

INVESTIGACIÓN Y AVANCES EN CALIDAD TECNOLOGICA DE LOS ALIMENTOS

Investigaciones y avances en calidad tecnológica de los
alimentos : trabajos completos V CICYTAC 2014 / Rafael

Borneo ... [et al.] ; compilado por Romina Cabrera ... [et al.] ; coordinación general de Victoria Rosati ; editado por Rafael Borneo ... [et al.] . - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico . Secretaría de Ciencia y Tecnología, 2015.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-4020-01-7

1. Calidad. 2. Alimentos. 3. Tecnología de los Alimentos. I. Borneo, Rafael II. Cabrera, Romina, comp. III. Rosati, Victoria , coord. IV. Borneo, Rafael, ed.
CDD 664

Diseño: Noriega Julieta. Área de Comunicación. Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.

ISBN 978-987-4020-01-7



EDITORES

Rafael, Borneo. (Fac. Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC – CONICET, Córdoba, Argentina).
Lorena, Sciarini. (ICYTAC–UNC - CONICET, Córdoba, Argentina).
María Eugenia, Steffolani. (ICYTAC–UNC - CONICET, Córdoba, Argentina).

PROLOGO

La calidad de los alimentos que se consumen es un factor de interés por parte de empresarios, organismos de control, estados y personas en general. En particular, los consumidores manifiestan una creciente preocupación por la calidad tecnológica, nutricional e inocuidad de los alimentos que ingieren. En los últimos años, se ha hecho hincapié sobre la calidad nutricional, ya que el ritmo de la sociedad actual lleva, en la mayoría de los casos, a una alimentación deficiente. Sin embargo, la aceptación de los consumidores está dada, en primera instancia, por la calidad tecnológica de los productos. Por este motivo, es un aspecto que no debe descuidarse.

La Calidad Tecnológica es una de las áreas de la Ciencia y Tecnología de los Alimentos, e incluye aspectos que determinan las características de cada producto, enfocados a la aceptación final de los mismos por parte de los consumidores, así como a aumentar su vida de anaquel. Las propiedades tecnológicas están determinadas por parámetros físicos y químicos que se definen para cada grupo de productos.

En este libro se presentan trabajos completos que añaden información más detallada sobre aquellos originalmente presentados de manera resumida durante el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (2014). Creemos que este libro es una contribución a la difusión del conocimiento científico-tecnológico en el área de los alimentos que se desarrolla en Argentina, Latinoamérica y el mundo.

RECUPERACIÓN DE ACEITE DE SOJA Y TIERRAS DE BLANQUEO UTILIZANDO DISTINTOS SOLVENTES

Aimaretti N.^{1,2}, **Clementz A.**^{1,4}, **Llopart E.**^{1,3},
Lostumbo M.¹, **Appendino M.**¹, **Codevilla A.**¹,
Yori J.C.⁴, **Coria D.**¹

1: Laboratorio de Investigaciones Aplicadas. Facultad de Química. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Pellegrini 1332, Rosario, Santa Fe, Argentina

2: INTA EEA Rafaela

3: CONICET

4: INCAPE-UNL-CONICET

naimaretti@ucel.edu.ar

Resumen: Las tierras de blanqueo agotadas pueden retener hasta un 45% de aceite, lo que provoca inconvenientes económicos y ambientales que justifican el estudio de su recuperación y la reutilización del material retenido. Para ello, se evaluó la extracción cuantitativa y cualitativa del material retenido en las tierras de blanqueo, con y sin tratamiento previo, utilizando solventes de distinta polaridad (hexano, cloroformo, acetona y etanol). Se concluye que no existe diferencia significativa en la extracción de aceite de las tierras de blanqueo partiendo de muestra húmeda o seca; que el solvente más adecuado para desorber las tierras es el cloroformo, y el tratamiento combinando de

etanol/hexano permitiría obtener aceites con posibilidad de reutilizarlos con fines alimenticios.

Palabras clave: tierras de blanqueo, aceites, solventes.

Abstract: Bleaching earth could retain up to 45% of oil, causing economic and environmental disadvantages that justify the study of recovery, while it enables the reuse of the retained oil. We evaluated the quantitative and qualitative extraction of material adsorbed into the land with and without pretreatment, using solvents of different polarity (hexane, chloroform, acetone and ethanol). We conclude that there is no significant difference in the extraction of oil from bleaching earth with and without pretreatment; the most suitable solvent for desorb them was chloroform; and the combination of ethanol and hexane would yield oils with the possibility of reuse for food.

Keywords: bleaching earth, oil, solvents.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de refinación, los aceites vegetales se someten a una etapa de decoloración denominada blanqueo. Dicha operación tiene como objetivo mejorar la calidad del aceite con relación al color, el sabor y la estabilidad oxidativa. Los materiales absorbentes utilizados para realizarla, como las tierras de blanqueo, actúan adsorbiendo sustancias indeseables tales como jabones, hierro, níquel y compuestos fosfatídicos, que pueden afectar el proceso o disminuir la calidad final del aceite (De Greyt 2013).

El blanqueo es un proceso que presenta la desventaja de que además las sustancias mencionadas anteriormente, también pueden adsorberse compuestos nutricionalmente deseables como los tocoferoles (González-Tovar *et al.* 2005) y los triglicéridos del mismo aceite. Cuando dichas tierras están saturadas pueden contener entre un 35 y 45% de sustancias oleosas, lo cual dificulta su posterior manejo por su elevado potencial de autocalentamiento y de autoignición (Boey *et al.* 2011). A este efecto contaminante se le suma el incremento de costo de proceso debido a las pérdidas de aceite originadas por la adsorción de éste y a la deposición final de las tierras usadas. Se estima que aproximadamente 1,5 – 2,0 millones de toneladas de tierras de blanqueo agotadas se desechan en el mundo y se estima que el 30% del aceite retenido en ellas puede ser recuperado (Kheang *et al.* 2006, Mat *et al.* 2011).

De lo expuesto anteriormente surge la importancia de recuperar el aceite retenido en las tierras de blanqueo para diversos usos, como ser: la producción de biodiesel

(Mat *et al.* 2011), producción de alimento para animales (Navas Martínez *et al.* 2011), entre otros; así como también la combustión directa de las tierras agotadas (Lee 2000). Sumado a esto beneficios, es posible recuperar las tierras de blanqueo, con el fin de reutilizarlas y reducir la contaminación.

El objetivo del trabajo fue identificar el solvente y las condiciones que permitan obtener un mayor grado de extracción del material oleoso adsorbido en las tierras de blanqueo descartadas por una industria aceitera zonal y evaluar la calidad del aceite extraído.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materias primas

Las tierras de blanqueo utilizadas fueron suministradas por BUNGE S.A. y transportadas al laboratorio de investigación de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, en un envase herméticamente cerrado a temperatura ambiente. Hasta el momento de utilizarse, las tierras se conservaron en un lugar fresco, seco y oscuro.

Las tierras de blanqueo se utilizaron con dos variantes que se denominaron: "sin tratamiento previo" cuando se las utilizó tal como se habían recibido y "con tratamiento previo" cuando se las utilizó previo secado de la muestra en estufa a 100 °C hasta pesada constante.

Extracción cuantitativa

La extracción se realizó en un equipo Soxhlet, utilizando 50 gramos de tierra de blanqueo y 200 ml de solvente, durante 3 horas. Para los distintos ensayos se utilizaron

como solventes: hexano ($T_e = 68\text{ }^\circ\text{C}$), acetona ($T_e = 56\text{ }^\circ\text{C}$), cloroformo ($T_e = 61\text{ }^\circ\text{C}$) y etanol ($T_e = 78\text{ }^\circ\text{C}$).

Determinación de humedad

Se realizó la determinación indirecta de Humedad por el método 44-19 (AACC 2000).

Determinación de acidez

La determinación de acidez se realizó por el método ASTM.D 664, en el cual se pesan 5 g de muestra, se agregan 25 ml de disolvente (Tolueno: 50, Isopropanol: 49 y agua destilada: 1) y se homogeneiza. Luego se procede a titular con la solución de NaOH 0,1 N.

Determinación de peróxidos

La determinación del contenido de peróxido se realizó por el método AOAC 965.33, pesando 5 g de la muestra y agregando 30 ml de disolvente (cloroformo, ácido acético, 3:2), agitando para disolver. Luego se añaden 0,5 ml de solución saturada de IK, se deja 1 minuto en oscuridad y posteriormente se adicionan 30 ml de agua destilada. Se titula el yodo liberado con Tiosulfato de Sodio 0,01 N y solución de almidón como indicador.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se llevó a cabo empleando el programa R. El análisis de las varianzas se realizó mediante ANOVA, con $p < 0,05$ y empleando el test de Tuckey para comparar entre distintas muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de material adsorbido

La cantidad de material extraído de las tierras de blanqueo agotadas, con y sin tratamiento previo, empleando distintos solventes se muestran en la **Tabla 1**, expresando los promedios y las desviaciones estándares en base húmeda (bh).

Tabla 1. Promedios y desviaciones estándares del porcentaje de aceite extraído de muestra húmeda (sin tratamiento previo) y seca (con tratamiento previo) con hexano, cloroformo, acetona y etanol.

SOLVENTE	Material extraído (%) (bh)			
	HEXANO	CLOROFORMO	ACETONA	ETANOL
Sin tratamiento	6,9 ± 0,8	39,9 ± 3,3	38,5 ± 3,1	38,4 ± 3,1
Con tratamiento	9,3 ± 0,9	34,5 ± 0,2	35,5 ± 10,0	30,7 ± 4,9

Del análisis de la **Tabla 1** se desprende que el único solvente que presenta diferencias significativas en los porcentajes de extracción para las muestras con y sin tratamiento previo fue el hexano, siendo favorecida la extracción al utilizar tierras de blanqueo con tratamiento previo. Sin embargo, el mayor porcentaje de extracción logrado con este solvente fue significativamente menor al alcanzado cuando se utilizó cloroformo, acetona o etanol, independientemente del tratamiento realizado a las tierras, ya que el tratamiento previo no redundó en ventajas cuantitativas de extracción al utilizar estos solventes.

Los resultados obtenidos pueden explicarse por la diferencia de polaridades de los solventes: el hexano posee una polaridad de 0,1; el cloroformo de 4,1; la acetona de 5,1 y el etanol de 5,2; y por la proporción de lípidos adsorbidos no polares (triglicéridos) y polares (fosfolípidos y glicolípidos, entre otros) (Li *et al.* 2013, Kheang *et al.* 2006, Ramluckan *et al.* 2014). A las diferencias en solubilidad se suman las interacciones generadas entre los distintos componentes del aceite. Todo esto conlleva a que no es simple seleccionar un disolvente orgánico para extraer toda la materia grasa presente en las tierras de blanqueo (Li *et al.* 2013).

Así, la mayor extracción lograda empleando cloroformo, acetona o etanol para desorber las tierras de blanqueo saturadas en la refinación del aceite de soja, puede deberse a que son solventes de polaridades elevadas y similares, por lo que extraerían compuestos de polaridad cercana, como ser fosfátidos y material no saponificable, los cuales se reducen notablemente durante el proceso de blanqueo (Li *et al.* 2013, Kheang *et al.* 2006). A la inversa, la menor extracción se obtuvo con hexano, tal como fue observado en el trabajo realizado por D'Oca *et al.* (2011), lo que indica que la cantidad de componentes lipídicos no polares, tales como los triglicéridos, presentes en la muestra, es inferior a la de compuestos de naturaleza polar.

Sin embargo, tal como lo manifiestan los resultados publicados por Navas Martínez *et al.* (2011) en su investigación en donde se cuantificó el aceite extraído de la tierra usada para la refinación de aceite de palma, el cloroformo logró la mayor extracción cuantitativa al utilizar tierras sin tratamiento previo.

Determinación de calidad del material extraído: Índice de acidez

El tipo de solvente utilizado para la recuperación del material oleoso adsorbido en las tierras de blanqueo agotadas y el proceso utilizado, determinan la calidad del material extraído. En el presente trabajo de investigación, la calidad del material oleoso extraído fue evaluada a través del índice de acidez y el índice de peróxidos, de modo de poder inferir posibles usos y/o aplicaciones.

Tal como se observa en la **Figura 1.A**, el índice de acidez del material oleoso no presentó diferencia estadísticamente significativa al ser extraído de tierras con o sin tratamiento previo de secado empleando los diferentes solventes, con lo cual se puede afirmar que la humedad inicial no afectó a la acidez del material extraído.

Por su parte, al comparar estadísticamente el índice de acidez del material extraído con cada solvente se advierte que no hubo diferencia significativa entre los índices de acidez del material extraído con hexano, acetona y etanol, siendo estos superiores a lo extraído con cloroformo. Es decir, que el material extraído con cloroformo presentó el menor índice de acidez, independientemente de las condiciones iniciales de la muestra (con o sin tratamiento previo de secado). En consecuencia, tal como fue observado en la investigación realizada por Navas Martínez *et al.* (2011), si lo que se desea es extraer aceite con menor grado de acidez se debe usar cloroformo, pero debido a su mayor toxicidad, lo más recomendable es utilizar etanol o n-hexano.

Si bien el índice de acidez del material extraído con cloroformo resulta ser el más bajo, éste fue en ambos casos superior a 3 mg NaOH/g, que es el valor deseado

para la utilización de aceites en procesos como la transesterificación (Mat *et al.* 2011).

Durante la etapa de refinado, la velocidad de adsorción de peróxidos es más lenta que la de pigmentos. Sin embargo, los peróxidos continúan adsorbiéndose debido a que las tierras de blanqueo son catalizadores de la conversión de peróxidos a compuestos secundarios de oxidación. Por consiguiente, la presencia de este tipo de compuestos en el material oleoso extraído de las tierras puede deberse a dos motivos: un proceso oxidativo del material durante la extracción o a la desorción de peróxidos provenientes del aceite crudo. Al respecto, se observa en **la Figura 1.B** los resultados del índice de peróxido del material extraído con cada solvente, utilizando tierras de blanqueo con y sin tratamiento previo. De su análisis se desprende que el tratamiento previo realizado a las tierras de blanqueo, modifica significativamente el índice de peróxidos del material extraído. A su vez, cuando se comparan los índices de peróxidos del material obtenido de tierras sin tratamiento con los diferentes solventes, se advierte que el índice fue significativamente mayor al utilizar etanol. Por otro lado, si el análisis se repite sobre las tierras que recibieron tratamiento previo, puede apreciarse que utilizando cloroformo y acetona se obtiene material oleoso con mayor índice de peróxidos que al utilizar los otros solventes. Siguiendo el lineamiento anterior, se observó que el mayor índice de peróxidos fue obtenido al desorber con etanol tierras sin tratamiento previo y el menor índice de peróxido fue obtenido al desorber con hexano o etanol tierras con tratamiento previo. Estos resultados coinciden con los publicados por Navas Martínez *et al.* (2011), quien afirmó que el hexano permite extraer aceite con un menor grado de oxidación,

destacando que en su baja extracción cuantitativa de aceite predominan triglicéridos. No obstante, cabe señalar que, en caso de que la oxidación del material obtenido sea un punto crítico de control de producto, esta determinación debería ser complementada con la determinación de otros compuestos de oxidación, tales como epóxidos (González-Tovar *et al.* 2005).

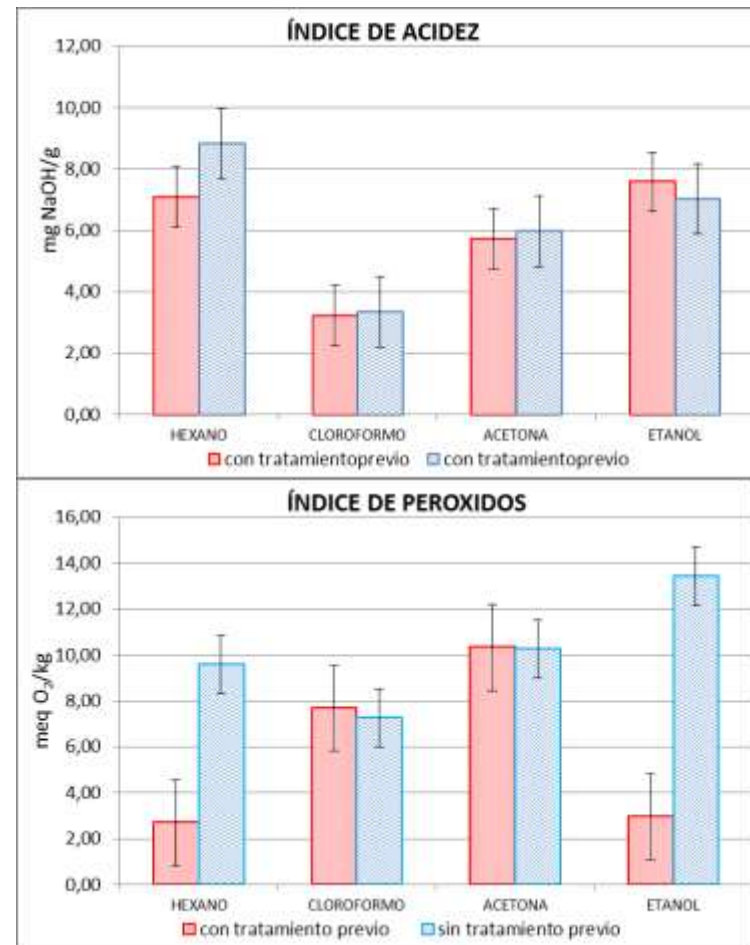


Figura 1: A. Índice de acidez del material extraído con cada solvente sobre muestra con y sin tratamiento previo. **B.** Índice de peróxidos del material extraído con cada solvente sobre muestra con y sin tratamiento previo.

Posibilidad de reutilización del material extraído

Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados anteriormente, se puede considerar que el solvente más adecuado para extraer el material adsorbido en las tierras de blanqueo agotadas, cuando el objetivo es recuperarlas y reutilizarlas, es el cloroformo. Esta afirmación se fundamenta en que si bien este solvente no presenta ventajas cuantitativas respecto del etanol y la acetona, sí presenta ventajas cualitativas, tal como se manifestó anteriormente.

En síntesis, el cloroformo es uno de los solventes que permiten lograr una extracción cuantitativamente mayor, ya sea partiendo de tierras con o sin tratamiento previo de secado. Además, el material obtenido presenta el menor índice de acidez y un índice de peróxidos aceptable, aún cuando se utilicen tierras de blanqueo sin tratamiento previo. Esto aporta una ventaja económica adicional, ya que al utilizar este solvente para recuperar las tierras de blanqueo agotadas se estaría evitando una costosa etapa de secado que sería necesaria si se utilizaría, por ejemplo, etanol como solvente, de modo de evitar la oxidación.

Generalmente la catálisis alcalina utilizada para la transesterificación de aceites para la producción de biodiesel es sensible al exceso de ácidos grasos libres por favorecer la formación indeseada de jabones y desactivar el catalizador. En el proceso industrial, cuando la materia

prima no presenta la calidad deseada se lleva a cabo un paso previo de neutralización de los ácidos grasos libres, hasta alcanzar el valor deseado de 2 % ó 3 mg NaOH/g como máximo. Otra alternativa es la catálisis ácida, que es menos sensible a la presencia de ácidos grasos libres y puede prevenir la formación de jabones, pero necesita mayor tiempo de reacción (Mat *et al.* 2011). Si bien estas alternativas provocan un aumento en el costo y en el tiempo, hacen posible la utilización de materias primas de bajo costo, que permitan obtener un biocombustible de segunda generación, en lugar de biodiesel obtenido a partir de aceites comestibles.

Otra alternativa viable, con la finalidad de extraer aceite de mejor calidad, sería utilizar tierras de blanqueo agotadas, sin tratamiento previo, pero procesarlas en atmósfera de nitrógeno (Kheang *et al.* 2006).

Además de la importancia de recuperar el aceite retenido en las tierras de blanqueo para los diversos usos, existiendo la posibilidad de utilizarlo para alimentación animal, y con un refinamiento suficiente para consumo humano, es de fundamental importancia el beneficio posible de recuperar las tierras de blanqueo, permitiendo su reutilización, reduciendo la contaminación y los costos de la industria.

CONCLUSIÓN

Para recuperar las tierras de blanqueo agotadas con la posibilidad de su posterior reutilización en el proceso de blanqueo, el cloroformo es el solvente de elección, ya que permitió obtener la mayor extracción de material independientemente de utilizar tierras con o sin tratamiento previo. Resta aún ensayar la eficiencia de las tierras recuperadas en el proceso de blanqueo. Además, es el solvente adecuado si la finalidad es recuperar aceite de calidad aceptable para producir un biocombustible de segunda generación.

Con la finalidad de recuperar aceite de calidad aceptable para elaborar alimentos concentrados o para posterior refinación con fines alimentarios, se podría realizar inicialmente una extracción con etanol, para remover ácidos grasos libres y otros compuestos polares o de oxidación y posteriormente una extracción con n-hexano, esto permitiría extraer aceite con un menor grado de oxidación y con predominio de triglicéridos.

BIBLIOGRAFÍA

- American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM D-664: Standard test method for acid number of petroleum products by potentiometric titration. Annual book of ASTM standards. 1989.
- American Association of Cereal Chemists. 2000b. A.A.C.C. Methods 38-12 and 46-13, tenth ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Boey PL, Saleh MI, Sapawe N, Ganesan S, Maniam GP, Ali DMH. 2011. Pyrolysis of residual palm oil in spent bleaching clay by modified tubular furnace and analysis of the products by GC-MS. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 91, 1: 199-204.
- D'Oca MGM, Viêgas CV, Lemões JS, Miyasaki EK, Morón-Villarreyes JA, Primel EG, Abreu PC. 2011. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and bioenergy*, 35, 4: 1533-1538.
- De Greyt, W. 2013. Edible Oil Refining: Current and Future Technologies. *Edible Oil Processing*, Second Edition. pag.127-151.
- González-Tovar LG, García JO, Rodríguez JN, Meza NG, Juárez LM. 2005. Cinética de absorción de pigmentos, peróxidos y tocoferoles durante el proceso de blanqueo del aceite de soja. *Grasas y aceites*, 56, 4: 324-327.
- Kheang LS, Foon CS, May CY, Ngan MA. 2006. A Study of Residual Oils Recovered from Spent Bleaching Earth: Their Characteristics and Applications. *American Journal of Applied Sciences*, 3: 10.

Lee CG, Seng CE, Liew KY. 2000. Solvent efficiency for oil extraction from spent bleaching clay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 11: 1219-1223.

