicado para cada muestra.

Se trabaja en placas de 96 pocillos, volumen total 250 ml en el equipo Varioskan Flash. y se lee la absorbancia a 760 nm.

La curva de calibración se realiza con ácido gálico a cinco niveles de concentración. Los valores de absorbancia para cada muestra se interpolan en la curva de calibración y se corrigen por el factor de dilución.

Actividad antiproliferativa

Líneas celulares derivadas de cáncer de colon humano HT-29 fueron crecidas en medio DMEM (Gibco) conteniendo 10% de suero bovino fetal en ausencia de antibióticos, en atmósfera humedecida, 95% aire, 5% CO₂ a 37°C. Se La proliferación de las células fue determinada por la incorporación del colorante vital WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzeno disulfonato, Roche). Luego de 60 minutos se mide absorbancia a 450nm debida a la formación

de un producto coloreado derivado del metabolismo de WST-1 por la célula. Cada experimento se realiza por triplicado.

A partir de las curvas de proliferación construidas en función de la concentración de la muestras, se establecen los valores de IC₅₀ expresados como mg de material vegetal fresco por mL de medio (mg fresco/mL medio).

RESULTADOS

Actividad Antioxidante, polifenoles totales y actividad antiproliferativa

Se realizó el ensayo de capacidad antioxidante (ORAC), polifenoles totales y actividad antiproliferativa en HT29 y fibroblastos normales para 119 extractos. De acuerdo a los resultados obtenidos se direccionó el trabajo hacia los extractos con resultados más relevantes y prometedores. Desde el punto de vista de la capacidad nutracéutica de los alimentos planteados en este proyecto, se decidió priorizar los resultados específicos de ajo, morrón, cebolla, brócoli, repolito de bruselas y boniato para verduras, y arándanos, manzana, naranja, frutilla y uva para los frutos (Figuras 1 y 2).

Como se ve en las Figuras 1 y 2, surge del agrupamiento de datos que existe como era esperado, una correlación a grandes rasgos del nivel de polifenoles con las actividades antioxidantes medidas a través del ORAC. Las variaciones estacionales y los modos de consumo son información preponderante a fin de elaborar recomendaciones de consumo de alimentos uruguayos con capacidad nutracéuticas.

Por otro lado, desde el punto de vista de la medición de actividades biológicas planteadas como se ve en las Figuras 3 y 4 para hortalizas y frutas respectivamente, las capacidades antioxidantes suelen estar asociadas a inhibiciones en el crecimiento celular (expresado como IC₅₀) en las diferentes muestras analizadas. De mayor relevancia han sido los datos obtenidos en actividad antiproliferativa sobre HT-29 (linaje de células cancerígenas) para ajo y cebolla así como para arándanos y uvas (Figura 5).