Li Y, Fine F, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M, Carre P, Pages X, Chemat F. 2013. Evaluation of alternative solvents for improvement of oil extraction from rapeseeds. *Comptes Rendus Chimie*, revista on line: Doi : 10.1016/j.crci.2013.09.002. (20/02/2014).

Mat R, Ling OS, Johari A, Mohammed M. 2011. In situ biodiesel production from residual oil recovered from spent bleaching Earth". *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 6, 1: 53-57.

Navas Martínez, F. 2011. Recuperación de aceite en la tierra de blanqueo usada en la refinación de aceite de palma (tonsil actisil ref 261)". *APLIMATEC*, 1: 1.

Ramluckan K, Moodley KG, Bux F. 2014. An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. *Fuel*, 116: 103-108.

Agradecimientos

Se agradece a la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano (UCEL) por la financiación del proyecto

SÍNTESIS DE ALMIDÓN DE MANDIOCA ACETILADO Y SU APLICACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES

Alzate P.C.^{1,2}, Flores S.K.^{1,3}, Gerschenson L.^{1,3}

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina.

3: Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET, Argentina.

palzaticoc@gmail.com

Resumen: La acetilación es un método muy usado para la modificación del almidón. Este proceso puede realizarse por esterificación, en presencia de un catalizador y aplicando radiaciones de microondas. En este estudio se esterificó almidón de mandioca, obteniendo un grado de sustitución de 0,18, a fin de usarlo para la fabricación de películas comestibles y estudiar sus propiedades físicas. Las películas se elaboraron mediante la técnica de casteo a partir de suspensiones acuosas de almidón de mandioca acetilado (AMA) con o sin hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), con glicerol y con sorbato de potasio (KS, 0,3% p/p). Se estudiaron seis formulaciones diferentes. Se realizaron ensayos de tracción obteniéndose el módulo de Young, el esfuerzo a la ruptura y la deformación a la ruptura. Se

evaluó la permeabilidad al vapor de agua (PVA), la solubilidad en agua (S) y los parámetros de color a^* , b^* , L^* , índice de blancura e índice de amarillo. Las películas elaboradas con el AMA fueron flexibles, con buenas propiedades mecánicas. Se verificó una marcada influencia del contenido de HPMC y de glicerol en cuanto a la resistencia de las mismas a la tracción y su capacidad de deformación. La presencia de HPMC incrementó la S y el índice de amarillo y disminuyó la PVA.

Palabras clave: *almidón acetilado, microondas, películas comestibles, propiedades físicas.*

Abstract: Acetylation is a very common method used to modify starch. This type of modification can be made by esterification with a catalyst and applying microwave radiation. In this research, native cassava starch was esterified and it was obtained a product with a substitution degree of 0.18 ± 0.06 , with the purpose to use it for manufacturing edible films and to study their mechanical properties. The films were prepared by casting technique from slurries of acetylated cassava starch (ACS) with or without hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), glycerol and potassium sorbate (KS, 0.3% w/w). Six different formulations were used. Tensile tests were conducted and Young's modulus, stress and strain at break were obtained. The water vapor permeability (WVP), the water solubility (WS) and the color parameters a^* , b^* , L^* , whiteness index and

yellowness index (YI) were also evaluated. Films made with the ACS were flexible with good mechanical properties. A strong influence of the content of HPMC and glycerol was observed on the strength and the tensile strain capacity. The HPMC presence increased the WS and decreased the YI and also the WVP.

Keywords: *acetylated starch, microwave radiation, edible films, mechanical properties.*

INTRODUCCIÓN

El almidón es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza. Puede ser usado en diversas aplicaciones en la producción de alimentos a nivel industrial. Sin embargo, los almidones nativos tienen limitaciones para su uso: presentan baja resistencia a la deformación, baja temperatura de descomposición térmica, alta retrogradación y sinéresis. Estos hechos han motivado que en los últimos años se estudie la modificación del almidón para su uso como ingrediente en alimentos procesados, debido a las propiedades funcionales mejoradas del almidón modificado sobre los nativos. Numerosas modificaciones químicas se han aplicado al almidón para conferirle propiedades que sean útiles para aplicaciones particulares. Una modificación muy utilizada en el almidón es la acetilación, que es la esterificación del mismo con grupos acetilo para formar ésteres acetato. Los almidones acetilados son muy usados por su estabilidad, resistencia a la retrogradación, su incrementado poder de hinchamiento y solubilidad, y por su mejorada estabilidad al congelamiento-descongelamiento.

La medida de los cambios en las propiedades físico-químicas en el almidón acetilado comparado con el almidón nativo es proporcional al grado de acetilación o sustitución por los grupos acetilo (COCH_3) incorporados en las moléculas de almidón (Sodhi y Singh 2005).

Ya que en el proceso de acetilación del almidón, se reemplazan los grupos hidroxilos de la glucosa por grupos acetilos, los almidones acetilados son clasificados de acuerdo a su grado de sustitución (GS) en bajo, intermedio o alto. Los almidones acetilados con bajo grado de acetilación (0,01-0,2) pueden servir como formadores de películas, adhesivos, espesantes, estabilizantes y agentes de textura y son ampliamente usados en una gran variedad de alimentos tales como en salsas, productos horneados, alimentos congelados, alimentos para bebés, aderezos de ensaladas, rellenos para pasteles enlatados, sopas y snacks. Los almidones acetilados con GS intermedio (0,2 – 1,5) y alto (1,5 – 3) se caracterizan por tener alta solubilidad en acetona y en cloroformo. Los cambios producidos por la acetilación dependerán de la fuente botánica, el grado de sustitución, la proporción entre amilosa y amilopectina y la estructura molecular del almidón. Por otro lado, el número de grupos acetilo incorporados en la molécula de almidón durante la acetilación y la eficiencia de la reacción dependerán del tipo de reactivo, la concentración del reactivo, el pH de la reacción, la presencia del catalizador, el tiempo de reacción, el origen botánico y las características de tamaño y estructura de los gránulos de almidón (Colussi *et al.* 2014).

En los últimos años se ha incrementado el interés en el desarrollo de películas y recubrimientos comestibles, debido a evidencias encontradas acerca de sus efectos benéficos sobre alimentos frescos y procesados, al igual

que por su capacidad para mejorar la calidad global de los alimentos (Chillo *et al.* 2008). Las películas comestibles son capaces de proporcionar muchas ventajas funcionales como mejorar la integridad estructural y resistencia a la manipulación; ser portadoras de antimicrobianos, antioxidantes y otros preservadores; controlar la ubicación o tasa de liberación de aditivos; retener sabores y volátiles y reducir los desechos de empaques asociados con los alimentos procesados. Las películas elaboradas a partir de almidón son inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y biodegradables. El almidón de mandioca nativo o modificado está incrementando su utilidad en la industria de alimentos, debido a que posee importantes propiedades tales como: alta transparencia, alta resistencia a la acidez mostrando así su idoneidad para el desarrollo de salsas; por la alta viscosidad que confiere a los productos, puede aplicarse en muchos productos alimenticios como postres, budines, sopas, rellenos y gomas (Flores *et al.* 2007).

Con el fin de mejorar las propiedades físicas y funcionales de las películas y recubrimientos basados en almidón, se ha propuesto la inclusión en las mismas de sustancias hidrofóbicas y/o componentes antimicrobianos. Varios antimicrobianos naturales han sido incorporados a películas de almidón y se ha evaluado su efectividad. Estos incluyen quitosano, extractos naturales, aceites esenciales y preservadores alimenticios tales como ácido sórbico y sus sales minerales (Zhang *et al.* 2015). Tales películas y recubrimientos comestibles antimicrobianos

son presentados como una tecnología emergente capaz de incrementar la seguridad y la vida útil de productos por medio del contacto directo. Su mecanismo de acción está basado en la liberación controlada de agentes activos sobre la superficie del producto donde son colocados; por lo tanto mantienen concentraciones efectivas donde y cuándo estos son requeridos (Férrandez-Pan *et al.* 2014).

Los objetivos del presente trabajo fueron desarrollar películas comestibles a partir de almidón de mandioca acetilado y caracterizarlas en cuanto a sus propiedades mecánicas, color, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Proceso de modificación del almidón nativo (acetilación) aplicando radiaciones de microondas

Para esta modificación se utilizó un reactor de teflón resistente a altas presiones y un equipo de microondas Ethos Plus (Milestone, Italia). Siguiendo los ensayos realizados por Shogren y Biswas (2006), se acondicionó una cantidad de almidón de mandioca nativo en dicho reactor y se le adicionó anhídrido acético. Posteriormente se agregó lodo (I_2) y se mezcló, hasta lograr su dispersión completa en la mezcla. Las condiciones de trabajo en el microondas fueron: una potencia máxima aplicada de

450W, un tiempo de tratamiento de 3,5 min para alcanzar la máxima temperatura de 90°C. Una vez que la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente, se adicionó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a fin de reducir el I_2 a Ioduro y se trató con etanol durante 30 minutos con agitación. Posteriormente se filtró mediante embudo Buchner y se transfirió el producto sólido a un vaso conteniendo agua destilada agitando durante 10 minutos para su lavado. El lavado con agua se repitió 3 veces, filtrando al final de cada etapa. Por último, se realizó un lavado con etanol, se filtró y la masa obtenida se secó en estufa de vacío a 60°C durante toda la noche. El producto seco fue molido y tamizado.

Determinación del Grado de Sustitución del almidón acetilado

Para la determinación del grado de sustitución (GS), se usó una técnica volumétrica (Bello-Pérez et al. 2010). Se pesó 1 gramo de muestra del almidón acetilado, se colocó en frascos Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 50 mL de una solución acuosa de etanol al 75% v/v. La mezcla anterior se agitó durante 30 minutos en agitador magnético provisto de platina calefactora, manteniendo una temperatura de 50°C. Luego de enfriamiento a temperatura ambiente, se adicionaron 20 mL de una solución de NaOH 0,5N. Los frascos Erlenmeyer, se agitaron durante 24 horas a temperatura ambiente a fin de proceder a la saponificación

(desesterificación en medio básico) con liberación de los grupos acetilo.

El exceso de álcali se tituló con HCl 0,5N usando fenolftaleína como indicador. También se preparó una muestra blanco, a partir de almidón nativo. El porcentaje de acetilos y el grado de sustitución (GS) fueron calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Acetilo} = \left[\frac{(\text{ml blanco}) - (\text{ml muestra}) \times \text{Normalidad HCl} \times 0.043 \times 100}{(\text{peso de la muestra en gramos})} \right]$$

$$GS = \frac{(162 \times \% \text{ Acetilo})}{[4300 - (42 \times \% \text{ Acetilo})]} \quad (1)$$

Siendo (mL blanco), el volumen de HCl 0,5N consumido para la muestra de almidón nativo en la titulación y (mL muestra), el volumen de HCl 0,5N consumido por cada muestra de almidón acetilado en la titulación.

Proceso de elaboración de las películas

En la fabricación de las películas comestibles se utilizaron como biopolímeros: almidón de mandioca acetilado e HPMC. Todas las soluciones fueron elaboradas con agua

destilada. Como agente plastificante se utilizó glicerol y como agente antimicrobiano se empleó KS - calidad analítica.

La **Tabla 1** muestra la composición de los distintos sistemas estudiados. En todos los casos, la masa total de la solución formadora de las películas usada fue de 300 g.

Tabla 1. Composición de las películas comestibles (g componente/ 100 g de sistema)

SISTEMA	ALMIDÓN ACETILADO (g)	HPMC (g)	GLICEROL (g)
S1	3,34	0	0,85
S2	2,67	0,67	0,85
S3	1,67	1,67	0,85
S4	3,34	0	1,67
S5	2,67	0,67	1,67
S6	1,67	1,67	1,67

Para la obtención de las películas comestibles, se aplicó la técnica de casteo. Se prepararon dos soluciones por separado: la primera, consistió en una mezcla de almidón de mandioca, glicerol, sorbato de potasio y agua, la cual

se mezcló en un agitador magnético provisto con platina calefactora. Al mismo tiempo se preparó la segunda solución que contenía HPMC y agua; ambas soluciones se llevaron a una temperatura final de 82°C para lograr la gelatinización del almidón y la gelación de la HPMC. Posteriormente, la solución de almidón se adicionó a la de HPMC a fin de integrar ambos biopolímeros. Debido a la acción anterior, la temperatura de la mezcla descendió a 50-60°C por lo que se continuo con el calentamiento nuevamente hasta 82°C. Luego, se eliminaron las burbujas de aire en la solución final obtenida, mediante aplicación de vacío durante unos minutos. Posteriormente, se vertieron 20 gramos de la solución formadora de películas sobre placas de Petri de plástico. El proceso de secado se llevó a cabo en una cámara de convección forzada de aire a 35°C por 24 horas. Una vez constituidas, las películas fueron separadas de la placa de Petri, y se estabilizaron a 25°C durante 15 días, en atmósfera de HR 57,6% generada dentro de un desecador conteniendo una solución saturada de bromuro de sodio (NaBr), previamente a la evaluación de sus propiedades físico-químicas.

Ensayo Mecánico de Tracción

Para la realización de este ensayo, se usó una máquina universal de testeo Instron Testing Machine modelo 3345 (Instron Corp., Massachusetts, USA), provista de una celda de carga de 100N. La separación inicial entre las mordazas fue de 20 mm (d₀) y la velocidad de

movimiento vertical de la mordaza superior fue de 50mm/min. Para este ensayo se usaron 10 especímenes de cada formulación de las películas. La geometría de las muestras fue rectangular en todos los casos. A partir de los datos obtenidos de fuerza (F, N) y desplazamiento (d, mm), se obtuvieron las curvas de esfuerzo (σ , MPa) versus deformación (ϵ), siendo $\sigma = F/A$ (A: área transversal de la muestra en m) y $\epsilon = d/d_0$. A partir de dichas curvas, se determinaron los siguientes parámetros para todos los sistemas:

Esfuerzo a la ruptura (σ_r)

Deformación a la ruptura (ϵ_r)

Modulo elástico o módulo de Young (E)

Color

Para la determinación de color se utilizó el fotocolorímetro (Minolta CM-508d, Japón). El equipo fue calibrado con placas blanca y negra patrones. Se midieron los parámetros CIELab (L^* , a^* , b^*) y el índice de amarillo (YI) de acuerdo a la norma ASTM D1925. Adicionalmente, se midieron los parámetros: índice de blancura (WI) de acuerdo a la norma ASTM E313 y se calculó la opacidad (OP).

Solubilidad

Siguiendo la metodología de Flores *et al.* (2007) para este ensayo, se realizó la determinación del porcentaje inicial de materia seca mediante el secado de discos de 2 cm de diámetro en una estufa de vacío a 100°C, durante 24 horas. En paralelo, otros discos de diámetro equivalente, fueron cortados, pesados y sumergidos en 50 mL de agua destilada, durante 24 horas a 25°C. Posteriormente a la inmersión, las películas fueron filtradas y secadas (100°C en estufa de vacío, durante 24 horas) a fin de determinar la masa seca no solubilizada. La solubilidad en agua se determinó por triplicado y se calculó su valor, expresado en porcentaje, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{\text{Masa seca inicial} - \text{Masa seca final} \times 100}{\text{Masa seca inicial}} \right) \quad (2)$$

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinada gravimétricamente, a 25°C, adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000). Para realizar el ensayo de permeabilidad se utilizaron celdas de acrílico y como desecante se usó cloruro de calcio (CaCl_2). Una vez preparadas, las celdas se ubicaron en una cámara de humedad y temperatura controlada (70% H.R., presión parcial de vapor de agua ≈ 2288 Pa). Luego de aproximadamente 12 horas se alcanzó el

régimen estacionario de transmisión de vapor de agua a partir del cual se registraron los incrementos de peso de las celdas durante tres días. Utilizando un ajuste por regresión lineal de los datos de variación de peso en función del tiempo, se calculó la velocidad de transmisión de vapor de agua y posteriormente la PVA.

Análisis Estadístico

Las diferencias significativas entre los distintos sistemas se establecieron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de significación de 0,05 y aplicando un test a posteriori (LSD). Los resultados son informados en base a su promedio y desvío estándar. El software Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención del almidón acetilado y GS

El procedimiento de modificación del almidón de mandioca nativo, mediante acetilación con anhídrido acético y yodo como catalizador en microondas permitió obtener un producto en forma de polvo fino color blanco, similar al almidón de mandioca nativo. El almidón de mandioca acetilado en el microondas, presentó un grado de sustitución promedio de $0,18 \pm 0,06$.

Caracterización de las películas

Ensayos de Tracción

La caracterización mecánica de las películas proporciona información valiosa acerca de su flexibilidad y resistencia; esta información es útil para poder predecir sus posibles aplicaciones en la industria de alimentos. A continuación se detallan en la **Tabla 2**, los resultados correspondientes a los parámetros evaluados para las películas fabricadas a partir de almidón acetilado:

Tabla 2. Parámetros obtenidos para los ensayos mecánicos (tracción) de las películas elaboradas a partir de almidón acetilado de mandioca.

SISTEMA	Módulo Young (E, MPa)	Esfuerzo (σ , MPa)	Deformación (ϵ %)
S1	126 ± 11^c	$4,3 \pm 0,1^9$	42 ± 8^k
S2	432 ± 38^a	11 ± 2^b	5 ± 2^l
S3	389 ± 50^a	12 ± 1^b	20 ± 3^m
S4	$0,40 \pm 0,01^d$	$0,30 \pm 0,01^h$	344 ± 4^n
S5	42 ± 5^e	$2,9 \pm 0,2^i$	36 ± 3^o
S6	$18,7 \pm 0,8^f$	$3,9 \pm 0,5^j$	66 ± 3^p

Letras iguales en una misma columna
significa ausencia de diferencias
significativas entre sistemas ($p > 0,05$).

Se puede observar que el nivel de glicerol adicionado afecta notablemente las propiedades mecánicas de las películas. Todos los sistemas formulados con mayor contenido de glicerol (S4 a S6) disminuyeron el MY y σ_r , como así también aumentaron la deformación, en comparación con los sistemas con menor cantidad de glicerol (S1 a S3). En investigaciones hechas por Vieira *et al.* (2011) se evidenció que este plastificante es compatible con la amilosa del almidón ya que disminuye la atracción intermolecular e interfiere con el empaquetamiento de los biopolímeros. Además, la adición de glicerol causa un incremento en la movilidad de las cadenas de amilosa y amilopectina, lo cual supera el efecto contrario de re-cristalinización e incrementa la flexibilidad de las películas. Por otro lado, los resultados obtenidos mostraron un incremento del MY y σ_r con la incorporación de HPMC, siendo los valores más altos para los sistemas con menor nivel de glicerol (MY: 432 MPa y σ_r : 10,6 MPa para el sistema S2; y MY: 389 MPa y σ_r : 11,5 MPa para el sistema S3). La deformación fue más baja cuando el contenido de HPMC fue 0,67% a ambos niveles de glicerol (5% para S2 y 36% para S5). En el caso de las películas S3 y S6, se observó que el agregado de 1,34% de HPMC, provocó un cambio en el perfil de la curva de tracción (**Figuras 1 y 2**) mostrando una tendencia, en general significativa, a un menor MY y a una mayor σ_r respecto de los sistemas S2 y S5.

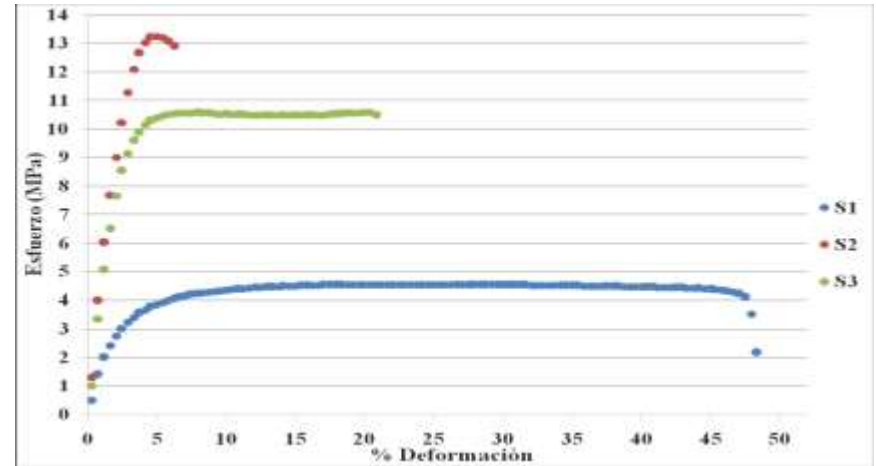


Figura 1. Curvas típicas de tracción de películas elaboradas a partir de almidón acetilado con menor nivel de glicerol.

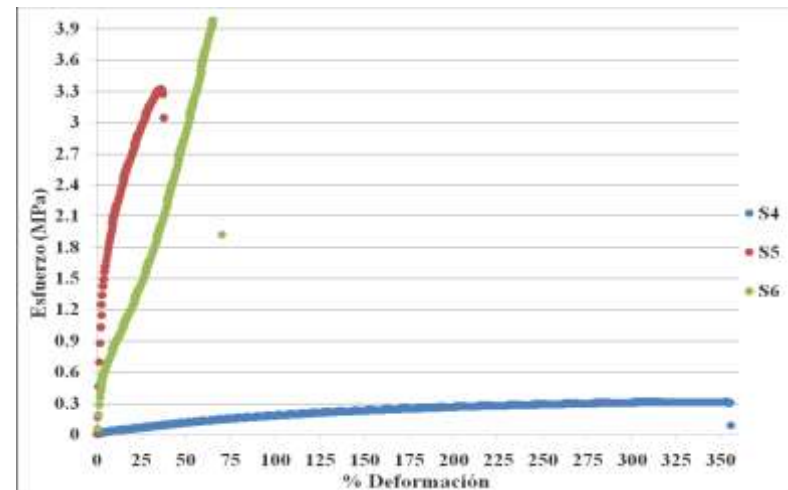


Figura 2. Curvas típicas de tracción de películas elaboradas a partir de almidón acetilado con mayor nivel de glicerol.

Color

Los parámetros de color de las películas elaboradas con almidón acetilado, se muestran resumidos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resultados de los parámetros de color L* (Luminosidad), a* (Índice de rojo (+) o verde (-)), b* (Índice de amarillo (+) o azul (-)), YI (Índice de Amarillo), WI (Índice de Blancura) y Opacidad de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado.