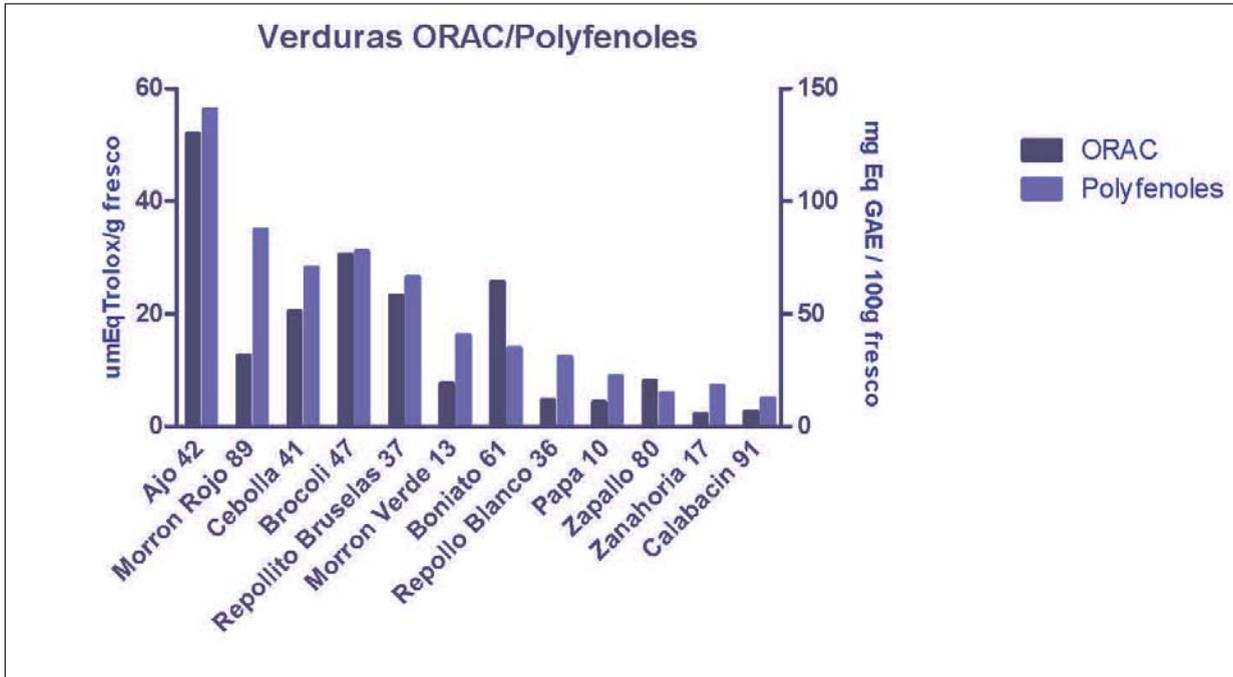


Figura 1. Correlación ORAC y polifenoles totales en verduras.

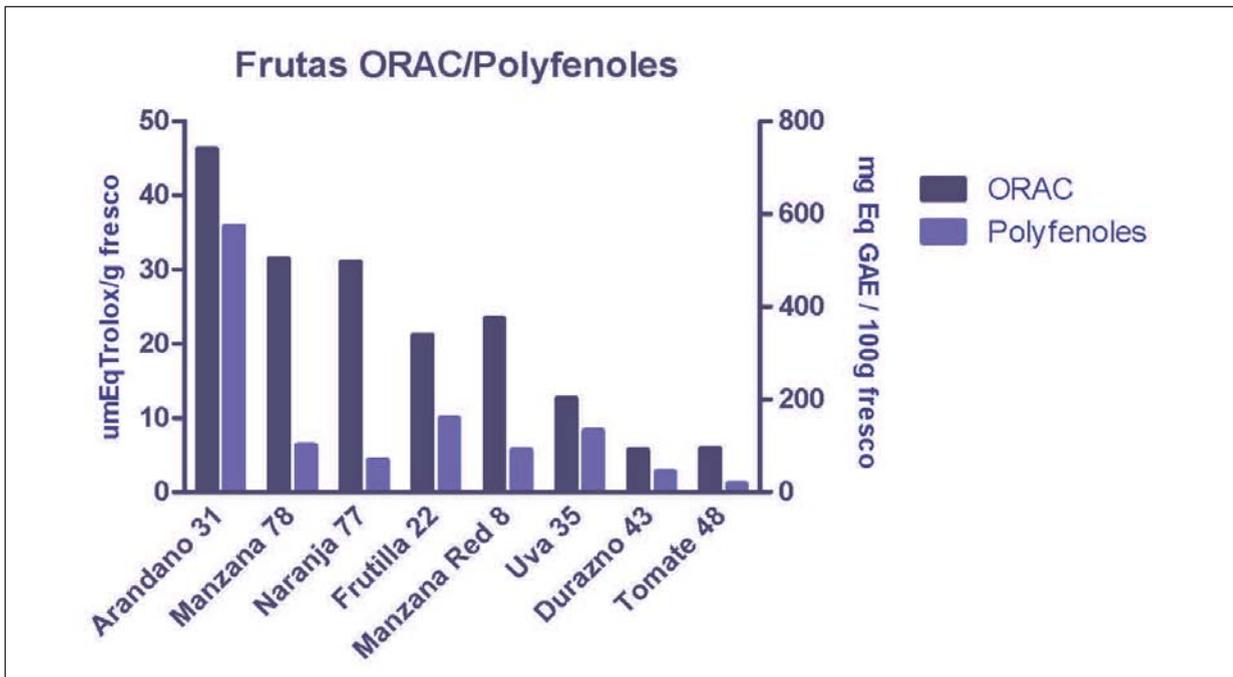


Figura 2. Correlación ORAC y polifenoles totales en frutas.

En una etapa posterior se estudió la influencia de los extractos sobre linajes de células no tumorales (células normales de fibroblastos). De esta forma es posible evaluar la selectividad que pueden presentar los distintos extractos so-

bre células malignas (cancerígenas). De este último estudio surgen el grupo de la cebolla, repollito de bruselas y brócoli como potenciales ejemplos de alimentos de consumo seguro sin actividad citotóxica relevante (Figura 6).

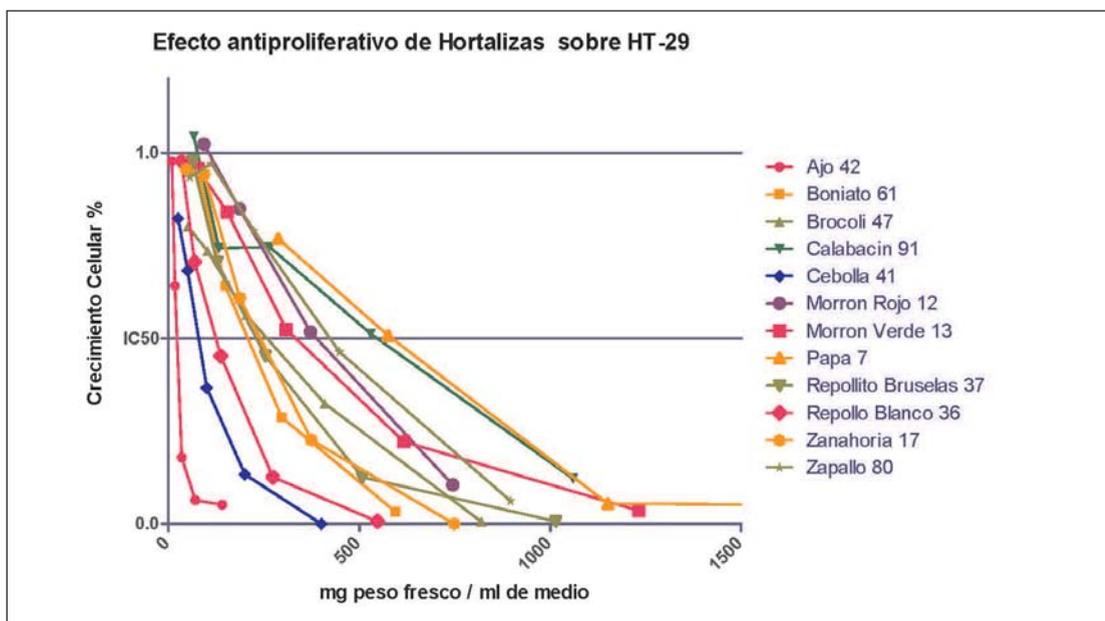


Figura 3. Efecto antiproliferativo de hortalizas sobre HT-29.