Sistemas	L*	a*	b*	YI
S1	90,5 ± 0,2 ^h	- 1,5 ± 0,1 ^d	5,7 ± 0,2 ^l	10,6 ± 0,3 ^p
S2	91,7 ± 0,2 ^b	- 1,5 ± 0,1 ^d	3,9 ± 0,4 ^e	6,4 ± 0,3 ^g
S3	91,5 ± 0,2 ^b	- 1,60 ± 0,03 ^j	3,7 ± 0,2 ^e	6,4 ± 0,3 ^g
S4	91,2 ± 0,2 ^a	- 1,20 ± 0,05 ^k	7,3 ± 0,1 ^m	13,4 ± 0,2 ^q
S5	91,3 ± 0,2 ^a	- 1,30 ± 0,06 ^c	3,5 ± 0,2 ⁿ	5,4 ± 0,3 ^f
S6	90,8 ± 0,3 ⁱ	- 1,30 ± 0,03 ^c	3,2 ± 0,1 ^o	5,4 ± 0,3 ^f

Letras iguales en una misma columna significan ausencia de diferencias significativas entre sistemas (p>0,05).

Se puede observar que los parámetros de color más afectados por la formulación de las películas fueron b* y YI. Para ambos niveles de glicerol y en presencia de HPMC, tanto el parámetro b* como el YI (relacionados con el color amarillo) disminuyeron significativamente (p>0,5), tomando valores desde 10,6 a 5,4 para YI, de 7,3 a 3,2 para b*. Los valores de L* y a* mostraron leves cambios de acuerdo a la formulación (90.5 a 91.7 y -1.2 a -1.6 respectivamente). De acuerdo a estudios realizados por Rotta *et al.* (2009) las películas que contienen un 100% de HPMC se caracterizaron por ser brillantes y transparentes.

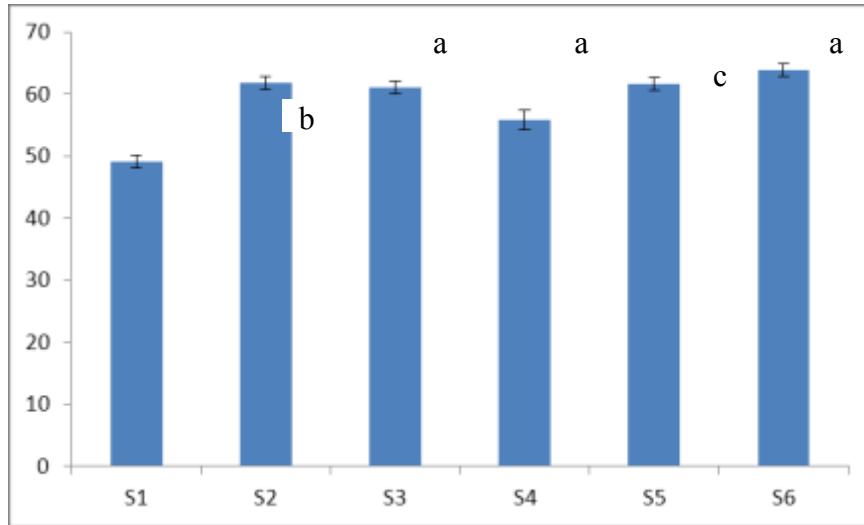


Figura 3. Índice de blancura (WI) de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0,05$).

En la **Figura 3** se pueden observar los resultados obtenidos para el parámetro índice de blancura (WI) para todos los sistemas elaborados con almidón acetilado de mandioca. Los sistemas S1 y S4 (ausencia de HPMC) presentaron los valores más bajos de WI. Al incorporar HPMC a la formulación (sistemas S2, S3, S5 y S6) los valores de WI aumentaron significativamente. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre dichos sistemas, registrándose valores de alrededor de 63 ± 1 .

Bascla *al.* (2013) informaron que la adición de HPMC a la formulación de películas a base de almidón de mandioca y conteniendo antimicrobianos, determinó la obtención de películas más blancas.

Solubilidad

La solubilidad en agua es una propiedad muy importante de las películas comestibles, ya que algunas aplicaciones potenciales pueden requerir de la insolubilidad en agua de las mismas para mantener la integridad de un producto o en otros casos, una alta solubilidad de las películas puede ser requerida para un apropiado consumo del producto alimenticio (Turhan y Sahbaz, 2004).

En la **Figura 4** se muestran los resultados obtenidos para las películas elaboradas con almidón acetilado y ambos niveles de glicerol usados. De manera general, la tendencia observada es un aumento de la solubilidad al aumentar el contenido de HPMC en todas las formulaciones estudiadas. Para la combinación de 1,34% de HPMC y 1,7% de glicerol, se obtuvo la mayor solubilidad. En estudios realizados por Espinel *et al.* (2014) se observó que una disminución en el contenido de HPMC y un aumento en el contenido de almidón de mandioca, disminuyó la solubilidad. Lo anterior sugiere

que la adición de HPMC a las películas con almidón genera una matriz más susceptible a la interacción con el agua. De acuerdo a los resultados obtenidos, es posible controlar la solubilidad de películas elaboradas con HPMC/almidón acetilado/glicerol, cambiando la proporción de los biopolímeros usados en su fabricación.

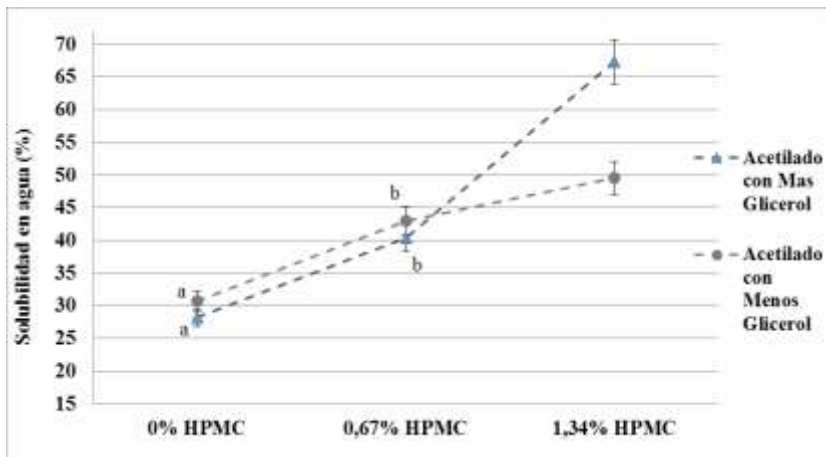


Figura 4. Resultados obtenidos para el ensayo de solubilidad (%) en agua de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado. Letras iguales en una mismo nivel de HPMC significa ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0,05$).

Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua es la propiedad más ampliamente estudiada en películas comestibles, principalmente debido a la importancia del agua en las reacciones deteriorativas de los alimentos.

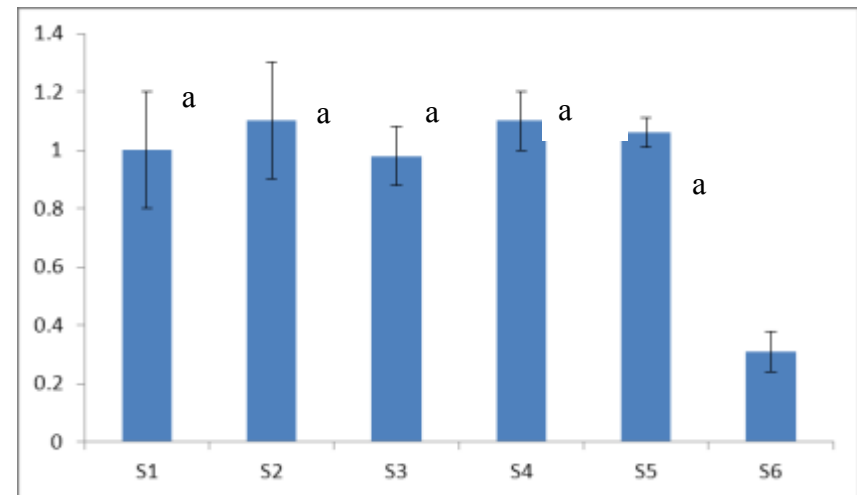


Figura 5. Resultados de ensayo de permeabilidad al vapor de agua ($PVA \times 10^9$) de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado. Letras iguales significan ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0,05$).

En investigaciones realizadas por López *et al.* (2013) se mostró que al usar almidón y glicerol, ambos ejercen un efecto positivo sobre esta propiedad, siendo el plastificante el que ejerce un efecto más importante. En el presente trabajo, no se observó la misma tendencia ya que, en general, se observa que no hay diferencias significativas entre los resultados de PVA para los sistemas S1 a S5. La menor PVA se observó para las películas S6 con mayor contenido de HPMC, siendo el valor obtenido de $(0,31 \pm 0,07) \times 10^{-9}$ g/Pa.m.s, lo cual es, aproximadamente, un orden de magnitud más bajo que el correspondiente al sistema S4 sin HPMC y con similar contenido de plastificante, $(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-9}$ g/Pa.m.s, indicando la mayor influencia del contenido del derivado de celulosa en la permeabilidad. Basch *et al.* (2013) informaron valores de $1,4-1,6 \times 10^{-9}$ g/Pa.m.s para la PVA de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca nativo, HPMC y glicerol.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aplicó un método de síntesis de almidón acetilado (AMA) aplicando radiaciones de microondas, el cual permitió obtener un almidón con bajo grado de sustitución y capacidad filmogénica.

Las películas elaboradas con el almidón AMA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), glicerol y sorbato de potasio (KS) fueron flexibles y con buenas propiedades mecánicas.

La incorporación de HPMC a la formulación de las películas, provocó un aumento del MY, esfuerzo y deformación a la ruptura y del índice de blancura.

Las películas elaboradas únicamente con el biopolímero almidón acetilado, sin la adición de HPMC, fueron las que mostraron los valores más bajos en cuanto a la solubilidad y resultaron a su vez con mayores valores de b^* y YI.

De manera general, los valores obtenidos para el ensayo de permeabilidad al vapor de agua (PVA) usando almidón acetilado de mandioca, fueron similares que los reportados en la literatura para formulaciones basadas en sistemas de almidón nativo de mandioca y la menor PVA se observó para las películas con mayor contenido de HPMC.

Estos resultados indican que las propiedades de las películas son fuertemente dependientes de su formulación. La selección de la película más adecuada, dependerá del objetivo de su aplicación. En el caso de los materiales de empaquetamiento de alimentos, se requiere que los mismos sean flexibles, resistentes a la tracción, de baja PVA y solubilidad. Las tres primeras consideraciones, imponen la presencia de HPMC y mayor cantidad de plastificante, mientras que la última, requiere un menor contenido del derivado de celulosa. Por lo tanto la formulación S5 (almidón acetilado 2,67%, HPMC 0,67% y glicerol 1,67% p/p) resultó la más apropiada.

BIBLIOGRAFÍA

Basch C, Jagus R, Flores S. 2013. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 2419–2428.

Bello-Pérez L, Agama-Acevedo E, Zamudio-Flores P, Mendez-Montealvo G, Rodríguez Ambríz S. 2010. Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1434-1440.

Chillo S, Flores S, Mastromatteo M, Conte A, Gerschenson L, Del Nobile MA. 2008. Influence of glycerol and chitosan on tapioca starch-based edible film properties. *Journal of Food Engineering*, 88: 159–168.

Colussi R, Zanella Pinto V, Mello SL, Vanier N, Villanova F, Marques R, Da Rosa E, Guerra, A. 2014. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydrate Polymers*, 103: 405–413.

Espinel R, Flores S, Gerschenson L. 2014. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. *Materials Science and Engineering C*, 36: 108–117.

Férrandez-Pan I, Carrión-Granda X, Maté J. 2014. Antimicrobial efficiency of edible coatings on the preservation of chicken breast fillets. *Food Control*, 36: 69-75.

Flores S, Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40: 257–265.

López O, Zaritzky N, Grossmann M, García M. 2013. Acetylated and native corn starch blend films produced by blown extrusión. *Journal of Food Engineering*, 116: 286–297.

Rotta J, Ávila R, Kehrwald AM, Mariz de Oliveira G, Dias de Melo R, Manique PL. 2009. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering C*, 29: 619–623.

Shogren R, Biswas A. 2006. Preparation of water-soluble and water-swelling starch acetates using microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, 64: 16–21.

Sodhi NS, Singh N. 2005. Characteristics of acetylated starches prepared using starches separated from different rice cultivars. *Journal of food engineering*, 70: 117-127.

Turhan K, Sahbaz F. 2004. Water vapor permeability, tensile properties and solubility of methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Engineering*, 61: 459–466.

Vieira MG, Altenhofen M, Oliveira L, Masumi M. 2011. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47: 254–263.

Zhang L, Li R, Dong F, Tian A, Li Z, Dai Y. 2015. Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with e-poly-L-lysine. *Food Chemistry*, 166: 107–114.

ASTM E-96: Standard test methods for water vapor transmission of materials. 24 CFR 3280.504 (a). American society for testing materials.

ASTM E313, "Standard Practice for Calculating Yellowness and Whiteness Indices from Instrumentally Measured Color Coordinates".

ASTM D1925-70(1988): Test Method for Yellowness Index of Plastics.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiamiento de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 2011-2014, 20020100100726), CONICET (PIP 11220090100531) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2008-2131; PICT-2012-0183).

CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES ANTIMICROBIANAS ELABORADAS A PARTIR DE ALMIDÓN DE MANDIOCA ACETILADO CONTENIENDO SORBATO DE POTASIO Y CARVACROL

Alzate P.C.^{1,2}, Flores S.K.^{1,3}, Gerschenson L.^{1,3}

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina.

3: Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET, Argentina.

palzaticoc@gmail.com

Resumen: La fabricación de envases alimenticios usando biopolímeros junto con antimicrobianos, es uno de los desarrollos más prometedores, ya que estos materiales permiten reducir la contaminación ambiental y minimizar el deterioro microbiológico. En este trabajo, se fabricaron películas de almidón de mandioca acetilado/HPMC conteniendo sorbato de potasio (KS) y carvacrol. Las películas se obtuvieron mediante casteo. Se realizaron ensayos de tracción obteniéndose el módulo de Young, esfuerzo a la ruptura y deformación a la ruptura. Se evaluaron la permeabilidad al vapor de agua, solubilidad en agua y parámetros de color: L*, a*, b*, índice de

blancura, opacidad e índice de amarillo. Para evaluar la actividad antimicrobiana, se realizó un ensayo de barrera frente a *P. fluorescens* y *Z. bailii*. Se observó que la adición de antimicrobianos redujo la resistencia mecánica de las películas, incrementó la deformación, mejoró las propiedades de barrera al vapor de agua sin modificar la solubilidad. Por otro lado, las películas con carvacrol y KS fueron efectivas contra *Z. bailii* e inhibieron por completo el desarrollo de la bacteria. Se concluye que el carvacrol y el KS pueden ser utilizados efectivamente para conferir propiedades antimicrobianas y aumentar las propiedades de barrera en estos materiales.

Palabras clave: *películas comestibles, almidón acetilado, sorbato de potasio, carvacrol, acción antimicrobiana.*

Abstract: Manufacturing of food packaging using biopolymers added jointly with antimicrobials, is one of the most promising developments, since these materials can reduce environmental pollution and minimize microbiological spoilage. In this research, acetylated cassava starch/HPMC films containing potassium sorbate (KS) and carvacrol were evaluated. The films were obtained using casting technique. Tensile stress, strain at break and Young modulus were evaluated. Water vapor permeability, water solubility (S) and color parameters were also determined. To analyze the antimicrobial

activity, a barrier assay was performed against *P. fluorescens* and *Z. bailii*. It was observed that the presence of antimicrobial agents reduced mechanical strength of the films and increased deformation and barrier properties to water vapor without changing the solubility. In addition, carvacrol-KS films were effective against *Z. bailii* and completely inhibited bacteria growth. It is concluded that the carvacrol and KS can be effectively used to impart antimicrobial properties and increase the barrier properties in these materials.

Key Words: *edible films, acetylated starch, potassium sorbate, carvacrol, antimicrobial activity.*

INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana superficial de la mayoría de los alimentos, tiene alta probabilidad de ocurrencia debido al contacto con el medio ambiente. Se han realizado muchos intentos para mejorar la seguridad en los alimentos y retrasar el deterioro microbiológico con el uso de aerosoles o emulsiones de antimicrobianos. Sin embargo, la aplicación directa en la superficie de estas sustancias antimicrobianas sobre los alimentos, tiene beneficios limitados debido a que estas sustancias bactericidas o bacteriostáticas, podrían inactivarse parcialmente como consecuencia de su interacción con los constituyentes del producto o difundir hacia el seno del alimento lo cual conllevaría a la necesidad de adicionar mayores cantidades de preservadores para garantizar su efectividad (Chana-Thaworn *et al.* 2011). Una de las formas de aplicación en superficie actualmente investigadas es el soporte de los antimicrobianos en películas y recubrimientos comestibles. Las proteínas, los lípidos y los polisacáridos son ampliamente usados para la preparación de estos materiales. En este sentido, la industria de alimentos ha incrementado su interés en la fabricación de películas antimicrobianas, debido a sus potenciales funcionalidades y a su contribución a satisfacer la demanda por parte de los consumidores de alimentos más seguros (Aguirre *et al.* 2013).

Los recubrimientos y películas comestibles, podrían tener potencial como portadores de agentes antimicrobianos en superficie (Chiu *et al.* 2010) ya que permiten soportar el aditivo donde debe actuar, compartimentalizar el aditivo evitando su interacción con los componentes del alimentos y con el oxígeno y ayudar a controlar su liberación. Los aceites esenciales son generalmente reconocidos como seguros (GRAS) por la FDA (Administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos). El carvacrol, el componente mayoritario de los aceites esenciales de orégano y tomillo (*Origanum and Thymus sp.*, 50 y 86% respectivamente) es un compuesto fenólico que ha sido usado por varias generaciones como preservador de alimentos (Guarda *et al.* 2011). Diferentes estudios reportan su actividad usando métodos en fase vapor, métodos de difusión y métodos de contacto. Además se han realizado estudios sobre diferentes productos alimenticios, tales como pescado, jugos de fruta, carne y, a su vez, contra distintos microorganismos tales como *E.coli*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella* entre otros. Se ha propuesto su uso para mejorar las propiedades funcionales y antimicrobianas de películas biopoliméricas con el fin de extender la vida útil de distintos productos alimenticios. Su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varios microorganismos está bien documentado y ampliamente descrito. La eficiencia de estos sistemas estará determinada, en parte, por la liberación y difusión controladas, y por el mantenimiento de concentraciones suficientes para otorgar un efecto antimicrobiano sobre

el alimento (Kurek *et al.* 2013). El ácido sórbico y el sorbato de potasio (KS), comúnmente llamados en conjunto como sorbatos, son componentes GRAS, los cuales son ampliamente usados como agentes antimicrobianos en alimentos. Su acción inhibitoria está fuertemente influenciada por el tipo de alimento, las condiciones de procesamiento y almacenamiento y el nivel de preservador usado. Los sorbatos son estables en forma seca, pero en soluciones acuosas sufren una degradación oxidativa que depende del pH, la actividad de agua (a_w), la presencia de otros aditivos y las condiciones de almacenamiento y procesamiento (Campos *et al.* 2000). En este sentido, la incorporación del KS a las películas comestibles, constituye una manera de localizarlo en las zonas críticas de acción y, al mismo de tiempo, de protegerlo de las interacciones negativas con otros componentes del alimento (Campos *et al.* 2011).

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) el desarrollo de películas comestibles portadoras de agentes antimicrobianos sorbato de potasio y carvacrol, a partir de almidón acetilado de mandioca e hidroxipropil metilcelulosa; ii) la caracterización de dichas películas en cuanto a los parámetros de tracción, color, permeabilidad al vapor de agua y solubilidad en agua y iii) la evaluación de la actividad antimicrobiana de las películas frente a los microorganismos *Pseudomonas fluorescens* y *Zygosaccharomyces bailii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la fabricación de las películas comestibles se utilizaron como biopolímeros:

- Almidón de mandioca acetilado (AMA, GS: $0,2 \pm 0,01$): sintetizado a partir de almidón de mandioca nativo (Bernesa S.A., Argentina) y anhídrido acético (Sintorgan, Argentina), utilizando iodo (Anedra, Argentina) como catalizador y aplicando radiaciones de microondas (Shogren y Biswas 2006).
- Hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, Ethocel®, Dow Chemical, USA).

Todas las soluciones fueron elaboradas con agua destilada. Como agente plastificante se utilizó glicerol (Anedra, Argentina) y como agentes antimicrobianos se emplearon sorbato de potasio (Sigma Aldrich, USA) y carvacrol (Sigma Aldrich, USA) de calidad analítica.

De acuerdo a resultados previos (Espinell, 2014; Basch *et al.* 2013), las películas conteniendo KS mostraron buen desempeño como barrera antimicrobiana. En este sentido, y a fin de incrementar / mejorar, la acción inhibitoria de las películas, se incorporó un agente antimicrobiano adicional, el carvacrol.

La **Tabla 1** muestra la composición de los distintos sistemas estudiados. Los niveles de los antimicrobianos fueron elegidos a partir de ensayos previos (Alzate *et al.* 2012).

Tabla 1. Componentes de las películas comestibles (g/100 g de sistema)

Sistema	Almidón Acetilado (g)	HPMC (g)	Glicerol (g)	KS (g)	Carvacrol (g)	Agua (g)
Control	2,67	0,67	1,67	0,3	0,5	94,19
KS - Carvacrol	2,67	0,67	1,67	0,3	0,5	94,19

Elaboración de las películas comestibles

Para la obtención de las películas comestibles, se aplicó la técnica de casteo. Se prepararon dos soluciones por separado: la primera, consistió en una mezcla de almidón de mandioca, glicerol, KS y agua, la cual se mezcló en un agitador magnético provisto con platina calefactora. Al mismo tiempo se preparó la segunda solución que contenía HPMC y agua; y se llevó a una temperatura final de 82°C para lograr la gelación de la HPMC. Posteriormente, la suspensión de almidón se adicionó a la de HPMC a fin de integrar ambos biopolímeros. Debido a la acción anterior, la temperatura de la mezcla descendió a 50-60°C por lo que se continuó con el calentamiento nuevamente hasta 82°C a fin de lograr la gelatinización del almidón. Posteriormente, se procedió a adicionar el carvacrol bajo campana, e inmediatamente se homogeneizó con ayuda de un equipo Ultra Turrax (IKA, Alemania) a una velocidad de 21500 rpm durante 2 minutos.

Luego, se eliminaron las burbujas de aire en la solución final obtenida, mediante aplicación de vacío durante unos minutos. A continuación, se vertieron 20 gramos de la solución formada en películas sobre placas de Petri de plástico. El proceso de secado se llevó a cabo en una cámara de convección forzada de aire a 35°C por 24 horas. Una vez constituidas, las películas fueron separadas de la placa de Petri y se estabilizaron a 25°C durante 15 días, en atmósfera de HR 57,6% generada dentro de un desecador conteniendo una solución saturada de NaBr, como paso previo a la evaluación de sus propiedades físico-químicas y microbiológicas.