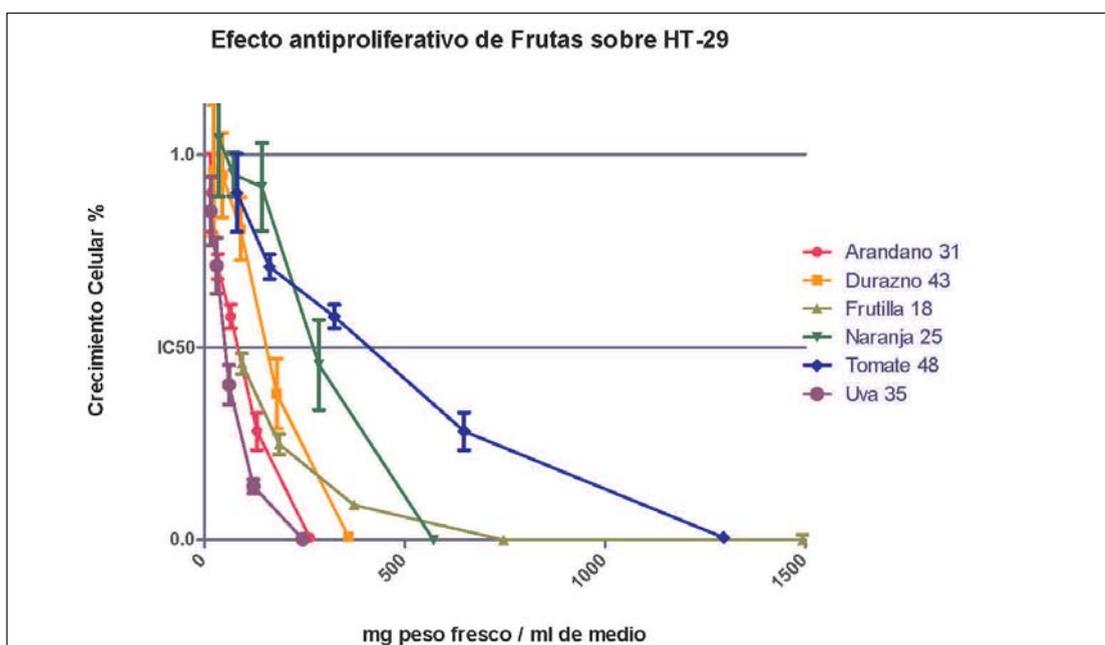


Figura 4. Efecto antiproliferativo de frutas sobre HT-29.

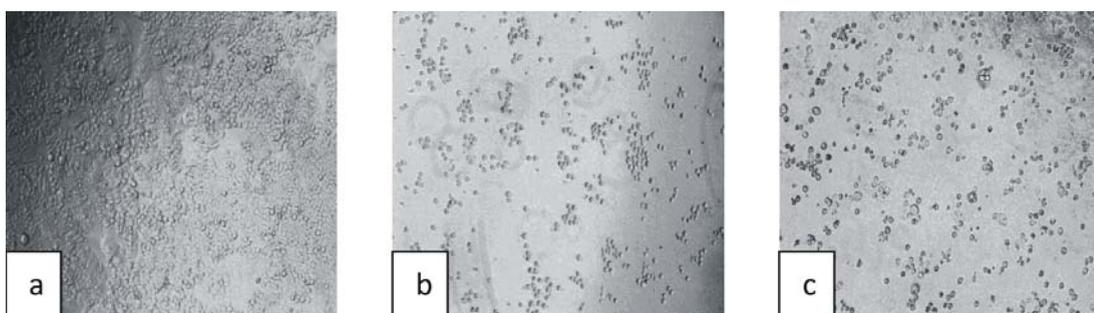


Figura 5. Fotografías del crecimiento celular de una muestra de ajo. a- medio DMEM; b- DMSO; c- extracto.

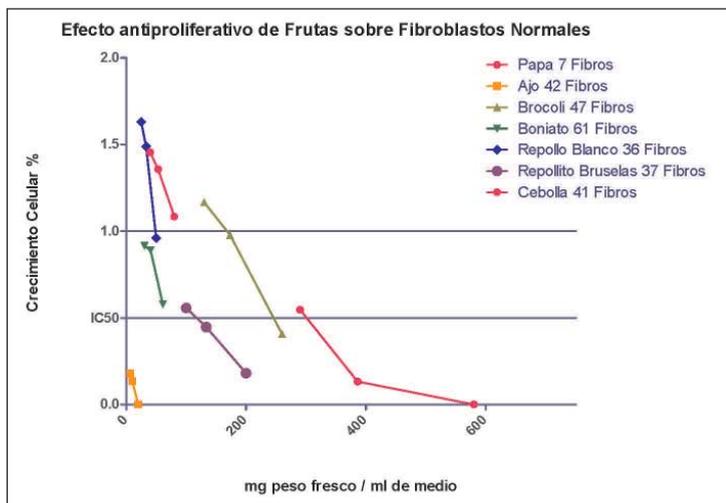


Figura 6. Efecto antiproliferativo de hortalizas sobre fibroblastos normales.

Se puede notar, por ejemplo, que altas concentraciones de polifenoles en cebolla actuarían detrimentalmente sobre células normales mientras que muy bajas concentraciones de extractos de ajos tienen el mismo efecto tóxico sobre células malignas que sobre células normales. Se denota entonces una muy baja especificidad de los ajos y una potencialidad de las cebollas para trabajos a futuro.

Análisis Fitoquímico

Se ha establecido un protocolo de análisis de polifenoles por TLC y HPLC-DAD (cromatografía líquida-arreglo de diodos) y el acoplamiento de una base de datos espectroscópica ultravioleta de estándares para caracterización de compuestos. Se han identificado variedad de flavonoides, glicósidos de flavonoides, flavonoles, ácidos fenólicos. Debido a la amplia variedad de tipos de muestras y variabilidad entre las mismas, así como la imposibilidad de conseguir estándares primarios de todos los compuestos de significancia para estudiar, se ha recurrido a estrategias de caracterización más general, o caracterización cualitativa determinando el tiempo de retención y porcentaje de similitud con el espectro de sus estándares de acuerdo a la base de datos disponible.

Se ha avanzado en la caracterización de componentes de los extractos con

énfasis en el estudio de aquellos provenientes de frutas y verduras más activas como se ha visto para la cebolla. De esta forma, se han caracterizado mediante análisis HPLC-DAD los extractos y se ha correlacionado los perfiles cromatográficos frente a análisis estadísticos de correlación.

Particularmente dentro de las verduras evaluadas, en cebolla (Figura 7) se han establecido relaciones directas en las muestras estudiadas con derivados de dos flavonoides ampliamente conocidos, principalmente del kaempferol (pico 4), y la isoquercetina (pico 5). Excepcionalmente se puede notar que otros óde quercetina (pico 2) que son mucho más abundantes, no guardan relación directa con la actividad estudiada. Se ha trabajado en la cuantificación de estos compuestos mediante técnicas de determinación indirecta (luego de hidrólisis ácida) por HPLC-DAD y comparación con estándares disponibles. Así mismo se trabajó buscando el establecimiento de variaciones temporales de los compuestos con sus perfiles fitoquímicos.

Otro ejemplo interesante que se ha estudiado, han sido los boniatos ya que no hay una correlación directa con determinados metabolitos particulares sino que la actividad se encuentra fuertemente asociada al conjunto de los polifenoles (Figura 8).

Por otro lado, desde el punto de vista de las frutas se han establecido relaciones directas entre las poblaciones estadísticas de muestras estudiadas de arándanos con el índice de ORAC para cada una de ellas. Fue posible determinar los componentes responsables y/o directamente involucrados en las propiedades antioxidantes, por ejemplo se ha observado que algunos compuestos están directamente vinculados al índice de ORAC y no precisamente son los metabolitos determinados como mayoritarios (Figura 9).

Otras frutas de especial interés debido a su amplio consumo, como las manzanas han mostrado una actividad antioxidante y antiproliferativa interesante en especial si se consumen con cáscara, una práctica no tan habitual debido a que el uso de pesticidas en las prácticas agropecuarias, cada vez más hace que la población evite el consumir frutas con