Ensayos Fisicoquímicos

Color

Para la determinación de color se utilizó el fotocolorímetro Minolta CM-508d (Japón). El equipo fue calibrado con placas blanca y negra patrones. Se midieron los parámetros CIELab (L*, a*, b*) y el índice de amarillo (YI) de acuerdo a la norma ASTM D1925. Adicionalmente, se evaluó el parámetro índice de blancura (WI) de acuerdo a la norma ASTM E313 y se calculó la opacidad (OP).

Ensayo Mecánico de Tracción

Para la realización de este ensayo, se usó una máquina universal de testeo (Instron Corp., modelo 3345, USA), provista de una celda de carga de 100N. La separación inicial entre las mordazas fue de 20 mm (d_0) y la velocidad de movimiento vertical de la mordaza superior fue de 50mm/min. La geometría de las muestras fue rectangular en todos los casos. A partir de los datos obtenidos de fuerza (F , N) y desplazamiento (d , mm), se obtuvieron las curvas de esfuerzo (σ , MPa) versus deformación (ϵ), siendo $\sigma = F/A$ (A : área transversal de la muestra, m^2) y $\epsilon = d/d_0$. A partir de dichas curvas, se determinaron los siguientes parámetros para todos los sistemas:

Esfuerzo a la ruptura (σ_r)

Deformación a la ruptura (ϵ_r)

Modulo elástico o módulo de Young (E)

Para este ensayo se usaron 10 especímenes de cada formulación de las películas.

Solubilidad

Siguiendo la metodología de Flores *et al.* (2007) para este ensayo, se realizó la determinación del porcentaje inicial de materia seca mediante el secado de discos de 2 cm de diámetro en una estufa de vacío a 100°C, durante 24

horas. En paralelo, otros discos de diámetro equivalente, fueron cortados, pesados y sumergidos en 50 ml de agua destilada, durante 24 horas a 25°C. Posteriormente a la inmersión, las películas fueron filtradas y secadas (100°C en estufa de vacío, durante 24 horas) a fin de determinar la masa seca no solubilizada. La solubilidad en agua se determinó por triplicado y se calculó su valor, expresado en porcentaje, utilizando la ecuación 1:

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{\text{Masa seca inicial} - \text{Masa seca final} \times 100}{\text{Masa seca inicial}} \right) \quad (1)$$

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua de las películas fue determinada gravimétricamente, a 25°C, adaptando el procedimiento recomendado por la norma ASTM E96-00 (2000). Para realizar el ensayo de permeabilidad se utilizaron celdas de acrílico y como desecante se usó cloruro de calcio (CaCl_2). Una vez preparadas, las celdas se ubicaron en una cámara de humedad y temperatura controlada (70% H.R., presión parcial de vapor de agua ≈ 2288 Pa). Luego de aproximadamente 12 horas se alcanzó el régimen estacionario de transmisión de vapor de agua y se comenzaron a registrar los incrementos de peso de las celdas durante tres días. Utilizando un ajuste por regresión lineal de los datos de variación de peso en función del tiempo, se calculó la velocidad de trasmisión de vapor de agua y posteriormente la PVA.

Ensayos Microbiológicos

Medios de cultivo y cepas

Los microorganismos utilizados en el estudio fueron: *Zygosaccharomyces bailii* (NRRL 7256) y *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 49838). Para el crecimiento de los inóculos de *Z. bailii* se empleó caldo Saboureaud (Biokar, Francia) y para el crecimiento de *P. fluorescens* se usó caldo Mueller-Hinton (Biokar, Francia).

Preparación de los inóculos

Para la preparación de los inóculos se tomó una alícuota de los microorganismos a partir de una estría, utilizando un ansa rulo en condiciones de esterilidad. Se traspasaron dos ansadas a un tubo con 10 ml del caldo correspondiente para cada microorganismo. Este pre-cultivo fue incubado 24 horas en cámara a 25°C (para la levadura) y 18-20 horas a 37°C (para la bacteria).

Ensayo de Barrera

Con el objeto de estudiar la efectividad de las películas como barreras antimicrobianas de un producto de alta actividad de agua (a_w), se formuló un medio a partir de los agares Saboureaud y Mueller Hinton con a_w reducido a $\approx 0,98$ mediante la adición de dextrosa y pH ajustado a 4,5 con una solución de ácido cítrico estéril 50 % (p/p), a

fin de simular productos de alta a_w y pH reducido. Discos de 1 cm de diámetro de las películas estudiadas, con y sin antimicrobianos, fueron cortados en forma aséptica, pesados y aplicados en la superficie de las placas conteniendo los agares con a_w y pH reducidos. A continuación, 10 μ l de un inóculo de *Z. bailii* y *P. fluorescens* fueron sembrados sobre los discos de película. Los sistemas fueron incubados a 25 °C por 3 días. A tiempos seleccionados (0, 2, 24, 48 y 72 horas), dos discos fueron retirados de las placas y suspendidos, cada uno, en 1 ml de agua peptona estéril contenida en un tubo de vidrio. Los microorganismos fueron re-suspendidos mediante agitación durante 2 minutos a 2500 rpm con un vórtex. A continuación, se prepararon diluciones seriadas en agua peptona para el recuento de células, siendo expresado el mismo como unidades formadoras de colonias por gramo de película (UFC/g). La bacteria fue enumerada llevando a cabo el sembrado en profundidad en agar Mueller-Hinton, seguido de incubación a 30°C durante 72 horas. La enumeración de la población de la levadura fue realizada por la técnica de plaqueo en superficie de agar Saboureaud e incubando a 25°C durante 5 días, antes de recuento. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Análisis Estadístico

Las diferencias significativas entre los distintos sistemas se establecieron mediante análisis de varianza (ANOVA)

de un factor con un nivel de significación de 0,05 y aplicando un test a posteriori (LSD). Los resultados son informados en base a su promedio y desvío estándar. El software Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

Resultados y Discusión

Parámetros de color de las películas elaboradas a partir de almidón acetilado y HPMC.

Tabla 2. Resultados de los parámetros de color L* (Luminosidad), a* (Índice de rojo (+) o verde (-)), b* (Índice de amarillo (+) o azul (-)), YI (Índice de Amarillo), WI (Índice de Blancura) y Opacidad de películas de almidón acetilado y HPMC.

SISTEMA	L*	a*	b*	YI	WI	Opacida
	91,6 ±					
Control		-1,34 ± 0,03 ^a	2,9 ± 0,1 ^e	4,7 ± 0,1 ^g	65,9 ± 0,5 ⁱ	0,39 ± 0,03 ^b
KS - Carvacrol	90,5 ± 0,5 ^d	-1,29 ± 0,04 ^a	3,2 ± 0,1 ^f	5,4 ± 0,3 ^h	62,1 ± 1,5 ^j	0,34 ± 0,04 ^b

Letras iguales en una misma columna indican ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0,05$).

En la **Tabla 2** se puede observar que los parámetros b* y YI fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) para el sistema conteniendo antimicrobianos en comparación con el sistema control. A su vez, los valores de L* y de WI disminuyeron en presencia de KS y carvacrol en la formulación, mientras que los parámetros a* y la opacidad fueron similares para ambos sistemas. Estos resultados denotan que las características propias de color del carvacrol y la presencia de KS, produjeron el incremento del color de las películas, sin alterar la opacidad de las mismas. Flores *et al.* (2007) observaron que el agregado de KS a películas de almidón de mandioca producía una reducción significativa en los valores de L* e incrementos en b* y YI. En cuanto al carvacrol, (Du *et al.* 2008) informaron que los parámetros L* y WI decrecían con el aumento de la concentración de carvacrol en películas constituidas en base a polisacáridos de manzana, mientras que b* y YI aumentaban.

Ensayos de Tracción

En la **Figura 1** se muestran las curvas obtenidas para el ensayo de tracción de las películas estudiadas. De acuerdo a los resultados, se determinó que el sistema adicionado con los antimicrobianos KS y carvacrol, desarrolló una mayor deformación a la ruptura ($46 \pm 4\%$), disminuyó el E (26 ± 6 MPa) y no modificó significativamente el σ_r respecto del sistema control ($2,1 \pm 0,2$ MPa en promedio). En la película control el valor

de E fue significativamente más alto (42 ± 2 MPa) y la σ_r fue menor ($36 \pm 4\%$). En estudios realizados por (Arrieta *et al.* 2013) sobre películas comestibles de caseinato de calcio y caseinato de sodio adicionadas con carvacrol, se observó que el parámetro σ_r aumentó significativamente con la adición del agente antimicrobiano. Los resultados mostraron que el carvacrol afectó las interacciones entre las cadenas macromoleculares de la matriz polimérica, provocando un efecto plastificante.

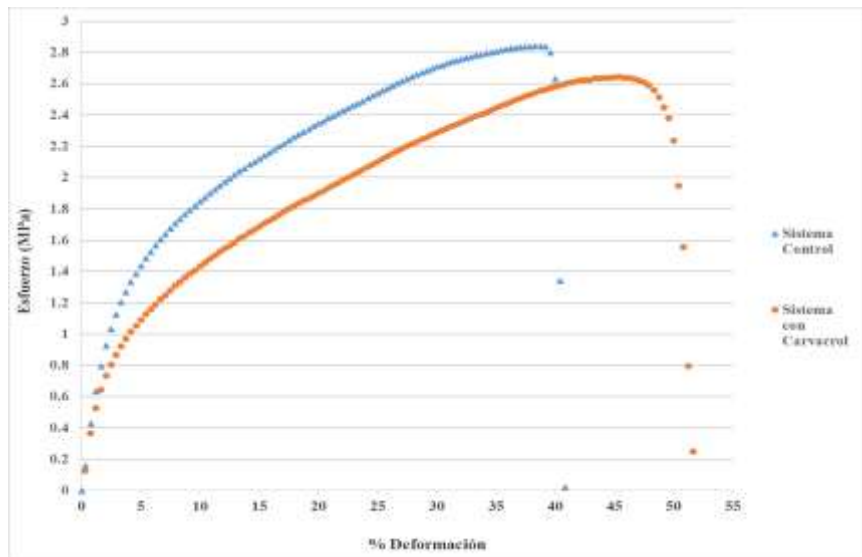


Figura 1. Curvas típicas de tracción de películas elaboradas a partir de almidón acetilado de mandioca y HPMC en ausencia (control) o presencia de antimicrobianos (KS+carvacrol).

Solubilidad (S)

Los resultados del ensayo de solubilidad en agua, para ambos sistemas de películas elaborados, indicaron que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) para este parámetro entre los sistemas control ($31 \pm 2\%$) y las películas conteniendo antimicrobianos ($35 \pm 3\%$). En investigaciones realizadas por (Rubilar *et al.* 2013) en películas comestibles de quitosano y adicionadas con carvacrol se concluyó que la solubilidad de las mismas no se vio afectada por la incorporación de carvacrol. De acuerdo a estos resultados, el carvacrol en combinación con el KS, pueden ser utilizados sin riesgos de alterar la solubilidad en agua de estos materiales.

Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua es la propiedad más importante de las películas elaboradas con biopolímeros debido a su influencia directa sobre las reacciones deteriorativas en comida envasada. Cabe destacar que la PVA de las películas se incrementa con el incremento de la humedad relativa (Kurek *et al.* 2011).

En el presente estudio se observó que las películas adicionadas con agentes antimicrobianos, KS+carvacrol, mostraron un valor menor de PVA ($7,8 \times 10^{-10}$ g/Pa.m.s) respecto de las películas control ($2,2 \times 10^{-9}$ g/Pa.m.s). En estudios realizados por (Rubilar *et al.* 2013) se comprobó que la adición de carvacrol a películas comestibles de quitosano causó una reducción en los valores de PVA.

Este resultado puede ser explicado por la naturaleza hidrofóbica del carvacrol, el cual afecta el balance hidrofílico/hidrofóbico de la película.

Ensayo de Barrera

En las **Tablas 3** y **4**, se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de barrera de películas elaboradas a partir de almidón de mandioca acetilado y HPMC, y adicionadas con KS y carvacrol. La **Tabla 3** informa los valores obtenidos para el ensayo llevado a cabo frente a la bacteria *Pseudomonas fluorescens*. Se observa que las películas control permitieron la supervivencia de la bacteria, mientras que el sistema conteniendo antimicrobianos logró inhibir el crecimiento de este microorganismo a partir de las 24 horas (ausencia de recuento). El mecanismo antimicrobiano del carvacrol está basado en la perturbación de la membrana citoplasmática de la bacteria, con disrupción de la fuerza motriz de protones, el flujo de electrones, el transporte activo y la coagulación de los contenidos celulares. Además, el carvacrol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, resultando en la inhibición del crecimiento microbiano (Arrieta *et al.* 2014).

Tabla 3. Resultados obtenidos para el ensayo de barrera de películas comestibles antimicrobianas frente a la bacteria *P. fluorescens*.

<i>P. fluorescens</i>	Log (UFC/g)	
	Control	KS+Carvacrol
0 h	5,5±0,2 ^{a, c}	5,2±0,2 ^{b, c}
2 h	5,4±0,3 ^{a, d}	4,7±0,5 ^{b, d}
24 h	5,3±0,2 ^a	< 2*
48 h	5,3±0,1 ^a	< 2*

Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre sistemas a un mismo tiempo o entre tiempos para un mismo sistema ($p > 0,05$).

*: Ausencia de recuentos

En la **Tabla 4** se pueden apreciar los resultados obtenidos para el ensayo de barrera de las películas antimicrobianas frente a la levadura *Zygosaccharomyces bailii*. Se puede notar que las películas control permitieron el crecimiento de la levadura, aumentando el

recuento en 3 ciclos Log luego de 48 hs de almacenamiento. Por otro lado, las películas con KS + carvacrol fueron efectivas contra *Z.bailii* ya que

redujeron el crecimiento desde el inicio del ensayo y por lo menos hasta 4 ciclos Log a las 48 horas (ausencia de recuentos). La actividad fungicida del carvacrol se explica debido a la inhibición de la síntesis de ergosterol y la disrupción de la integridad de la membrana. Respecto a la acción sobre la membrana, se ha postulado que lo que ocurre es la disrupción de la estructura de la membrana y la formación de canales que incrementan la permeabilidad de la misma, lo cual determina el escape de iones potasio y otros contenidos citoplasmáticos (Chavan y Tupe 2014).

Tabla 4. Resultados obtenidos para el ensayo de barrera de películas comestibles antimicrobianas frente a la levadura *Z. bailii*.

<i>Z. bailii</i>	Log (UFC/g)	
	Control	KS+Carvacrol
0 h	5,5±0,1 ^a	6,5±0,7 ^f
2 h	5,4±0,2 ^a	3,7±0,5 ^b

24 h	7,3±0,2 ^c	3,8±0,5 ^b
48 h	8,3±0,3 ^d	< 2 [*]

Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre tiempos para un mismo sistema (p>0,05).

***: Ausencia de recuentos**

La relación de la actividad antimicrobiana con la concentración de carvacrol contenida en películas con base en polisacáridos de manzana, fue evaluada por (Du *et al.* 2008). Estos autores detectaron, a partir del ensayo de zona de inhibición, que en películas sin carvacrol, *E. coli* O157: H7 (bacteria Gram negativa) creció normalmente en agar a 35°C. Por el contrario, no observaron crecimiento en el caso de películas que contenían 0,75 y 1,00 % de carvacrol. Por otro lado, de acuerdo a Campos *et al.* (2011), el KS incorporado a películas elaboradas con almidón de mandioca y glicerol, presenta un efecto fungistático. En cuanto al crecimiento de *Z. bailii* testeado a través de un ensayo de barrera a la contaminación externa por dicha levadura.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se fabricaron películas comestibles a partir de almidón de mandioca acetilado, HPMC, glicerol y adicionadas con los antimicrobianos sorbato de potasio (KS) y carvacrol. A partir de los resultados se pudo concluir que las películas antimicrobianas mostraron buenas propiedades mecánicas siendo más deformables que las películas control (sin antimicrobianos). Por otro lado, la incorporación del carvacrol y KS a la formulación de las películas, incrementó el color de las mismas pero no afectó la opacidad ni la solubilidad en agua, disminuyendo el valor de la PVA.

Por último, en relación a la capacidad antimicrobiana de las películas conteniendo KS y carvacrol, se comprobó que las mismas actuaron como barreras efectivas ya que inhibieron el crecimiento de la levadura *Zygosaccharomyces bailii* y de la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

Las películas antimicrobianas desarrolladas demostraron ser efectivas contra la contaminación externa de *Z. bailii* y *P. fluorescens*, al mismo tiempo que aumentaron las propiedades de barrera de estos materiales, por lo que presentan potencial aplicación en el campo de la preservación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre A, Borneo R, Leon AE. 2013. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food bioscience*, 1: 2 – 9.

Alzate, P, Flores S, Gerschenson, L. 2013. Determinación de la actividad antimicrobiana de películas comestibles portadoras de sorbato de potasio y carvacrol. *Proceeding aceptado en el libro de memorias del XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, Rosario, Argentina.

Arrieta M, Peltzer M, Garrigós M, Jimenez A. 2013. Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *Journal of Food Engineering*, 114: 486–494.

Basch C, Jagus R, Flores S. 2013. Physical and antimicrobial properties of tapioca starch-HPMC edible films incorporated with nisin and/or potassium sorbate. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 2419–2428.

Campos C., Gerschenson L. & Flores S. 2011. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 849–875.

Campos C, Alzamora S, Gerschenson L. 2000. Short communication. Inhibitory action of potassium sorbate

degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. *International Journal of Food Microbiology*, 54: 117–122.

Chiu PE, Lai LS. 2010. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsaio leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *International Journal of Food Microbiology*, 139: 23–30.

Chana-Thaworn J, Chantachum S, Wittaya T. 2011. Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. *LWT - Food Science and Technology*, 44: 284-292.

Chavan P, Tupe S. 2014. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46: 115 – 120.

Du, W-X., Olsen, C.W., Avena-Bustillos, R., Mchugh, T., Levin, C., Friedman M. 2008. Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 3082–3088.

Espinel R, Flores S, Gerschenson L. 2014. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and

glycerol contents on physical properties. *Materials Science and Engineering C*, 36: 108–117.

Flores S, Famá L, Rojas AM, Goyanes S, Gerschenson L. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40: 257–265.

Kurek A, Rubilar J, Miltz J, Galotto MJ. 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*, 146: 144–150.

Kurek M, Moundanga S, Favier C, Galic K, Debeaufort F. 2013. Antimicrobial efficiency of carvacrol vapour related to mass partition coefficient when incorporated in chitosan based films aimed for active packaging. *Food Control*, 32: 168-175.

Rubilar J, Cruz R, Silva H, Vicente A, Khmelinskii I, Vieira M. 2013. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115: 466–474

Shogren R y Biswas A. 2006. Preparation of water-soluble and water-swelling starch acetates using microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, 64: 16–21.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiamiento de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 2011-2014, 20020100100726, CONICET (PIP 11220090100531) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2008-2131; PICT-2012-0183).

OBTENCIÓN DE MICRO Y NANOPARTÍCULAS A PARTIR DE ALMIDÓN DE MANDIOCA NATIVO Y MODIFICADO

**Alzate P.C.^{1,2}, Zalduendo MM.^{1,3}, Flores S.K.^{1,3},
Gerschenson L.^{1,3}**

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina.

3: Becario estímulo de la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

4: Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET, Argentina,

palzaticoc@gmail.com

Resumen: Los biopolímeros pueden utilizarse para crear sistemas micro-nanoestructurados a fin de soportar, proteger y liberar componentes funcionales. Los objetivos del trabajo fueron la síntesis y caracterización de almidón de mandioca acetilado (AA) y/o entrecruzado, y la obtención a partir de estos, de micro/nanopartículas mediante la técnica de diálisis. Para los almidones modificados se determinó: el grado de sustitución de acetilos (GS) y fosfatos (GSP), la capacidad de hinchamiento (CH) y la solubilidad en agua, el tamaño de partícula y la microestructura. Los resultados indicaron un GS de $0,23 \pm 0,01$ y el GSP varió entre 0,0002-0,015. Luego

de la diálisis la fracción de nanopartículas fue de $\approx 1\%$ p/p y 9% p/p para los almidones nativos (AN) y AA respectivamente, con tamaños entre 13 y 240 nm, y un potencial Z de -9 mV (AN) y de -16 mV (AA). La fracción microscópica presentó tamaños entre 7,9 y 43 μm (AN) y entre 17,5 a 88 μm (AA). Se pudo concluir que la acetilación incrementó la CH y la solubilidad, mientras que el mayor nivel de entrecruzamiento tuvo el efecto contrario. Las nanopartículas presentaron un tamaño menor a 240 nm y potencial Z negativo. La distribución de tamaños de micropartículas fue menor para el AN.

Palabras clave: *almidón de mandioca, acetilación, entrecruzamiento, diálisis, propiedades físicas.*

The biopolymers can be used to create micro-nanostructured systems to support, protect and release functional components. The objectives of this work were the synthesis and characterization of acetylated cassava starch (AA) and/or cross-linked starch, and to obtain micro/nanoparticles by the dialysis technique. For modified starches, the degree of substitution of acetyl groups (GS) and phosphates (GSP), the swelling capacity (CH) and water solubility were determined as well as the particle size and the microstructure. The results indicated that the GS was around 0.23 ± 0.01 and the GSP ranged from 0.0002 to 0.015. After dialysis, the nanoparticle

fraction was $\approx 1\%$ w/w and 9% w/w for the native starches (AN) and for AA respectively, with sizes between 13 and 240 nm and a zeta potential of -9 mV (AN) and -16 mV (AA). The microscopic fraction resulted in sizes between 7.9 and 43 μm (AN) and from 17.5 to 881 μm (AA). It could be concluded that acetylation increased the CH and the solubility, while the higher level of crosslinking had the opposite effect. The nanoparticles had a size lesser than 240 nm and negative Z potential. The microparticle size distribution was smaller for the AN.

Key words: *cassava starch, acetylation, cross-linked, dialysis, physical properties.*

INTRODUCCIÓN

Biopolímeros de grado alimenticio, como proteínas y polisacáridos, pueden utilizarse para crear una amplia gama de sistemas micro y nanoestructurados para soportar, proteger y liberar componentes alimenticios funcionales tales como aceites ricos en ω -3, ácido linoleico conjugado, vitaminas liposolubles, sabores, colores y nutracéuticos (Zalduendo *et al.* 2014, Matalanis *et al.* 2011). Estas estructuras presentan una elevada relación área/volumen, lo cual favorece la interacción con el alimento, condiciona la liberación, pudiendo además llevar a modificar la estructura y reología y, por lo tanto, las propiedades de los alimentos en los cuales son utilizadas. Entre los polisacáridos, los almidones presentan como ventaja su bajo costo, la ausencia de toxicidad, ser renovables, biodegradables y compatibles con muchos otros materiales (Rodrigues y Emeje, 2012). Recientemente, la utilización de almidón en nanotecnología, en forma de partículas sólidas o coloidales con tamaño desde 10 a 1000 nm, impulsó un significativo avance de la industria alimentaria en donde se ha reportado su aplicación en el desarrollo de nuevos materiales de empaquetamiento (Robinson y Morrison 2010), en la estabilización de emulsiones (Yusoff y Murray 2011), como aditivos para modificar la textura y el sabor. Asimismo, estas estructuras permitirían compartimentalizar sustancias activas disminuyendo o anulando su interacción con otros componentes del

alimento colaborando así en su efectividad. Dentro de las aplicaciones alimenticias, se deben realizar aún más investigaciones y avances en la eficacia de estas estructuras como agentes de administración de sustancias activas, como antimicrobianos o antioxidantes, los cuales pueden ser disueltos, atrapados, absorbidos o encapsulados en la matriz de las partículas. Más aún, las nanotecnologías y los sistemas de nano-liberación a ser implementados en el área de alimentos, no son sólo un desafío tecnológico y científico sino que, además, presentan una necesidad evidente de regulación y evaluación de su riesgo potencial y de su destino biológico, como ha sido recientemente marcado por (Cushen *et al.* 2012).

La modificación química, física, enzimática o genética del almidón se lleva a cabo para mejorar los atributos positivos y eliminar las deficiencias de los almidones nativos. Por lo tanto, la modificación del almidón es una industria en constante evolución con numerosas posibilidades para generar nuevos almidones, que posean nuevas propiedades funcionales y valor agregado y, a su vez, permitan cubrir las demandas de la industria (Kaur *et al.* 2012; Chau *et al.* 2007).

Dependiendo del método de preparación, las nanopartículas pueden ser obtenidas con diferentes propiedades y características de liberación de los agentes soportados (Rao y Geckeler 2011).

Debido a sus estructuras peculiares, la mayoría de los biopolímeros nanoestructurados pueden ser producidos por procedimientos del tipo "top-down" (de arriba hacia abajo) a partir del propio polímero (macrométrico). Los métodos para preparar micro y nanopartículas en base a polisacáridos se basan en una variedad de enfoques incluyendo: interacciones con contraiones, entrecruzamiento químico, evaporación del disolvente, recubrimiento sobre micropartículas preformadas y secado spray. En el presente trabajo se aplicó un método basado en el proceso de ósmosis, simple y versátil, para el control tanto de la dimensión y morfología de materiales poliméricos en la escala sub-micrométrica. Esta técnica involucra la solubilización del biopolímero (almidón) en un solvente apropiado y la reprecipitación del mismo mediante el desplazamiento del solvente por un no-solvente miscible con el primero, que provoque la pérdida de solubilidad del biopolímero mediante un cambio de polaridad del medio, generando una progresiva agregación coloidal de las partículas (Nagavarma *et al.* 2013). Esta metodología está basada en el uso de una barrera física, específicamente una membrana de diálisis, que contiene la solución del biopolímero y que, a su vez, permite el transporte pasivo de disolventes a fin de reducir la velocidad de la mezcla de una solución de polímero con un no-solvente. La mezcla gradual del solvente y del no-solvente dentro de la bolsa hace que la mezcla sea cada vez menos capaz de disolver el biopolímero. El consiguiente aumento de la

tensión interfacial impulsa a las moléculas del polímero a agregarse en partículas esferoidales; minimizando la energía del sistema y, por lo tanto, produciendo la precipitación. Se ha postulado que la morfología de las partículas queda determinada por factores cinéticos y termodinámicos, obteniéndose dimensiones que oscilan entre micrómetros y nanómetros, dependiendo del arreglo experimental. Dentro de los factores que modulan la morfología del producto se pueden mencionar: la velocidad de la mezcla de solvente/no-solvente, el par seleccionado de solvente/no-solvente, el cut-off de la membrana de diálisis, la temperatura y la concentración de polímero (Chronopoulou *et al.* 2009).

El objetivo del presente trabajo fue la síntesis y caracterización física de almidón de mandioca acetilado y/o entrecruzado, y el empleo de los mismos para la obtención de micro/nanopartículas, utilizando la técnica de diálisis y evaluar su tamaño y carga.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la obtención de los distintos almidones modificados, se empleó almidón nativo de mandioca (Bernesa S.A, Argentina), anhídrido acético p.a. (Sintorgan, Argentina), iodo p.a. (Anedra, Argentina), trimetafosfato de sodio p.a. (STMP, Sigma, USA).

Obtención y caracterización de almidones modificados

Proceso de acetilación aplicando radiaciones de microondas

Siguiendo los ensayos realizados por Shogren y Biswas (2006), se tomó una cantidad de almidón de mandioca nativo en un reactor de teflón y se le adicionó anhídrido acético. Posteriormente se agregó yodo y se mezcló, hasta lograr una dispersión completa en la mezcla. Las condiciones de trabajo en el microondas fueron: potencia máxima aplicada de 450W, tiempo de tratamiento de 3,5 min para alcanzar la máxima temperatura de 90°C. Una vez que la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente, se adicionó Na₂S₂O₃ a fin de reducir el I₂ a I⁻. Para el proceso de lavado, el conjunto anterior se transfirió a un vaso conteniendo etanol y se dejó en agitación por 30 minutos. Posteriormente se filtró mediante embudo Buchner y se continuó el lavado transfiriendo el producto sólido a un vaso conteniendo agua destilada agitando durante 10 minutos. El lavado con agua se repitió 3 veces, filtrando siempre al final del tiempo de agitación. Por último, se realizó un lavado con etanol, se filtró y la masa obtenida se llevó a una estufa de vacío a 60°C durante toda la noche. El producto seco fue molido y tamizado.

Determinación del Grado de Sustitución del almidón acetilado.

Para la determinación del grado de sustitución (GS), se usó una técnica volumétrica (Bello-Pérez *et al.* 2010). Se pesó 1 gramo de muestra del almidón acetilado, se colocó en frascos Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionaron 50 mL de una solución acuosa de etanol al 75% v/v. La mezcla anterior se agitó durante 30 minutos en agitador provisto de platina calefactora manteniendo una temperatura de 50°C. Una vez enfriada a temperatura ambiente, se adicionaron 20 mL de una solución de NaOH 0,5N. Los frascos Erlenmeyer bien cubiertos, se dejaron agitando durante 24 horas a temperatura ambiente a fin de proceder a la saponificación (desesterificación en medio básico) de los grupos acetilo.

El exceso de álcali se tituló con HCl 0,5N usando fenolftaleína como indicador. También se preparó una muestra blanco, a partir de almidón nativo. El % de acetilos fue calculado de acuerdo a la ecuación 1:

$$\% \text{ Acetilo} = \left[\frac{(\text{ml blanco}) - (\text{ml muestra}) \times \text{Normalidad HCl} \times 0.043 \times 100}{(\text{peso de la muestra en gramos})} \right]$$

(1)

Siendo (mL blanco) el volumen de HCl 0,5N consumido para la muestra de almidón nativo en la titulación y (mL

muestra) el volumen de HCl 0,5N consumido por cada muestra de almidón acetilado en la titulación.

El grado de sustitución de grupos acetilos (GS) se determinó según la ecuación 2:

$$GS = \frac{(162 \times \% \text{ Acetilo})}{[4300 - (42 \times \% \text{ Acetilo})]} \quad (2)$$

Proceso de entrecruzamiento

Para el entrecruzamiento del almidón nativo (AN) o almidón acetilado (AA) se suspendieron 5 g de almidón en 10ml de NaOH 10^{-4} N y se adicionó STMP (entrecruzante) a fin de obtener concentraciones de 0,5% y 1% p/p. Se ajustó el pH de las suspensiones obtenidas a 10,5 mediante el agregado de NaOH (2N) y se sometió a calentamiento en baño de agua a 50°C durante 3 h. Luego, se llevó el pH a neutralidad agregando HCl 0,2N. A continuación se procedió al lavado con agua destilada a fin de eliminar el exceso de STMP. Para ello se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en agua destilada. El proceso se repitió dos veces más para obtener el producto final (Atichokudomchai y Varavinit

2002). El secado de las muestras se realizó en estufa de vacío a 60 °C durante 18-20 h.

Determinación del grado de entrecruzamiento

Los almidones obtenidos a partir de la reacción de entrecruzamiento, fueron caracterizados mediante la determinación del contenido de fósforo total: muestras de almidón nativo y entrecruzado se digirieron a reflujo en una mezcla de ácido nítrico / ácido perclórico, hasta desintegración total de la materia orgánica. Se efectuaron las diluciones apropiadas. La determinación de fósforo se realizó por espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (Baird 2070, USA).

De acuerdo a Atichokudomchai y Varavinit (2002), el empleo de la siguiente ecuación permite estimar el grado de sustitución de grupos fosfatos (GSP) del almidón modificado:

$$GSP = \frac{162}{3100} \quad (3)$$

donde P representa el contenido de fósforo (%) del almidón entrecruzado.

Solubilidad y capacidad de hinchamiento

Para la determinación de la solubilidad de las distintas muestras obtenidas, se adicionaron 0,1g exactos de muestra a 9 g de agua destilada en un tubo Falcon de peso conocido. Se colocaron las muestras en un baño a 85°C durante 30 min con agitación cada 5 min. Luego se centrifugó 10 min a 5000 rpm y 25°C. El sobrenadante (5 mL) se traspasó a una placa de Petri de peso conocido y se determinó el peso seco de la muestra por secado en estufa a 100°C. La solubilidad (S, %) se informa como la relación porcentual entre el peso seco obtenido a partir del sobrenadante y la masa inicial de almidón utilizada.

A su vez, se determinó el peso del almidón hinchado (pellet) y, a partir de la diferencia de peso porcentual respecto al peso inicial, se obtuvo la capacidad de hinchamiento (CH, %).

Microestructura

El análisis microestructural de los sistemas fue realizado por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras, previamente deshidratadas en desecador con CaCl₂, fueron montadas en el portamuestra del equipo

con la ayuda de cinta adhesiva doble faz y metalizadas por bombardeo iónico con una capa de oro (Cressington Scientific Instruments 108 Sputter, UKA). Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Zeiss Supra 40, Alemania) operado a un voltaje de aceleración de 20 o 3 kV.

Obtención de micro/nanopartículas de almidón a través de la técnica de diálisis (Simi y Abraham, 2007)

Se disolvieron 2g de almidón en 60mL de DMSO a temperatura ambiente, con agitación durante 24 h. Esta solución se introdujo en una bolsa de diálisis (Spectra/Por, USA, Cut-off 12000D) y se dializó por 48 h en un vaso de 1L conteniendo H₂O ultrapura, la cual fue renovada periódicamente, manteniendo agitación constante. Finalizado el tiempo de diálisis, se abrió la bolsa y se separó el sobrenadante del precipitado mediante centrifugación a 10000 rpm durante 20 min.

Distribución del tamaño de partícula

A partir del precipitado obtenido luego de la diálisis, se realizó la caracterización del tamaño de partícula.

La fracción micrométrica de las partículas (diámetros entre los 0,1 μ m a 1000 μ m) fue caracterizada en un equipo de dispersión estática de luz (SLS) (Mastersizer

2000, Malvern Instruments, Inglaterra) con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provista con un láser He- Ne (λ : 633 nm). Las muestras se suspendieron en agua ultrapura hasta conseguir un nivel de obturación del 13% en el equipo.

La fracción nanométrica de las partículas (diámetro hidrodinámico en el rango de 0,6 nm a 6 μ m) fue caracterizada en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS), (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, Inglaterra) provisto con un láser He- Ne (λ : 633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo de dispersión fijo de 173°. Las diluciones apropiadas de las muestras (1% v/v) se colocaron en cubetas descartables de poliestireno de 1 cm de arista. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Potencial Z

La carga neta superficial de las partículas en solución acuosa a 25°C, se realizaron mediante la medición del potencial zeta en un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Inglaterra) por DLS. Las soluciones de las muestras fueron inyectadas en una cubeta para medición de movilidad electroforética.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias significativas entre los distintos sistemas se establecieron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de significación de 0,05 y aplicando un test a posteriori (LSD). Los resultados son informados en base a su promedio y desvío estándar. El software Statgraphics Plus para Windows, versión 3.0, fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de almidones modificados

Los resultados indicaron que el GSA de los almidones acetilados (entrecruzados o no) fue en promedio de 0,23 \pm 0,01. El GSP varió desde 0,0002 hasta 0,015 dependiendo del tipo de almidón y de la cantidad de STMP empleada (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resultados obtenidos para GSP (Grado de Sustitución de Fósforo) y los ensayos de capacidad de hinchamiento (CH, %) y solubilidad (S, %) de almidones modificados.

Almidón	GSP	CH (%)	S (%)
Nativo	0,0002	324 ± 36 ^f	5,7 ± 0,3 ^b
Nativo – entrecr. 0,5% STMP	0,0045	436 ± 20 ^g	1,1 ± 0,2 ^c
Nativo – entrecr. 1% STMP	0,0109	272 ± 6 ^h	0,6 ± 0,2 ^d
Acetilado	0,0029	630 ± 58 ⁱ	3,7 ± 0,3 ^a
Acetilado – entrecr. 0,5% STMP	0,0085	834 ± 57 ^j	5,5 ± 0,2 ^b
Acetilado – entrecr. 1% STMP	0,0151	516 ± 31 ^k	4,3 ± 0,3 ^a

Los valores de capacidad de hinchamiento (CH) y solubilidad (S) se expresan como el promedio ± desvío estándar

Valores con igual letra en la misma columna, no difieren significativamente ($p > 0.05$).

La CH fue de (324±36%) para el AN mientras que el AA duplicó dicho valor. Puede apreciarse en la **Tabla 1** que los almidones acetilados presentaron mayor CH en comparación con los AN para ambos niveles de entrecruzamiento con STMP. Posiblemente el tratamiento a alta temperatura y en medio anhídrido acético produjo erosión y daño estructural de los gránulos, favoreciendo su interacción con el agua. De acuerdo a (Mirmoghtadaie *et al.* 2009), la introducción de grupos acetilo al gránulo incrementó el grado de hinchamiento del almidón de avena acetilado (GS 0,05) en comparación con el nativo. Dichos grupos podrían facilitar el acceso de agua a las zonas amorfas, debido a una desorganización estructural intragranular causada por efectos estéricos y la interrupción de enlaces de hidrógeno en los gránulos de almidón. Esta misma erosión superficial, favorecería la interacción con el STMP, permitiendo un mayor entrecruzamiento en los almidones acetilados respecto de los nativos (**Tabla 1**).

Por otro lado, los niveles de entrecruzamiento (0,5 o 1% STMP) tuvieron un efecto diferenciado sobre el CH. Para un nivel de STMP de 0,5% se observó un aumento de la CH en ambos almidones tratados (AN y AA). Sin embargo a nivel de 1% de STMP, la CH disminuyó en los AN y AA.

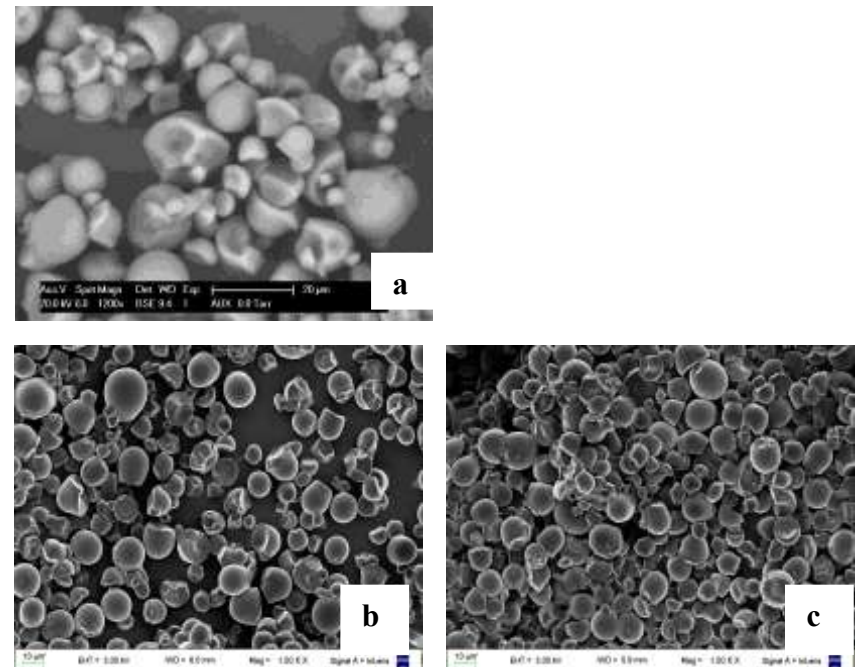
En un estudio realizado por (Wongsagonsup *et al.* 2014) se reportó que el poder de hinchamiento y solubilidad del almidón de mandioca entrecruzado aumentaban significativamente cuando eran tratados con una mezcla

de STMP/STPP (tripolifosfato de sodio) hasta concentraciones del 1,0%, y resultaron más altos que los del almidón nativo. A partir de entonces, con concentraciones de STMP/STPP entre 1,5% a 6,0%, ambos valores disminuían (por debajo del nativo). Los autores explicaron que los almidones ligeramente entrecruzados retuvieron la integridad de gránulo y pudieron absorber más agua, obteniendo mayor poder de hinchamiento. Con el aumento del nivel de entrecruzamiento, la estructura granular fue mucho más rígida limitando el hinchamiento y la solubilidad. A niveles bajos de reticulación, la repulsión entre las moléculas de almidón adyacentes causadas por los grupos fosfato cargados negativamente colaboraría en el hinchamiento de los gránulos hidratados. Por el contrario, la presencia de un número mayor de enlaces diesterfosfato disminuyeron el poder de hinchamiento. En dicho trabajo, se observó una tendencia similar en cuanto a la solubilidad de los gránulos entrecruzados.

En el caso de la S observada en este trabajo, la misma fue, en general, más baja en el caso de los AN, tomando valores entre 5,7% y 0,6% a medida que aumentaba el GSP. Sin embargo, en el caso de los AA la S promedió 4,5%, siendo en este caso la influencia del GSP mucho menor.

En la **Figura 1** se muestran las imágenes SEM de los almidones estudiados. El análisis de la microestructura reveló una marcada erosión de la superficie y ruptura de los gránulos en el caso del almidón acetilado y entrecruzado, como consecuencia de los tratamientos aplicados (**Figura 1: e y f**).

Dicha alteración del gránulo, aumentaría la CH observada en estos almidones. Por otro lado, se observó que los gránulos de AA presentaron tendencia a la agregación durante el tratamiento de secado.



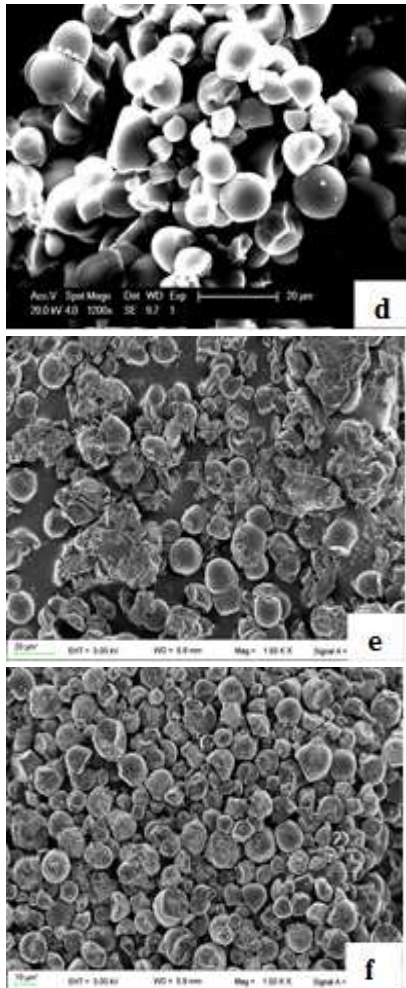


Figura 1. Imágenes SEM de almidones: a) nativo, b) nativo entrecruzado con 0,5% STMP, c) nativo entrecruzado con 1,0% STMP, d) acetilado, e) acetilado entrecruzado con 0,5% STMP, f) acetilado entrecruzado con 1,0% STMP (magnificación 1200X, 1500X).

Obtención de micro/nanopartículas de almidón a través de la técnica de diálisis

A partir de la técnica de diálisis se obtuvo un precipitado de almidón el cual presentó una fracción de nanopartículas de aproximadamente 1% p/p para los AN y de 9% p/p para los AA. A partir de la solución coloidal obtenida, se prepararon diluciones apropiadas y se filtraron (poro 45 µm) a fin de ser analizadas por DLS. El ensayo de determinación de la distribución de tamaños de partícula puede observarse en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Análisis de distribución de partículas y potencial Z (DLS) para partículas de almidón obtenidas por la técnica de diálisis.

Almidón	Tamaño (d, nm) ¹		Pdl ²	Potencial Z (mV)
	Pico 1	Pico 2		
Nativo	19 ± 1 (87) ^e	240 ± 5 (13) ^b	0,31	-9 ± 1 ^c
Nativo – entrecr. 0,5% STMP	111 ± 5 (100) ^f	No observado	0,35	ND
Nativo – entrecr. 1% STMP	22 ± 4 (80) ^a	187 ± 3 (20) ^h	0,29	-6,4 ± 0,5 ⁿ
Acetilado	13 ± 1 (100) ^g	No observado	0,4	-19 ± 3 ^d
Acetilado – entrecr. 0,5% STMP	21 ± 6 (92) ^a	238 ± 4 (8) ^b	0,46	-11 ± 2 ^c
Acetilado – entrecr. 1% STMP	21 ± 2 (100) ^a	No observado	0,4	-17 ± 2 ^d

1: diámetro hidrodinámico de la partícula.

2: Pdl: índice de polidispersión, indicador de la heterogeneidad de tamaños de la muestra. Recomendado: menor a 0,7.

Los valores entre paréntesis representan el % en volumen del correspondiente pico. Se informan los promedios de, al menos, dos replicados y su desvío estándar.

Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0.05$).