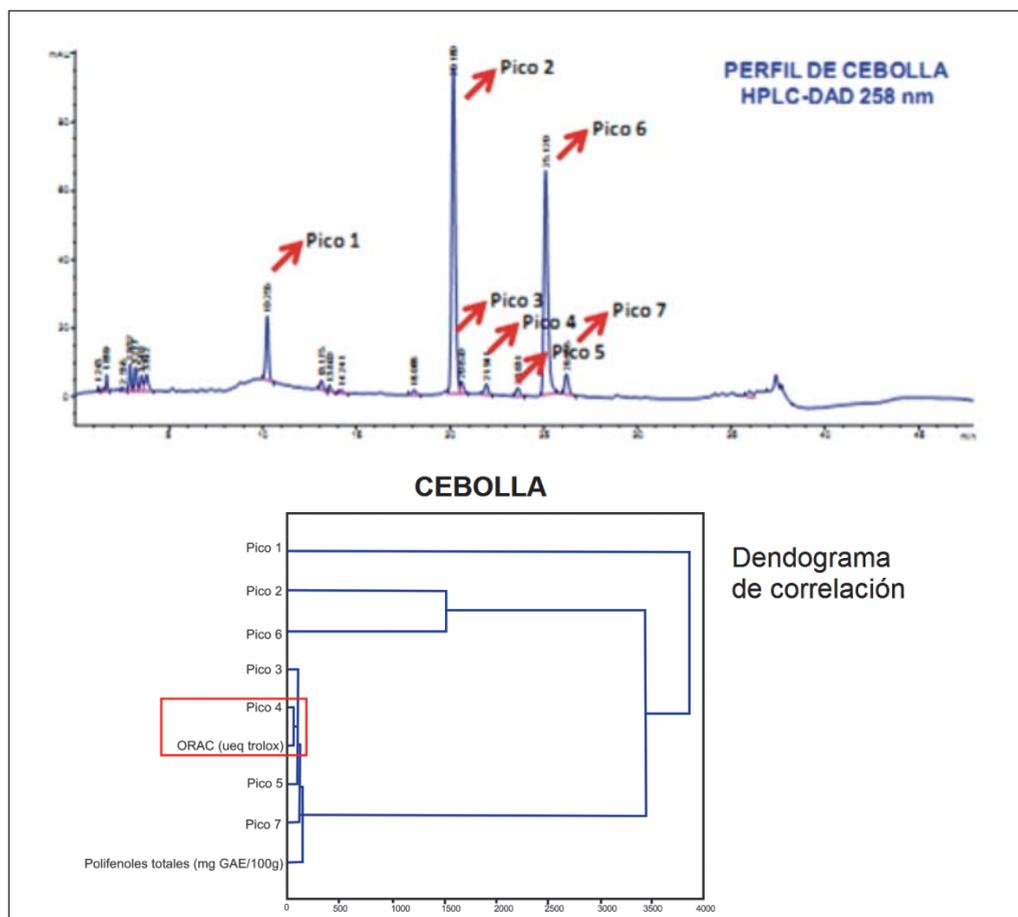


Figura 7. Perfil polifenólico y dendrograma de cebolla.