Puede observarse que los tamaños de las partículas de almidón estudiadas oscilaron entre 13 y 240 nm, mostrando los sistemas acetilados una tendencia a la mayor proporción de partículas de menor tamaño (con o sin entrecruzamiento). El potencial Z resultó negativo: potencial Z promedio de -8 mV (AN) y de -16 mV (AA). En este último caso, posiblemente, la presencia de grupos

esteres de densidad de carga negativa, haya provocado la disminución de la carga de las partículas (mayor carga negativa). Por otro lado, debido a que, en general, el módulo del potencial Z fue menor a 30 mV, las partículas obtenidas presentarían tendencia a la agregación.

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Tabla 3**, la fracción microscópica de los distintos almidones presentó tamaños entre 7,9 μm a 43 μm para los AN y entre 17,6 μm y 88 μm para los AA. El mayor tamaño de las partículas a partir de AA respecto del AN (independientemente del GSP) puede atribuirse a la agregación de las mismas. En general, el GSP no tuvo influencia en cuanto al tamaño de las partículas de ambos almidones hasta el nivel 0,5% STMP. En el caso del entrecruzamiento con 1% STMP, no se observó una tendencia clara en cuanto al tamaño de las partículas obtenidas para AN y AA.

Tabla 3. Análisis de distribución de partículas (SLS) para partículas de almidón obtenidas por la técnica de diálisis.

Almidón	Distribución del tamaño de partícula ¹			
	d(0.1) (μm)	d(0.5) (μm)	d(0.9) (μm)	D[3,2] (μm)
Nativo	7,9 \pm 0,5 ^a	14,6 \pm 0,3 ^c	27 \pm 3 ^e	13,0 \pm 0,2 ^g
Nativo – entrecr. 0,5% STMP	8 \pm 1 ^a	15 \pm 2 ^c	30 \pm 1 ^e	13 \pm 2 ^g
Nativo – entrecr. 1% STMP	8,7 \pm 0,4 ^a	19,5 \pm 0,3 ^j	43 \pm 2 ^l	16 \pm 1 ⁿ
Acetilado	22 \pm 1 ^b	46,3 \pm 0,5 ^d	84 \pm 5 ^f	35 \pm 3 ^h
Acetilado – entrecr. 0,5% STMP	20,8 \pm 0,2 ^b	45,9 \pm 0,6 ^d	88 \pm 5 ^f	34,0 \pm 0,2 ^h
Acetilado – entrecr. 1% STMP	17,6 \pm 0,5 ⁱ	39 \pm 3 ^k	76 \pm 4 ^m	29,3 \pm 0,7 ^o

1: d(0.1), d(0.5) y d(0.9): diámetro del 10, 50 o 90% de la población acumulada. D[3,2]: Diámetro de Sauter (Diámetro de una esfera que tiene igual relación volumen/superficie que la partícula de interés). Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre sistemas ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se empleó almidón nativo de mandioca para sintetizar almidón acetilado y/o entrecruzado con distintos niveles de STMP.

Se pudo concluir que el proceso de acetilación incrementó la capacidad de hinchamiento y la solubilidad de los gránulos en comparación con el nativo, mientras que el entrecruzamiento con 1% STMP, tuvo el efecto contrario. La erosión y daño observados (SEM) en los gránulos de AA, pudo también haber contribuido a su mayor sensibilidad al agua y capacidad de entrecruzamiento.

Aplicando la técnica de diálisis fue posible obtener nanopartículas de almidón nativo y modificado de tamaño menor a 240 nm y potencial Z negativo. La fracción de micropartículas presentó una distribución de tamaño de partícula menor para el caso de los AN en comparación con el AA.

Tanto las propiedades químicas como micro y nanoestructurales de los diferentes almidones sintetizados, pueden afectar su capacidad de actuar como soporte de sustancias activas. El método de diálisis permite, además, la formación de nanopartículas simultáneamente con la inmovilización de una molécula bioactiva (antimicrobianos), por lo que resulta de interés su aplicación en futuros trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

Atichokudomchai N. y Varavinit S. 2002. Characterization and utilization of acid-modified cross-linked Tapioca Starch in pharmaceutical tablets. *Carbohydrate Polymers*, 53: 263-270.

Bello-Pérez L, Agama-Acevedo E, Zamudio-Flores P, Mendez-Montreal G, Rodríguez Ambríz S. 2010. Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 1434-1440.

Chau CF, Wang YT, Wen YL. 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry*, 100: 1402-1408.

Chronopoulou L, Fratoddi I, Palocci C, Venditti I, Russo M. 2009. Osmosis based method drives the self-assembly of polymeric chains into micro- and nanostructures. *Langmuir*, 25: 11940-11946.

Cushen, M, Kerry, J, Morris, M, Cruz-Romero, M, & Cummins, E. 2012. Nanotechnologies in the food industry – Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*, 24: 30-46.

Kaur B, Ariffin F, Bhat R, Karim AA. 2012. Progress in starch modification in the last decade. *Food Hydrocolloids*, 26: 398-404.

Matalanis A, Griffith JO, McClements DJ. 2011. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25: 1865-1880.

Mirmoghtadaie L, Kadivar M, Shahedi M. 2009. Effects of cross-linking and acetylation on oat starch properties. *Food Chemistry*, 116: 709-713.

Nagavarma B, Hermant K, Ayaz A, Vashuda L, Shivakumar H. 2013. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-A review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5: 16-23.

Rao JP, Geckeler KE. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36: 887-913.

Robinson DKR y Morrison MJ. 2010. Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends. Report for the ObservatoryNANO. Disponible en: www.observatorynano.eu

Rodrigues A, Emeje M. 2012. Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 87: 987-994.

Shogren R y Biswas A. 2006. Preparation of water-soluble and water-swelling starch acetates using microwave heating. *Carbohydrate Polymers*, 64: 16-21.

Simi,CK., Abraham TE. 2007. Hydrophobic grafted and cross-linked starch nanoparticles for drug delivery. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 30: 173-180.

Wongsagonsup R, Pujchakarn T, Jitrakbumrung S, Chaiwat W, Fuongfuchat A, Varavinit S, Dangtip S, Suphantharik M. 2014. Effect of cross-linking on physicochemical properties of tapioca starch and its application in soup product. *Carbohydrate Polymers*, 101: 656-665.

Yusoff A, Murray, BS. 2011. Modified starch granules as particle-stabilizers of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25: 42-55.

Zalduendo MM., Alzate, PC., Gerschenson L., Flores, SK. 2014. Obtención de micro y nanopartículas de almidón como soporte del antimicrobiano sorbato de potasio. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, Vol. 101.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiamiento de la Universidad de Buenos Aires (UBACYT 2011-2014, 20020100100726), CONICET (PIP 11220090100531) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2008-2131; PICT-2012-0183).

COMPORTAMIENTO DE INTERFASES **DURANTE EL PROCESO DE DIGESTIÓN** **GASTRODUODENAL *IN VITRO***

Bellesi F.A.^{1, 2}, **Pizones Ruiz-Henestrosa V.M.**^{1, 2},
Maldonado-Valderrama J.³, **Pilosof A.M.R.**^{1, 2}

1: Universidad de Buenos Aires, Argentina.

2: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

3: Universidad de Granada, Departamento de Física Aplicada, Granada, España.
fbellesi@di.fcen.uba.ar

Resumen: El objetivo general de este trabajo consiste en estudiar la relación entre el tipo de emulsionante empleado, la estructura de las interfases aceite/agua formadas y la resistencia de las mismas al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. La caracterización interfacial de los sistemas se llevó a cabo con un tensiómetro de gota interfacial (OCTOPUS), usando el método de la gota pendiente. Los emulsionantes utilizados fueron de diferentes fuentes (proteínas y polisacáridos (hidroxipropilmetilcelulosas)). Como fase oleosa se utilizó aceite de girasol comercial purificado previamente para eliminar cualquier impureza con actividad interfacial. Los resultados obtenidos demuestran que el comportamiento de las películas interfaciales depende de la naturaleza de las mismas, siendo algunas más sensibles que otras a las enzimas digestivas, como es el caso de las películas proteicas que por su estructura tridimensional más compleja resultan más afectadas. En términos generales, los diferentes

comportamientos observados podrían contribuir al desarrollo de nuevas formulaciones alimentarias con las que se pueda modular la digestión lipídica, pudiendo contribuir a la reducción de los casos de enfermedades asociadas a la elevada ingestión de lípidos.

Palabras claves: digestión, proteína, hidroxipropilmetilcelulosa, interfase.

Abstract: The main objective of this work is understand the behavior of different interfacial films (proteins and polysaccharides) under *in vitro* gastrointestinal conditions. The interfacial characterization was carried out using an interfacial tensiometer (OCTOPUS). The OCTOPUS allows to study the effects of gastrointestinal digestion (bile salts, ionic strength, enzymes, etc.) on interfacial films formed in oil-water interface. The oil phase was commercial sunflower oil which was purified to minimize the surface active impurities present in the oil. The results obtained show that the behavior of these interfacial films under gastrointestinal conditions depends of the nature of the films. The protein films were more affected by the presence of enzymes than HPMC films due to the more complex structure (tridimensional structure, ionizable groups, etc.). This knowledge is important to find interfacial films that resist the action of digestive enzymes (such as lipase) to reduce the lipid adsorption, decreasing the risk of suffering some diseases associated with the high lipid absorption.

Keywords: digestion, protein, hydroxypropylmethylcellulose, interface.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos son utilizados como ingredientes alimentarios en numerosos alimentos procesados con el fin de optimizar propiedades organolépticas tales como textura y sabor. Por otra parte, la presencia de algunos lípidos en los alimentos proporciona una serie de beneficios al consumidor, al actuar como fuente de energía, aporte de vitaminas liposolubles, carotenoides, fitoesteroles y ácidos grasos esenciales. Sin embargo el elevado consumo de alimentos hipercalóricos, ha sido asociado a graves problemas de salud tales como enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes e hiperlipidemia . Es por este motivo que en la última década un número importante de trabajos se ha enfocado en el control de la digestión de lípidos, a modo de facilitar el desarrollo de alimentos funcionales que reduzcan el riesgo a padecer los problemas antes mencionados . Entre ellos, se ha reportado el diseño de matrices alimenticias para la liberación controlada de componentes bioactivos, estudios realizados sobre emulsiones aceite-agua para el control sobre la digestión de lípidos o bien trabajos que se enfocan en el estudio sobre hormonas que tienen impacto directo en la sensación de saciedad o en el metabolismo lipídico .

Los lípidos forman parte de la dieta diaria y son consumidos bajo diferentes formulaciones, entre ellas las emulsiones de aceite en agua (O/W). En estas, las gotas de lípidos son contenidas en un medio acuoso continuo, quedando estabilizado el sistema por la presencia de sustancias anfífilas que las rodean . En los últimos años,

ha sido reportado que las características del film interfacial juegan un papel importante, no solo en la formación y estabilidad de la emulsión, sino también en su comportamiento durante el proceso digestivo . Durante dicho proceso, las emulsiones son expuestas a condiciones extremas, tanto físicas como bioquímicas, que producen cambios en el tamaño de las gotas (floculación, coalescencia, disrupción, etc.) . Aunque la digestión lipídica comienza en el estómago a partir de la acción de la lipasa gástrica, es en el intestino delgado donde ocurre aproximadamente el 70 % de la misma . En el estómago el alimento entra en contacto con el jugo gástrico a pH 2.5, donde por acción de la pepsina, se inicia la hidrólisis proteica .

Tras permanecer entre 1 y 3 horas en el estómago, el alimento parcialmente digerido ingresa al intestino delgado donde se somete a diferentes condiciones fisicoquímicas dadas por la presencia de enzimas (tripsina, quimotripsina y lipasa pancreática), componentes con actividad interfacial como las sales biliares (SB) y fosfolípidos que pueden alterar la estructura interfacial. El pH intestinal se mantiene en 7 a partir de la presencia de NaHCO_3 proveniente de los fluidos pancreáticos, mientras que la fuerza iónica es controlada por la presencia de Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- , PO_4^{-3} , etc., presentes en fluidos liberados por el páncreas y la vesícula biliar, generando condiciones para la óptima actividad de las enzimas duodenales . La digestión de los lípidos ocurre a partir de la acción de la lipasa pancreática, que se adsorbe en la superficie de las gotas de aceite de la emulsión para convertir los triglicéridos (TG) en ácidos grasos libres (AG) y 2-monoglicéridos (MG). Este proceso es facilitado por la presencia de SB (provenientes de la vesícula biliar), que se adsorben

previamente en la superficie del lípido incrementando el área interfacial disponible para la hidrólisis .

Por otra parte, en el intestino delgado, son las proteasas duodenales (tripsina y quimotripsina) las que llevan a cabo la hidrólisis de las proteínas para producir pequeños péptidos.

En términos generales, al final del proceso digestivo, la superficie de las gotas de lípidos quedará formada por una mezcla de sustancias con actividad interfacial, ya sean intrínsecas del aparato digestivo, del alimento o productos provenientes de la digestión tales como péptidos, AG, MG, etc.

El enfoque del presente trabajo consiste en comprender el comportamiento de películas interfaciales (formadas por proteínas y polisacáridos) en interfases de aceite-agua bajo condiciones que simulan la de la digestión gastroduodenal. Se estudiará el efecto que tienen los diferentes componentes presentes durante el proceso digestivo sobre las películas interfaciales formadas, con el objeto de obtener información para la manipulación de estructuras interfaciales que permita un control en la digestión de lípidos y/o en la liberación de componentes bioactivos que pudieran estar contenidos en emulsiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales:

Los emulsificantes empleados fueron: BioPure β -lactoglobulina (β lg) obtenida de DAVISCO Food International (Pureza: 97,8 %), aislado proteico de soja desnaturalizado térmicamente (pureza del 90,5 %) de Sambra, Brasil , hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC): E4M y

E5LV, provenientes de la empresa Colorcon (Argentina) y utilizados sin purificación posterior .

Como fase oleosa se utilizó aceite de girasol comercial purificado previamente con Florisil (Fluka) según el procedimiento descrito por .

En todos los casos se trabajó a una concentración del 1% p/p de emulsionante, concentración suficiente para asegurar la saturación interfacial en el período de tiempo estudiado .

Para simular las condiciones de la digestión gástrica, se preparó una solución a concentración fisiológica de pepsina (Mucosa gástrica porcina, SIGMA) en un fluido que contempla el pH y la fuerza iónica característicos del estómago (SGF).

Las condiciones de la digestión duodenal fueron simuladas con un fluido (SIF) a pH 7, siguiendo el protocolo reportado por , en el cual se disolvieron las proteasas intestinales tripsina y quimotripsina (SIGMA) a concentraciones fisiológicas. La lipólisis intestinal fue simulada a partir de la adición de lipasa pancreática (L3126, Tipo II) en presencia de SB (B3883) ambas provenientes de SIGMA (**Tabla 1**).

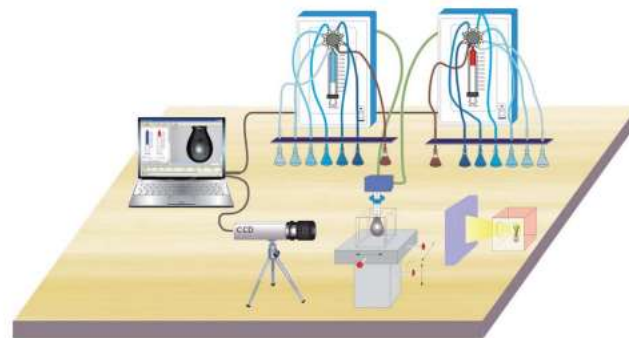


Figura 1: Representación esquemática del tensiómetro interfacial OCTOPUS.

Métodos:

Medición de la tensión interfacial: Con la ayuda de un tensiómetro interfacial OCTOPUS (Universidad de Granada, Granada, España) empleando el método de la gota pendiente, se obtuvo la variación de la tensión interfacial (γ) y los parámetros reológicos dilatacionales en función del tiempo (**Figura 1**). Para llevar a cabo las mediciones se forma una gota con la solución del emulsionante en la punta de un capilar, la cual queda inmersa en una cubeta, que contiene el aceite (temperatura a 37 °C). Las soluciones necesarias para simular la digestión son colocadas en diferentes eppendorfs, que se conectan directamente a la punta del capilar (**Figura 2**).

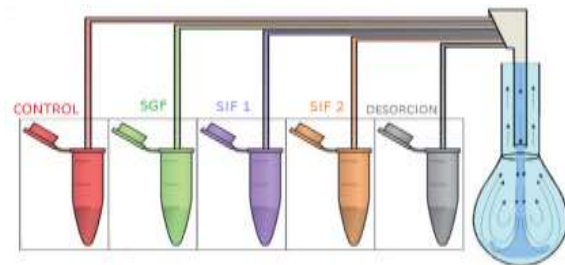


Figura 2: Procedimiento experimental utilizado para llevar a cabo los intercambios de la subfase.

Diseño experimental: Se diseñó un proceso de digestión gastroduodenal con el objeto de simular los principales eventos fisicoquímicos que tienen lugar durante la digestión (**Tabla 1**). En primer lugar, se forma una película con el emulsionante, durante un tiempo suficientemente largo hasta llegar a condiciones de

pseudoequilibrio (Etapa Control). Luego, por medio del intercambio de la subfase, se incorpora el SGF en presencia de pepsina para imitar el pasaje a través del estómago (Etapa SGF). En un segundo intercambio de la subfase, se incorpora el fluido SIF en presencia de las proteasas duodenales (Etapa SIF 1) a modo de simular la proteólisis que tiene lugar en el intestino delgado. A continuación, se realiza el tercer intercambio de la subfase con el SIF en presencia de la lipasa pancreática y SB (Etapa SIF 2), con el objeto de simular la lipólisis duodenal. Por último se lleva a cabo la etapa denominada desorción (DES), que consiste en el intercambio de la subfase por el SIF, con el objetivo de eliminar del área interfacial cualquier material adsorbido reversiblemente. Al final de cada una de las etapas, se obtuvo el módulo elástico interfacial (E) por medio de deformaciones sinusoidales del área de la gota .

Tabla 1: Composición de los fluidos digestivos utilizados en cada una de las etapas.

Etapas	Composición
Control	Solución acuosa de emulsionante al 1%
SGF	NaCl, CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ , KCl pH 2.5 + Pepsina
SIF 1	NaCl, CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ pH 7 + Tripsina y Quimotripsina
SIF 2	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ HPO ₄ pH 7 + Lipasa pancreática y SB
DES	NaCl, CaCl ₂ , K ₂ HPO ₄ pH 7

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento interfacial de las películas proteicas: β lg y Soja.

La **Figura 3** muestra la evolución de γ con el tiempo para películas interfaciales formadas con β lg (**Figura 3A**) y soja (**Figura 3B**) al ser sometidas al proceso de digestión gastroduodenal *in vitro* descrito en el apartado anterior. La **Tabla 2** resume los valores de γ de "equilibrio" y E obtenidos al final de cada una de las etapas.

Respecto a la etapa de adsorción, se observa en la **Figura 3** que ambas proteínas presentan una cinética de adsorción interfacial relativamente lenta, alcanzándose valores de γ de "equilibrio" a los 80 min (**Tabla 2**). El comportamiento observado concuerda con reportes previos y es característico de sustancias de elevado peso molecular y mayor complejidad estructural. En cuanto a los valores de E obtenidos, ambas proteínas dan origen a la formación de un film elástico caracterizado por un valor alto de E, característico de las películas proteicas, que puede ser atribuido a las estructuras globulares y compactas, que refleja el grado de interacción entre las moléculas adsorbidas.

Durante la segunda etapa, la **Figura 3** muestra la evolución de γ durante el proceso de pepsinólisis. Se observa que bajo tales condiciones ambas películas experimentan un incremento en los valores de γ . Los aumentos en los valores de E (**Tabla 2**) para la película formada por β lg, pueden ser consecuencia de aumentos en la flexibilidad de la molécula, que como resultado de la hidrólisis, da lugar a mayor número de interacciones proteína-proteína. Sin embargo para la película formada

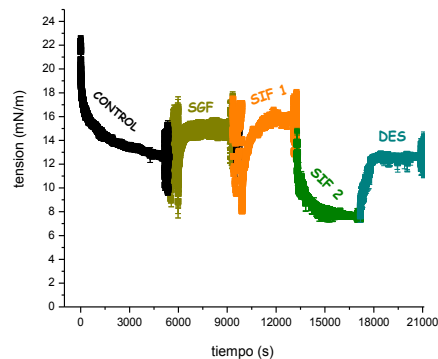
con proteínas de soja no se observaron cambios importantes en los valores de E (**Tabla 2**), lo que podría indicar que la película proteica de soja sería más resistente a la hidrólisis llevada a cabo por la pepsina.

Tabla 2: Tensión interfacial (γ) y módulo dilatacional interfacial (E) obtenidos al final de cada una de las etapas (mN/m.)

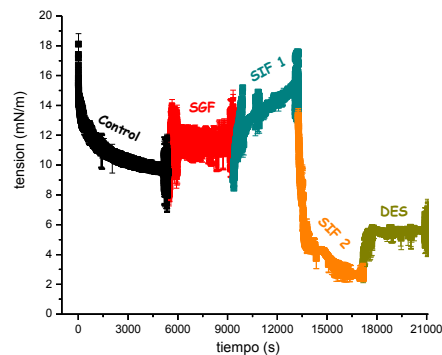
Etapas	Emulsionante							
	β lg		Soja		E5LV		E4M	
	Γ	E	γ	E	γ	E	Γ	E
Cont rol	12,6 ± 0,3	24,6 ± 2,5	9,5 ± 0,4	24,3 ± 2,7	11,3 ± 0,7	6,9 ± 0,1	11,11 ± 0,07	7,1 ± 1,5
SGF	14,5 ± 1,1	30,3 ± 1,7	11,4 ± 0,8	23,6 ± 1,2	10,1 ± 0,6	7,8 ± 0,5	8,02 ± 1,04	6,9 ± 0,9
SIF 1	15,5 ± 0,3	25,6 ± 2,3	15,5 ± 0,2	20,3 ± 2,5	3,5 ± 0,2	2,4 ± 0,7	3,35 ± 0,01	1,6 ± 0,4
SIF 2	7,5 ± 0,1	5,6 ± 1,2	2,6 ± 0,1	4,9 ± 0,9				
DES	12,8 ± 0,2	8,2 ± 1,2	5,6 ± 0,2	9,6 ± 3,9	7,3 ± 0,3	7,4 ± 0,2	7,9 ± 0,3	4,6 ± 0,2

A continuación se incorporó el fluido SIF junto con las proteasas (tripsina y quimotripsina). Según los resultados obtenidos, el efecto observado es el mismo para ambas películas: un aumento en los valores de γ (**Figura 3**) y un descenso en los valores de E (**Tabla 2**). Los aumentos de γ obtenidos pueden ser atribuidos a la formación de péptidos producto de la hidrólisis que dan como

resultado aumentos en el área interfacial libre . El descenso de E puede ser consecuencia de la disminución del espesor de la película interfacial, consecuencia de la formación de moléculas de menor tamaño molecular. Posiblemente, los péptidos formados, podrían repelerse en la interfase, originando menor cohesividad de las películas interfaciales .



A



B

Figura 3: Variación de γ en el tiempo para las películas interfaciales de β lg (A) y Soja (B), durante el proceso de digestión gastroduodenal *in vitro*.

En la etapa numero 4 tras el intercambio de la subfase por el SIF 2 (**Tabla 1**) en presencia de lipasa pancreática y SB, se observa una disminución de γ (**Figura 3**). Esta disminución podría ser dividida en dos etapas: al principio una disminución brusca, seguida de una etapa de disminución más lenta, que da como resultado un valor de γ final de 7,5 mN/m para la película formada con β lg y 2,6 mN/m para la formada con proteínas de soja. Según estudios reportados con anterioridad, la inmediata disminución de γ puede ser atribuida a las SB, que dada su elevada actividad interfacial, son capaces de penetrar los films interfaciales, desplazando parcialmente las moléculas proteicas adsorbidas, lo que lleva a que los valores de γ se aproximen a los de una solución de SB solas . Además de esto, los films interfaciales, sufren una disminución importante en los valores de E al incorporar la solución de SB como se refleja en la **Tabla 2** .

El cambio que se produce en la velocidad con la cual disminuye γ podría ser atribuido a la presencia de AG producto de la lipólisis, que con el tiempo se acumulan en la interfase dificultando el acceso de la lipasa pancreática a la interfase . Ha sido demostrado en trabajos previos, que los AG al tener actividad interfacial, podrían competir con la lipasa pancreática para conseguir un lugar en la interfase .

Para concluir, se realizó la etapa número 5 que tiene como objetivo remover de la interfase cualquier material adsorbido reversiblemente (SB, enzimas y productos de la digestión), a modo de obtener las características remanentes del film tras su paso por el proceso digestivo. Como se observa en la **Figura 3**, en ambos casos se produce un aumento tanto en γ en E (**Tabla 2**), que indican que ha quedado proteína adsorbida en la interfase capaz de re-asociarse tras el proceso digestivo.

Sin embargo los valores finales alcanzados (**Tabla 2**), difieren respecto a los valores iniciales, lo que indica que ambas películas interfaciales sufrieron cambios que dependen del tipo de proteína .

Comportamiento interfacial películas derivadas de HPMC: E5LV y E4M.

Utilizando la misma metodología que la descrita para el análisis de los films proteicos, se estudió el comportamiento interfacial de películas formadas con HPMC: E5LV y E4M, con la diferencia de que en este caso, la etapa intestinal fue desarrollada en una única etapa que contempla la proteólisis y el proceso de lipólisis en buffer SIF a pH 7 (**Tabla 1**).

La **Figura 4** muestra cómo varía la tensión interfacial con el tiempo para ambas películas interfaciales: E4M (**Figura 4A**) y E5LV (**Figura 4B**).

El comportamiento interfacial de ambos ya ha sido estudiado con anterioridad . En contraste con las proteínas, los HPMC estudiados presentan una cinética de adsorción interfacial más rápida alcanzando un valor de γ constante en pocos minutos. Los bajos valores de E obtenidos, indican el menor grado de interacción que los polisacáridos experimentan en la interfase, en comparación con el comportamiento observado para las proteínas .

Los efectos observados tras la incorporación del SGF fueron menos notables que en el caso de las películas proteicas, lo cual refleja que los polisacáridos serían resistentes a la hidrólisis que llevan a cabo las enzimas digestivas . Por otra parte, el bajo número de grupos ionizables que presentan en su estructura, disminuiría los efectos que pueda ocasionar el SGF sobre los grupos

funcionales . han reportado que la carga superficial de emulsiones estabilizadas por estos polisacáridos, es cercana a la neutralidad, tanto a pH neutros como ácidos, hecho que podría explicar la baja alteración obtenida en los valores de E tras la incorporación del SGF.

Figura 4: Variación de γ con el tiempo para películas interfaciales de E5LV (A) y E4M (B) durante el proceso de digestión gastroduodenal in vitro

Dada la resistencia de los polisacáridos a las enzimas digestivas, se decidió simular la etapa duodenal incorporando en un solo paso todos los componentes. Tras el intercambio de la subfase por el SIF se observó una caída de la γ que, al igual que lo observado para las proteínas, podría dividirse en dos etapas: disminución rápida al principio seguida de una caída más lenta. Dado el pequeño tamaño que presentan las SB y su elevada actividad interfacial, originan la caída casi instantánea de la γ (**Figura 4**). Por otra parte, al igual que lo observado en el apartado anterior, el cambio en la velocidad a la cual decae la γ podría ser consecuencia de la acumulación de productos de la digestión de TG (como los AG), que podrían adsorberse en la interfase dificultando el acceso de la lipasa al sitio activo, haciendo más lento el proceso de hidrólisis.

Respecto a los valores de E (**Tabla 2**), se produce una pérdida importante de la elasticidad, alcanzando valores de E cercanos al correspondiente a una solución de SB solas (2 mN/m), lo que indicaría que esta etapa de la digestión viene controlada por la presencia de las SB. Sin embargo la película formada por E4M parece ser la más

desestructurada, dados los menores valores de E obtenidos. Esto podría indicar que las películas de E4M serían más susceptibles al proceso hidrolítico llevado a cabo por la lipasa pancreática.

Al realizar la última etapa (desorción), ambos polisacáridos experimentan un aumento en los valores de γ , que podrían asociarse a la eliminación de componentes con actividad interfacial, tales como las SB, enzimas y productos provenientes de la digestión como los AG. El mayor aumento observado para la película formada por E4M podría ser indicativo de que esta experimentó un mayor grado de hidrólisis. En base a los valores finales de E obtenidos (**Tabla 2**), la película formada con E5LV habría alcanzado una mayor reestructuración dado que presenta mayores valores de E que la película formada por E4M al final del proceso.

CONCLUSIÓN

El trabajo pone de manifiesto la aplicación de metodologías sofisticadas y modernas para imitar el pasaje de películas emulsificantes a través del tracto gastrointestinal. Dispositivos versátiles, como el utilizado en este caso, permiten medir de manera secuencial los efectos que cada uno de los componentes del proceso digestivo tienen sobre las películas interfaciales. En términos generales, los resultados obtenidos muestran que la susceptibilidad de las películas al proceso digestivo depende de la naturaleza de las mismas. Durante la etapa gástrica, los efectos de la pepsina fueron menores para las películas formadas por HPMC en comparación con las proteínas, donde como resultado de la pepsinólisis se vio afectado el grado de empaquetamiento en la interfase, reflejado como cambios en el valor del módulo elástico. Respecto a la etapa duodenal, los efectos de la lipólisis fueron similares en todos los casos estudiados, produciéndose gran desestructuración en todos los sistemas, posiblemente por la presencia de SB. Sin embargo, teniendo en cuenta el aumento que ocurre en γ durante la etapa de desorción, podría pensarse que la proteína de soja sería menos afectada por la lipasa pancreática, mientras que la formada por β lg la más susceptible al sufrir los mayores aumentos en γ , asociados a la eliminación de AG de la región interfacial.

BIBLIOGRAFÍA

- Bahtz J, Knorr D, Tedeschi C, Leser ME, Valles-Pamies B, Miller R. 2009. Adsorption of octanoic acid at the water/oil interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74: 492-497.
- Bauer E, Jakob S, Mosenthin R. 2005. Principles of Physiology of lipid digestion. *Journal of Animal Science*, 18: 282-295.
- Bellesi FA, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Pilosof AMR. 2014. Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids*, 36: 115-122.
- Benjamins J, Lyklema J, Lucassen-Reynders EH. 2006. Compression/expansion rheology of oil/water interfaces with adsorbed proteins. Comparison with the air/water surface. *Langmuir*, 22: 6181-6188.
- Camino NA, Pérez OE, Sanchez CC, Rodriguez Patino JM, Pilosof AMR. 2009. Hydroxypropylmethylcellulose surface activity at equilibrium and adsorption dynamics at the air-water and oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 23: 2359-2368.
- Camino NA, Pilosof AMR. 2011. Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part II. Submicron-emulsions as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25: 1051-1062.
- Carp DJ, Bartholomai GB, Pilosof AMR. 1997. A Kinetic Model to Describe Liquid Drainage from Soy Protein Foams over an Extensive Protein Concentration Range. *LWT - Food Science and Technology*, 30: 253-258.
- Helbig A, Silletti E, Timmerman E, Hamer RJ, Gruppen H. 2012. In vitro study of intestinal lipolysis using pH-stat and gas chromatography. *Food Hydrocolloids*, 28: 10-19.

- Hur SJ, Decker EA, McClements DJ. 2009. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 114: 253-262.
- Lesmes U, McClements DJ. 2012. Controlling lipid digestibility: Response of lipid droplets coated by β -lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 26: 221-230.
- Li J, Ye A, Lee SJ, Singh H. 2013. Physicochemical behaviour of WPI-stabilized emulsions in in vitro gastric and intestinal conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111 80-87.
- Li Y, McClements DJ. 2010. New Mathematical model for Interpreting pH-Stat Digestion Profiles: Impact of Lipid Droplet Characteristics on in Vitro Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 8085-8092.
- Lindahl A, Ungell A-L, Knutson L, Lennernäs H. 1997. Characterization of Fluids from the Stomach and Proximal Jejunum in Men and Women. *Pharmaceutical Research*, 14: 497-502.
- Malaki Nik A, Wright AJ, Corredig M. 2011. Impact of interfacial composition on emulsion digestion and rate of lipid hydrolysis using different in vitro digestion models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 83: 321-330.
- Maldonado-Valderrama J, Holgado-Terriza JA, Torcello-Gomez A, Cabrerizo-Vilchez MA. 2013. In vitro digestion of interfacial protein structures. *Soft Matter*, 9: 1043-1053.
- Maldonado-Valderrama J, Miller R, Fainerman VB, Wilde PJ, Morris VJ. 2010. Effect of Gastric Conditions on β -Lactoglobulin Interfacial Networks: Influence of the Oil Phase on Protein Structure. *Langmuir*, 26: 15901-15908.
- Maldonado-Valderrama J, Torcello-Gómez A, del Castillo-Santaella T, Holgado-Terriza JA, Cabrerizo-Vilchez MA. 2014. Subphase exchange experiments with the pendant drop technique. *Advances in Colloid and Interface Science*.
- Maldonado-Valderrama J, Woodward NC, Gunning AP, Ridout MJ, Husband FA, Mackie AR, Morris VJ, Wilde PJ. 2008. Interfacial Characterization of β -Lactoglobulin Networks: Displacement by Bile Salts. *Langmuir*, 24: 6759-6767.
- Marciani J, Faulks R, Wickham MSJ, Bush D, Pick B, Wright J, Cox EF, Fillery-Travis A, Gowland PA, Spiller RC. 2009. Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety. *British Journal of Nutrition*, 101.
- McClements D, Decker E, Park Y, Weiss J. 2008. Designing Food Structure to Control Stability, Digestion, Release and Absorption of Lipophilic Food Components. *Food Biophysics*, 3: 219-228.
- McClements DJ, Li Y. 2010. Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based. *Food & Function*, 1: 32-59.
- Mu H, Hoy CE. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*, 43: 105-133.
- Mun S, Decker EA, McClements DJ. 2007. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International*, 40: 770-781.
- Nacer A, Sanchez C, Villaume C, Mejean L, Mouecoucou J. 2004. Interactions between beta-lactoglobulin and pectins during in vitro gastric hydrolysis. *J Agric Food Chem*, 52: 355-360.
- Nik AM, Corredig M, Wright AJ. 2011. Release of lipophilic molecules during in vitro digestion of soy protein-stabilized emulsions. *Mol Nutr Food Res*, 55: 3.

- Pizones Ruíz-Henestrosa VM, Carrera Sánchez C, Yust Escobar MdM, Pedroche Jiménez JJ, Millán Rodríguez F, Rodríguez Patino JM. 2007. Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 309: 202-215.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147–148: 237-250.
- Sandra S, Decker E, McClements D. 2008. Effect of Interfacial Protein Cross-Linking on the in Vitro Digestibility of Emulsified Corn Oil by Pancreatic Lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 7488-7494.
- Sarkar A, Goh KKT, Singh RP, Singh H. 2009. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by b-lactoglobulin in an in vitro gastric model. *Food Hydrocolloids*, 23: 1563-1569.
- Sarkar A, Horne DS, Singh H. 2010. Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model. *Food Hydrocolloids*, 24: 142-151.
- Singh H, Ye A, Horne D. 2009. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Progress in Lipid Research*, 48: 92-100.
- Slavin J. 2003. Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 287-291.
- Torcello-Gómez A, Maldonado-Valderrama J, Jódar-Reyes AB, Cabrerizo-Vílchez MA, Martín-Rodríguez A. 2014. Pluronic-covered oil-water interfaces under simulated duodenal conditions. *Food Hydrocolloids*, 34: 54-61.
- Troncoso E, Aguilera JM, McClements DJ. 2012. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food-grade nanoemulsions. *Food Hydrocolloids*, 27: 355-363.
- Wang Z, Neves MA, Yin L-J, Kobayashi I, Uemura K, Nakajima M. 2012. In Vitro Gastrointestinal Digestibility of Soybean Oil-in-Water Emulsion Droplets Stabilized by Polyglycerol Esters of Fatty Acid. *Food Science and Technology Research*, 18: 149-156.
- Wooster TJ, Day L, Xu M, Golding M, Oiseth S, Keogh J, Clifton P. 2014. Impact of different biopolymer networks on the digestion of gastric structured emulsions. *Food Hydrocolloids*, 36: 102-114.
- Zhu X, Ye A, Verrier T, Singh H. 2013. Free fatty acid profiles of emulsified lipids during in vitro digestion with pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 139: 398-404.

ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE FIBRA ALIMENTARIA SOBRE EL COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE MASAS DE GALLETITAS

Blanco Canalis M.S.¹⁻², **Valentinuzzi M.C.**¹⁻³, **Acosta R.**¹⁻³, **León A.E.**¹⁻², **Ribotta P.D.**¹⁻²

1: Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

2: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (CONICET - UNC).

3: FAMAFA-UNC, IFEG-CONICET

sblanco@agro.unc.edu.ar

Resumen: El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la incorporación de diferentes fibras alimentarias sobre el comportamiento térmico de las masas de galletitas. Se elaboraron masas de galletita antiaglutinantes con incorporación de fibras alimentarias y se evaluaron mediante Análisis Termo-Gravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y posterior análisis de los resultados mediante deconvolución de las curvas. Las fibras utilizadas fueron: inulina (IN), fibra insoluble de avena (FA), almidón de maíz alto en amilosa (RSII) y fosfato de di-almidón fosfatado (RSIV). Los termogramas de pérdida de peso obtenidos por TGA mostraron el perfil de evaporación del agua durante el calentamiento de las masas entre 25 y 120 °C. Las muestras control, RSII y RSIV mostraron perfiles de pérdida de agua similares, un incremento progresivo de la evaporación de agua con una inflexión alrededor de 85 °C, mientras que IN y FA presentaron

crecimiento continuo en todo el rango analizado. El porcentaje de pérdida de peso varió entre 10,2% (FA-12%) y 14,2% (RSIV-12%). Las curvas de DTGA fueron ajustadas por funciones Gausianas. Este análisis permitió conocer la contribución de diferentes picos durante la simulación del horneado de la masa. La muestra Control, RSII y RSIV presentaron curvas similares, mientras que IN y FA cambiaron significativamente el patrón. La deconvolución de las curvas mostró cuatro picos. RSII y RSIV presentaron una distribución similar al control, mientras que IN y FA cambiaron notablemente el área de cada pico. Las transiciones térmicas durante el proceso de calentamiento analizadas por DSC mostraron que todas las fibras afectan la distribución de agua, dejando más agua disponible para la gelatinización del almidón de la harina de trigo.

Palabras clave: galletitas, fibra alimentaria, TGA, DSC

Abstract: The aim of this work was to analyze the effect of dietary fiber incorporation on the cookie dough thermal behavior. Cookies dough were elaborated with dietary fiber incorporation and evaluated by Thermo-Gravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) and subsequent curves deconvolution. Fibers used were: inulin (IN), insoluble oat fiber (FA), hi amylose maize starch (RSII) and phosphated distarch phosphate (RSIV). TGA weight loss thermograms presented an increase between 25 and 120 °C. Control, RSII and RSIV samples showed similar curve shapes with an inflection point around 85 °C, while IN and FA showed a continuous increase through the entire assay. The percentage of weight loss varied between 10,2% (FA-12%) and 14,2% (RSIV-12%). DTGA were a combination of

different peaks. Control, RSII and RSIV samples presented similar curve shapes, while IN and FA modified significantly peaks áreas. Thermal transition during heating process analyzed by DSC showed that fiber incorporation affected water distribution in all samples, leaving more water available to produce starch gelatinization from wheat flour.

Keywords: cookies, dietary fiber, TGA, DSC

INTRODUCCIÓN

Las galletitas son productos altamente consumidos a nivel mundial. Se estima que el consumo anual en nuestro país es de 10 kg por habitante por año. Las altas cantidades de azúcar y grasa son fundamentales en la elaboración de galletitas dulces. Esto puede actuar como factor de riesgo frente a enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), como enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, diabetes y obesidad, entre otras. Una de las estrategias para disminuir los riesgos provocados por la ingesta de alimentos de características nutricionales inadecuadas es la incorporación de fibras alimentarias en su formulación. La fibra alimentaria es una parte comestible de las plantas que resiste la hidrólisis por parte de las enzimas digestivas humanas y la absorción en el intestino delgado, con parcial o completa fermentación en el colon. A pesar de no intervenir directamente en los procesos del metabolismo básico humano, la fibra alimentaria genera efectos beneficiosos para la salud, tales como disminución del tiempo de tránsito intestinal e incremento del número de deposiciones, influye sobre la sensación de apetito, reduce el nivel de colesterol total y/o colesterol LDL, reduce los niveles de glucosa postprandial y/o de insulina, absorción de tóxicos y modifica la absorción de grasas, azúcares, minerales y ácidos biliares (AACC 2001). La fibra alimentaria se puede clasificar en soluble e insoluble, según su solubilidad en agua.

El almidón resistente es una porción del almidón que no es digerible por las enzimas humanas, produciendo

saciedad por mayor tiempo y controlando la liberación de glucosa (Englyst et al. 1999, Nugent 2005). Desde el descubrimiento de sus propiedades nutricionales, se han llevado a cabo muchos estudios que demuestran que presentan funciones fisiológicas similares a las de la fibra alimentaria (Asp 1994). Hay cuatro tipos de almidones resistentes, pero solo dos son utilizados para la incorporación en alimentos. RSII (almidón resistente tipo II), resiste la digestión enzimática debido a su forma granular, mientras que RSIV es un almidón químicamente modificado, formando enlaces distintos a α -(1-4) o α -(1-6) (Sajilata et al. 2006).

La fibra insoluble de avena tiene asociada una alta capacidad de retención de agua y está compuesta fundamentalmente por β -glucanos, un grupo de polímeros lineales de glucosa, importantes para mantener las funciones colónicas saludables y reducir la constipación (Manthey et al. 1999).

La inulina es considerada una fibra soluble ya que solo una enzima, la inulinasa es capaz de hidrolizarla. Esta enzima no se encuentra en el tracto digestivo humano. Químicamente, la inulina consiste en polímeros lineales de D-fructosa, unidos por enlaces β -(2-1), con un grado de polimerización entre 10 y 25. Esta fibra presenta características distintivas con respecto a otras, ya que su incorporación en los alimentos no genera grandes cambios en la viscosidad y presenta un efecto mejorador cuando se utiliza para la formulación de ciertos alimentos (Pak 2006, Blanco et al. 2013).

A pesar de los efectos beneficiosos ampliamente descritos del consumo de fibra alimentaria, su incorporación produce alteraciones en la estructura de los alimentos. Particularmente, las galletitas presentan una estructura muy compleja, en la que cada ingrediente

de la formulación juega un rol fundamental. La escasa cantidad de agua junto con el alto contenido de grasa y azúcar, previenen la formación de la red de gluten, indeseable en este producto. A pesar de estar en baja concentración, el agua tiene una función compleja, ya que afecta la naturaleza de las interacciones entre los ingredientes, determina el estado conformacional de los polímeros y contribuye a la estructura de la masa, modificando su comportamiento reológico. Durante el horneado, la masa de la galletita se seca y se producen cambios en las interacciones que están gobernadas por la afinidad de cada componente por el agua.

Cuando se agrega a la formulación ingredientes con alta afinidad por el agua (como la fibra alimentaria), esta se redistribuye, traduciéndose en cambios en las propiedades reológicas de las masas. Las modificaciones en la formulación de galletitas no solo generan problemas tecnológicos durante la elaboración, sino también produce cambios en la textura, sabor y parámetros de calidad que pueden llevar a una pérdida de la aceptabilidad por parte de los consumidores (Maache-Rezzoug et al. 1998).

En trabajos anteriores se pudo comprobar que el agregado de inulina mejora la calidad de las galletitas mientras que la fibra de avena el efecto contrario y los almidones resistentes no producen cambios significativos. De esta manera, es posible obtener galletitas de alta calidad nutricional, mejorando o sin introducir variaciones en las propiedades tecnológicas del producto.

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la incorporación de diferentes fibras alimentarias sobre el comportamiento térmico de las masas de galletitas mediante el uso de TGA y DSC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de las masas

Las masas de galletita se elaboraron con harina de trigo comercial según el Micrométodo III descrito por Finney et al. (1950) con las modificaciones realizadas en el CIMMYT (León et al. 1996). La incorporación de fibra alimentaria en la formulación se realizó en dos niveles: 6 y 12% (base seca) en sustitución de harina de trigo. Las fibras alimentarias utilizadas fueron: inulina (Orafiti ®HP) obtenida de Orafiti Food Ingredients (Bélgica), con grado de polimerización mayor a 23, fibra de avena soluble Saporiti S.A. (Buenos Aires, Argentina) (Canadian Harvest®Oat Fibers serie 200/58, USA) , RSII: almidón de maíz alto en amilosa (Hi maize 260, National Starch) y RSIV: fosfato de di-almidón fosfatado (Novelose 480, National Starch) fueron provistos por Gelfix S.A. (Buenos Aires, Argentina) .