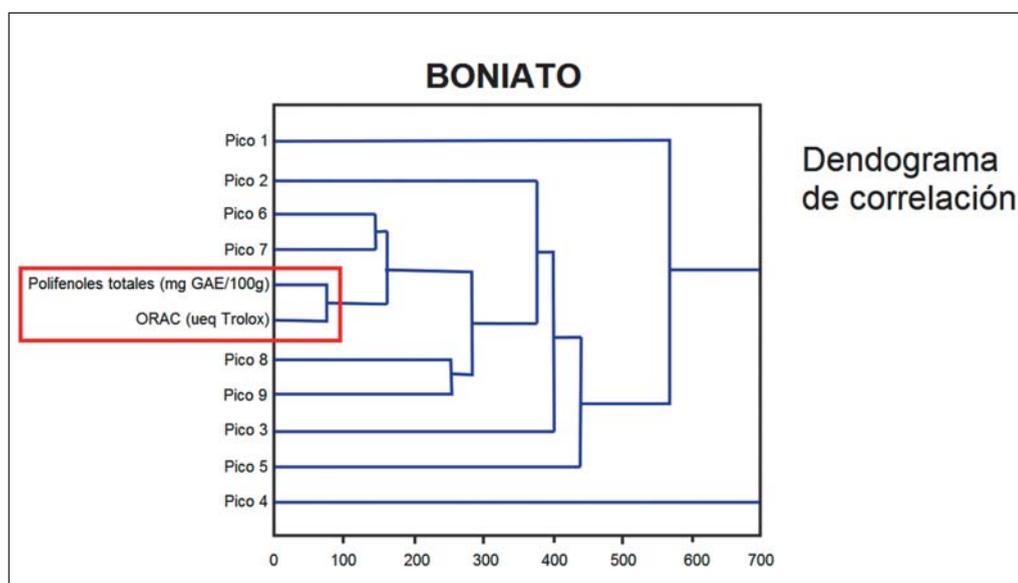


Figura 8. Perfil polifenólico y dendrograma de boniato.

cáscara. Sin embargo, algunos flavonoides ya caracterizados, particularmente un derivado de quercetina se ha

establecido como directo responsable de la actividad antioxidante obtenida (Figura 10).

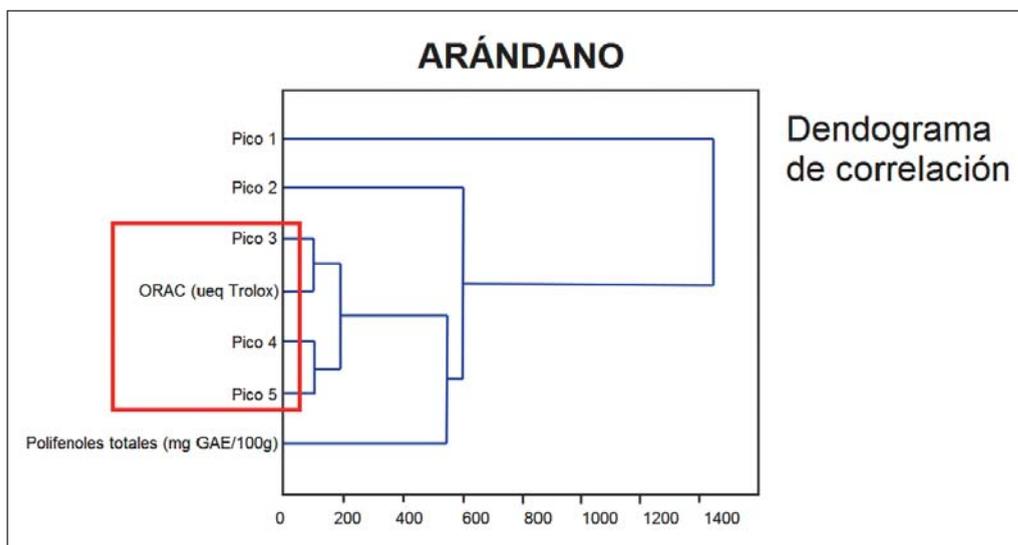


Figura 9. Perfil polifenólico y dendrograma de arándanos

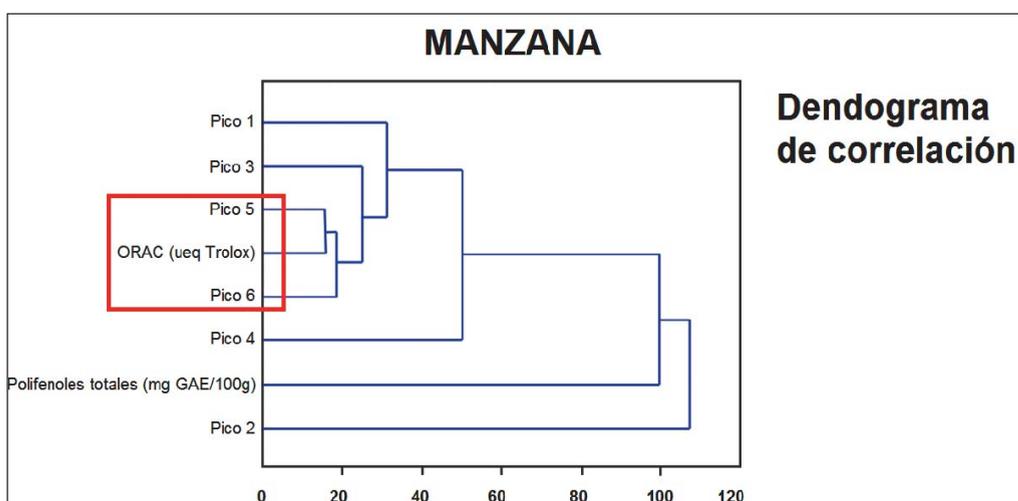


Figura 10. Perfil polifenólico y dendrograma de manzana

CONCLUSIONES

Las frutas y hortalizas que se producen en Uruguay, poseen importantes propiedades nutraceuticas y beneficiosas para la salud. A lo largo de este proyecto, se ha caracterizado su actividad antioxidante y en algunos casos, su potencial antiproliferativo frente a células cancerígenas. Los resultados presentados en este trabajo son solo un somero panorama de lo mucho que hay para conocer aun acerca del valor nutraceutico de las frutas y hortalizas así como la necesidad de estudiar la variabilidad estacional e intravarietal más profundamente para poder brindar herramientas para que la

población conozca las ventajas del consumo de cada tipo de vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

- ASAMI D.K.; HONG Y.J.; BARRETT D.M.; MITCHELL A.E. 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry and corn grown using conventional, organic and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* 51 (5), 2-26.
- BARRIOS, E. Aspectos Prácticos de la Clínica Oncológica. 2004; 2: 33-46) Registro Nacional del Cáncer, CHLCC 2006.

- BENBROOK CH.** 2005. Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing. An Organic Center State of Science Review. http://www.organic-center.org/reportfiles/Antioxidant_SSR.pdf.
- BOURNE D.; PRESCOTT J.** 2002. A comparison of the nutritional value, sensory qualities, and food safety of organically and conventionally produced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42 (1), 1-34.
- CACAE J.E., MAZZA G.,** 2002. Extraction of anthocyanins and other phenolics from Black Currants with sulfured water. *J. Agric. Food Chem.* 50 (21), 5939-5946.
- CARBONARO M., MATTERA M., NICOLIS., BERGAMO P., CAPPELLONI M.,** 2002. Modulation of antioxidant compounds in organic vs. conventional fruit (peach *Prunus persica* L., and pear *Pyrus communis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50 (19), 9-11.
- MEDEIROS, A., CALVETE, J., FRANCO FRAGUAS, L. Y OSINAGA, E.** Caracterización bioquímica y funcional de un glicoconjugado de hojas de *Myrsine coriacea* que reconoce la estructura tumor asociada GalNAc-Ser/Thr (Tn). XI Congreso de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. Setiembre de 2005, Minas, Uruguay
- MEDEIROS, A., CALVETE, J., BEROIS, N., INCERTI, M., BAY, S., FRANCO FRAGUAS, L. Y OSINAGA, E.** 2008. A novel Tn antigen lectin from *Myrsine coriacea* displays toxicity on human cancer cell lines. (en evaluación)
- WOESE K., LANGED., BOESSCH., BÖGL K. W.,** 1997. A comparison of organically and conventionally grown foods – Results of a review of the relevant literature. *J. Sci. Food and Agric.* 74: 281-293.

INIA Dirección Nacional
Andes 1365, P. 12
Montevideo
Tel.: 598 2902 0550
Fax: 598 2902 3633
iniadn@dn.inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50, Km 11
Colonia
Tel.: 598 4574 8000
Fax: 598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48, Km 10
Canelones
Tel.: 598 2367 7641
Fax: 598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: 598 4733 5156
Fax: 598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5, Km 386
Tacuarembó
Tel.: 598 4632 2407
Fax: 598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8, Km 281
Treinta y Tres
Tel.: 598 4452 2023
Fax: 598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy

www.inia.uy