Determinaciones

El comportamiento térmico de las masas de galletita se evaluó mediante Análisis Termo-Gravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

TGA. Las muestras de masas (aproximadamente 10 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio de 40 µL (abiertas). Se analizaron las muestras en un rango de temperatura de 20 a 120 °C a una velocidad de calentamiento de 4 °C/minuto. A partir de los resultados de TGA se obtuvo la curva de pérdida de peso (considerado como pérdida de agua) de cada muestra y la derivada primera de éstas curvas (DTGA) (SigmaPlot 10.0 USA/Canada).

DSC. Las muestras de masas (aproximadamente 10 mg) se colocaron en cápsulas de aluminio de 40 µL, se

cerraron herméticamente y se analizaron mediante DSC 823 (Mettler-Toledo, Suiza). Se realizaron corridas de las muestras, contra un blanco (cápsula vacía) en un rango de temperatura de 20 a 120 °C a 4 °C/minuto. Se registró la temperatura de inicio, finalización y pico como también la entalpía de transición.

La deconvolución es una herramienta matemática que es a menudo utilizada para separar eventos que ocurren solapados. La superposición de los picos, que representan diferentes fenómenos, se separan en varios picos individuales. Las curvas de DTGA y DSC se analizaron mediante deconvolución en distintos picos mediante funciones gaussianas y cuantificación de las áreas (Peakfit 4.0). El tamaño de los diferentes picos se calculó como el área de pico (%) en relación al total de los picos. Se consideraron ajustes con r^2 superiores a 0,99.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el método de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación de 0,05 (programa INFOSTAT, FCA, UNC, Argentina) (Di Rienzo et al. 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de los resultados de TGA se obtuvieron las curvas de pérdida de peso que se asocia a la reducción de agua por evaporación, ya que en este rango de temperaturas no se ha descrito descomposición de ninguno de los ingredientes de las masas. En la Figura 1

se muestran las curvas promedios de las masas con y sin incorporación de las fibras al mayor nivel de sustitución (12%). En todos los casos, las curvas de 6% dieron resultados intermedios entre el control y 12% de reemplazo. Los termogramas presentaron un aumento continuo de la pérdida de peso entre 25 y 120 °C. Las curvas de la masa control, RSII y RSIV mostraron una inflexión bien marcada alrededor de los 85 °C, a partir de la cual se produce un aumento de la velocidad de evaporación del agua. Las masas con inulina y fibra de avena presentan curvas distintas al resto, con un crecimiento continuo, sin inflexión y una disminución de la pendiente a partir de los 95 °C.

Figura 1. Curva de pérdida de peso de las muestras control y con 12% de incorporación de fibra durante el calentamiento.

Se calculó el porcentaje de pérdida de peso de cada muestra al finalizar el ensayo (Tabla 1). Los valores variaron entre 10,23% y 14,14%. Los valores más bajos fueron para FA e IN, mientras que RSII y RSIV presentaron mayor pérdida de peso que la masa control. Además se determinó la temperatura a la cual las masas pierden el 50% del agua. Solo se encontraron diferencias significativas para las muestras de IN, FA y RSII con 12% de sustitución. En estos tres casos los valores temperatura obtenidos fueron menores a la de la masa control. Esto significa que la velocidad de pérdida de agua inicial fue mayor en estas muestras.

Muestra	Temperatura para el 50% de pérdida (°C)		Pérdida total (%)	
C	83,87 ± 0,57	bc	12,46 ± 0,39	bc
IN6	78,06 ± 4,10	bc	11,92 ± 0,61	c
IN12	67,23 ± 5,58	de	11,94 ± 0,15	c
FA6	83,94 ± 1,23	bc	13,14 ± 0,03	ab
FA12	59,00 ± 5,11	e	10,23 ± 0,48	d
RSII6	86,62 ± 2,75	ab	13,73 ± 0,05	ab
RSII12	93,24 ± 0,95	a	13,60 ± 0,00	ab
RSIV6	85,15 ± 0,10	ab	12,81 ± 1,29	bc
RSIV12	75,52 ± 8,79	cd	14,14 ± 0,08	a

Tabla 1. Efecto de la incorporación de fibras sobre la evaporación del agua durante el calentamiento de las masas de galletitas. C: Control; IN6: Inulina 6%; IN12: Inulina 12%; FA6: Fibra de avena 6%; FA12: Fibra de avena 12%; RSII6: RSII 6%; RSII12: RSII 12%; RSIV6: RSIV 6%; RSIV12: RSIV 12%.

A partir de los datos de las curvas de TGA se obtuvo la derivada primera, que da información sobre las velocidades de pérdida de agua de las muestras. Se observó que cada curva resultó de la combinación de diferentes picos. Las muestras control, RSII y RSIV presentaron curvas similares, donde se destacó un máximo entre los 85 y los 95 °C y otro pico de menor altura alrededor de los 40 °C. Las curvas de las masas con IN y FA mostraron el mismo pico alrededor de los 40 °C,

sin embargo, las curvas cambiaron significativamente (Figura 2) a partir de 50 °C.

Figura 2. Curvas de velocidad de pérdida de peso (DTGA) de las muestras control y con incorporación de 12% de fibras durante el calentamiento.

Estas masas poseen perfiles únicos DTG que son una combinación de diferentes picos presentes dentro del perfil, los que están determinadas por el estado del agua en la matriz. La deconvolución de las curvas obtenidas por análisis térmico gravimétrico de las masas permitió estudiar los diferentes estados del agua y asociar la distribución del agua entre los distintos componentes de las masas. Se realizó a través de un modelo con cuatro picos generados por funciones gaussianas. Las curvas ajustadas presentaron valores de r^2 mayores a 0,998. Los picos asociados a la masa control tuvieron un máximo alrededor de 38, 66, 88 y 97 °C (Figura 3).

Figura 3. Curvas de velocidad de pérdida de peso (DTGA) y su deconvolución de las muestras Control e Inulina 12% con la temperatura.

En la **Tabla 2** se muestran las temperaturas a la que ocurre el máximo de los picos de cada muestra y el área de cada pico, en relación a su área total.

	Control		IN 12%		FA 12%		RSII 12%		RSIV 12%	
Muestra	Área (%)	Centro	Área (%)	Centro (°C)	Área (%)	Centro	Área (%)	Centro	Área (%)	Centro

	(°C)		(%)		(°C)		(%)		(°C)	
Pico 1	11,45	37,9 1	36,3 1	42,98	24, 96	38,7 6	14, 01	39,5 9	17,2 6	37,63
Pico 2	25,85	65,9 6	25,4 9	66,65	26, 98	56,2 3	24, 32	71,5 1	34,8 7	64,80
Pico 3	33,50	88,0 7	21,3 2	83,82	13, 75	76,4 4	56, 12	92,8 6	36,5 2	85,62
Pico 4	29,19	97,1 1	16,8 8	98,87	34, 31	78,6 7	5,5 5	108, 06	11,3 5	100,2 4

Tabla 2. Área y temperatura del centro de cada pico de DTGA de las muestras control y con incorporación de 12% de fibra.

Las masas con RSII y RSIV mostraron una distribución similar a la masa control, tanto en las áreas de los picos como en la temperatura del máximo. Sin embargo, se observó que el tercer pico de RSIV 12% fue mucho mayor que el resto de las muestras y el cuarto pico en sistemas con almidones resistentes fue menor que en la masa control.

El reemplazo de harina por IN y FA cambió notablemente el peso relativo de cada pico, es decir la distribución del agua entre los componentes del sistema. Ambas fibras produjeron un aumento en el área del pico 1, una disminución en el área del pico 3 y en el caso de la FA, el cuarto pico se produjo a una temperatura casi 20 °C menor que la muestra control. La incorporación de inulina, en el máximo nivel, además generó una disminución del cuatro pico. La incorporación de fibra de avena e inulina alimentaria produjo importantes modificaciones en las distribuciones relativas del agua entre los componentes.

Roozendaal et al. (2012), realizaron análisis termogravimétricos de suspensiones de harina de trigo y

asociaron los componente de las masas de harina con los picos obtenidos por deconvolución de las curvas DTGA. El primer pico, cuyo máximo fue alrededor de 40 °C, fue atribuido al exceso de agua, es decir, el agua menos ligada y que evapora más fácilmente. Estos mismos autores relacionaron dos picos, uno con centro a ~60 °C y el segundo con centro a ~70 °C, con el agua ligada al almidón. En el presente trabajo se encontró un sólo pico a 65 °C que por analogía se relacionó con el agua retenida por el almidón. Es posible que este pico sea el producto del solapamiento de dos picos.

En estudios previos realizados, con masas formadas a partir de harina de trigo y agua (Fessas y Schiraldi 2001, 2005 y Roozendaal et al. 2012), se encontró que el agua que se evapora a mayores temperaturas se relaciona con las proteínas de la masa.

En las Figuras 2 y 3, se puede observar que el tercer y cuarto pico, se solapan en gran medida, por lo que ambos picos se atribuyen al agua ligada a las proteínas de las masas. El pico 3 se relaciona al agua mas libre, mientras que el pico 4 se debe a agua más ligada a las proteínas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Roozendaal et al. (2012), que encontraron estos dos picos alrededor de 80-85 °C y 90-95 °C.

Es notorio que la incorporación de inulina produce un incremento en el primer pico, atribuido al agua menos ligada, en detrimento de los picos relacionados a las proteínas. Además RSII produjo una redistribución del agua relacionada a las proteínas, donde el máximo nivel de incorporación mostró un aumento de casi el 70% en el área del tercer pico y una disminución de más del 80% del cuatro pico, con respecto a la curva control (resultados no mostrados). La fibra de avena mostró el

efecto contrario a RSII, ya que disminuyó el área del tercer pico y un aumento del cuarto.

Los termogramas obtenidos por DCS mostraron un pico endotérmico alrededor de 47 °C, que corresponde a la fusión de la materia grasa de la masa, y un segundo pico más pequeño alrededor de 65 °C, que se relaciona con la gelatinización parcial del almidón (Figura 4). Para conocer la composición de los termogramas, se deconvolucionaron las curvas y se encontró que cada uno de los picos encontrados está compuesto por dos picos solapados.

Para corroborar que el primer pico endotérmico corresponde a la fusión de grasa, se realizó una corrida con la grasa vegetal utilizada en la formulación de las galletitas y se observó el mismo fenómeno que en todas las muestras, con el centro del pico a 47,96 °C. Su deconvolución también mostró dos picos solapados, a las mismas temperaturas que las muestras.

A partir de la deconvolución de los termogramas se pudo observar que cuando se agrega fibra alimentaria a la formulación, la distribución de los dos picos atribuidos a la fusión de grasa cambia. Se produce un aumento en el área del segundo pico, en detrimento del primero. Este fenómeno se observa en todas las muestras y es más evidente en RSIV 12%. No se conoce el fenómeno por el cual se modifica este evento térmico, por lo que un mayor número de experiencias complementarias deben realizarse para una mayor comprensión del cambio.

Según estudios previos realizados en DSC, los últimos dos picos, corresponden a la gelatinización del almidón (Slade et al. 1996, Walker et al. 2012). La incorporación de fibra alimentaria en todas las muestras analizadas incrementó el área de pico, es decir la energía involucrada en esta transición térmica, y la temperatura a la que se produce. El mayor incremento se obtuvo para RSIV 12%, con un área de 40%, mientras que el área del control fue 4,05%. Las restantes muestras presentaron valores entre 8,54% en RSII 12% y 15,12% en IN 12%. Tanto RSII como RSIV son almidones que no presentan gelatinización en el rango de temperatura analizada (Ratnayake y Jackson 2008), por lo tanto, este incremento en el área sugiere que el agregado de fibras permite que una mayor proporción de agua esté disponible para la gelatinización del almidón presente en la harina de trigo.

Figura 4. Termogramas de DSC de masas control y con 12% de incorporación de fibras.

CONCLUSIONES

La incorporación de fibra de avena e inulina cambió sustancialmente el perfil de pérdida de agua de masas durante su calentamiento y disminuyeron la cantidad de agua eliminada durante el calentamiento. La deconvolución de la DTGA en cuatro picos aportó información sobre la distribución de agua en las masas. Los resultados sugieren que la inulina disminuyó la proporción de agua relacionada a las proteínas y aumentó la proporción de agua más libre. Los resultados de DSC mostraron todas las fibras incorporadas produjeron cambios en las curvas, sugiriendo que la incorporación de las fibras cambia la distribución de agua dentro de las masas, dejando más agua disponible para que gelatinice el almidón de la harina de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

- AACC International. 2001. Approved Methods of Analysis, 10th Ed. Method 32-05. Solo disponible online. AACC International: St. Paul, MN.
- Asp NG. 1994. Nutritional classification of food carbohydrates. *American Journal of Clinical Nutrition*. 59, 679-681.
- Blanco Canalis MS, Serial MR, Carpinella M, Acosta RH, León AE y Ribotta PD. 2013. Efecto de la incorporación de inulina y de fibra de avena sobre la movilidad del agua en la masa de galletitas dulces y su relación con las propiedades reológicas y con la calidad del producto final. In XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos). Rosario, Argentina.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M y Robledo CW. InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ y Cummings JH. 1999. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69:448-454.
- Fessas D y Schiraldil A. 2001. Water properties in wheat flour dough I: classical thermogravimetry approach. *Food Chemistry*, 72:237-244.
- Fessas D y Schiraldil A. 2005. Water properties in wheat flour dough II: classical and knudsen thermogravimetry approach. *Food Chemistry*, 90:61-68.
- Finney KF, Yamazaki WT y Morris VH. 1950. Effects of varying quantities of sugar, shortening, and ammonium

bicarbonate on the spreading and top grain of sugar-snap cookies. *Cereal Chemistry*, 27:30-41.

León AE, Rubiolo OJ y Añón MC. 1996. Use of triticale flours in cookies: quality factors. *Cereal Chemistry*, 73:779-784.

Maache-Rezzoug Z, Bouvier JM, Allaf K y Patras C. 1998. Effect of principal ingredients on rheological behaviour of biscuit dough and on quality of biscuits. *Journal of Food Engineering*, 35:23-42.

Manthey FA, Hareland GA y Huseby DJ. 1999. Soluble and insoluble dietary fiber content and composition in oat. *Cereal Chemistry*, 76:417-420.

Nugent AP. 2005. Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation. Nutritional Bulletin*, 30:27-54

Pak N. 2006. Inulina y fructoolisacaridos: Propiedades nutricionales y funcionales. En: *Carbohidratos en alimentos iberoamericanos*. Ed. Lajolo F.M. y Menezes E.W. Edusp- Editora da Universidade de Sao Paulo. Pp 337-356.

Ratnayake, W.S. y Jackson, D.S. 2008. Thermal Behavior of Resistant Starches RS 2, RS 3, and RS 4. *Journal of Food Science*, 73(5), 356-366.

Roozendaal H, Abu-hardan M y Frazier R. 2012. Thermogravimetric analysis of water release from wheat flour and wheat bran suspensions. *Journal of food engineering*, 111:606-611

Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. 2006. Resistant Starch. A review. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, 5:1-17.

Slade L, Levine H, Wang M y Levoella J. 1996. DSC analysis of starch thermal properties related to functionality in low-moisture baked goods. *Journal of Thermal Analysis*, 47(5):1299-1314.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Técnica (CONICET), Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECYT) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Fondo para la Investigación, Ciencia y Tecnología (FONCyT) y Ministerio de Ciencia y Tecnología.

DEVELOPMENT OF MARINADE WITH SPENT LAYING HEN MEAT

Cartabiano, C.E.L.¹, Fiorelli R.B.¹, Webber C.I.¹, Marchi J. F.¹

1: UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Francisco Beltrão, Brasil.
eduardo.cartabiano@hotmail.com

Abstract: The objective of this work was to develop a marinade with high yield and water holding capacity (WHC) from spent laying hen meat. Thirty-two breasts from spent hens (96 weeks ols) were used. The Simplex-Centroid design was used, with addition of at maximum 2% for each variable: carrageenan, phosphate and ibrateína, generating 7 formulations and one repetition at midpoint. The samples were subjected to marination by tumbling process with 20% of marinated. Evaluated parameters were: pH, yield and drip loss (DL), for estimating the water holding capacity (WHC) of the final product after cooling (12hs/4°C) and freezing (15days/-18°C). Microbiological analyzes were also made for Coliforms Thermotolerant (45°C). Samples marinated with 0.66% carrageenan, 0.66% phosphate and 0.67% ibrateína (P8), and 2% ibrateína (P3), showed the best pH values, 5.82 and 5.72. Samples with 1% carrageenan and 1% ibrateína (P5) and 1% phosphate and 1% ibrateína (P6) showed 19.17% of yield gain. In DL analysis of cooled product the lowest values obtained were 2.39% (P3) and 2.64% (P8), while in the frozen product, the lowest values were 2,70% (P3) and 3,63% (P7). Microbiological analyzes showed values in accordance with the law ($<1 \times 10^4$ UFC).

Marinade with spent laying hen showed yield gain and good water holding capacity to final product.

Keywords: marinated, laying hen, tumbling.

Resumen: El objetivo de este trabajo fue desarrollar un marinado con alto rendimiento y capacidad de retención de agua (WHC) a partir de carne de gallina ponedora de descarte. Se utilizó como muestra 32 pechugas de gallinas ponedoras de descarte con 96 semanas de edad. Se utilizó un diseño estadístico Simplex-Centróide, con adición máxima de 2% para cada variable: carragenina, fosfato e ibrateína originando 7 formulaciones con una repetición al punto central. Muestras de pechuga refrigeradas fueron sometidas en el proceso de marinação con amasamiento y adición de 20% del marinado. Los parámetros evaluados fueron: pH, rendimiento y pérdidas por goteo (DL), para estimar la capacidad de retención del agua (WHC) del producto final refrigerado (4°C/12h) y congelado (-18°C/15días). Se realizó también el recuento de Coliformes Termotolerantes (45°C). Muestras marinadas con 0,66% carragenina, 0,66% fosfato y 0,67% ibrateína (P8) y con 2% ibrateína (P3), muestran los mejores valores de pH con 5,82 y 5,72. Muestras con 1% carragenina y 1% ibrateína (P5), y con 1% fosfato y 1% ibrateína (P6) muestran mejor rendimiento con 19,17% de absorción. Para análisis DL del producto refrigerado, los menores valores obtenidos fueron 2,39% (P3) y 2,64% (P8), y para muestras congeladas los menores valores fueron 2,70% (P3) y 3,63% (P7). Análisis microbiológicos muestran valores de acuerdo con lo establecido por la ley ($<1 \times 10^4$ UFC). El marinado para la carne de gallinas ponedoras de descarte contribuyó para un incremento

del rendimiento y aumento de la retención de agua del producto final.

Palabras clave: marinado, gallina de descarte, amasadora de carne.

INTRODUCTION

Brazil currently ranks first in world chicken meat exports and third in poultry production with breeding broiler farms and has a foundation enabling the conversion of proteins from animal source into nutrients properly balanced (Ubabef 2013, Olivo 2006). The conquest of foreign markets is a proof of the sanitary quality of our flocks which allowed to avoid problems that affected production in the rest of the world. On the other hand, the significant increase of the Brazilian population in recent years has stimulated domestic consumption of the product (Junior 2013).

Argentina is our commercial neighbor and appears in 8th in world poultry production with slaughtering around 733.697.372/ton/per year, wherein between January and October 2013 chicken meat exports were 314.372/ton (Cepa 2014). These data show that production of chicken meat provide Argentine internal market which owns a consumption of 38,1Kg by person, and the industry has forecasted and increased in production and greater investments in the coming years (Cepa 2014).

But the production of chickens is derived from the use of broiler breeders, which concentrate their characteristics in the production of commercial chicken meat. Broiler breeders are large birds, weighing between 3.0 and 4.0kg, with plenty of meat on the chest and thighs, but they have great deposition of both subcutaneous and abdominal fat (Nunes 2003). However, after about 86 weeks of age, these birds become available for slaughter at the end of its production cycle and are discarded as by-product or marketed by the poultry industry.

Note that this spent laying hen, despite having very similar nutritional values to commercial chicken meat, have reduced value because the meat that comes from older animals does not meet the sensory characteristics of consumer.

Marinate process by tumbling search to confer improvements in sensory terms of meat for the growing consumer demand looking for products that have unique characteristics, ensuring safety and practicality in their use, which leads the industries to diversify their open cases and increase their investments (Deliberali *et al.* 2010).

Marinated brine are intended for meat to confer improvements in terms of flavor, texture and increase the shelf life of the product and can be applied by injection, tumbling or immersion process and always need inspecting the quality of the treatment applied since it reflects in the characteristics of the final product (Olivo 2006).

Water Holding Capacity (WHC) is a quality parameter in meat and meat products, and can be defined as the capacity of holding water by the muscle (Roça 2012). WHC can be estimated by parameters like pH, yield and water loss by exudation (drip loss during storage) and are related to quality of meat products (Roça 2012, Xargayó *et al.* 2007).

The pH has influence on receptor sites of the muscle fiber, so a higher pH increases electric charges in meat and it can contribute to improve chemical interaction between the marinated meat components (Xargayó *et al.* 2007).

The WHC in meat is an important economic factor from an industrial point of view, because it determines the efficiency in processing, since a low WHC in the product

leads to loss of water and nutrients due to exudation (Ramos 2007).

Components added to marinade have as their main purpose increasing water retention in the meat, ensuring the fixation of flavors and aromas enhancing the juiciness and texture of meat (Xargayó *et al.* 2007). Thus, the objective of this work was to develop a marinade with high yield and WHC from spent laying hen meat.

MATERIAL AND METHODS

Samples

We used 32 chest samples of spent laying hen with approximately 96 weeks of life, received by a certified slaughterhouse, located in the city of Francisco Beltrão, state of Paraná-Brazil, and transported under refrigerator temperature (4°C) to Laboratory of Meat and Derivatives from UTFPR - Universidade Federal Tecnológica do Paraná, campus Francisco Beltrão.

Marinade ingredients used like variables were: Carrageenan (from Bremil Industria de Produtos Alimentícios LTDA); Ibratéia e Condiment for Chicken CLT - MasterIII-A (from IBRAC Indústria de Aditivos e Condimentos Ltda).

Formulation and marination process

Formulation samples were prepared using a statistical design Simplex-Centroid, supported by Statistica 7.0 software (Statsoft 2004). So, 8 formulations were generated, with three variables and one repetition at the center point. The formulation are shown in Table 1.

Table 1 – Preparation of marinated samples

Sample	Initial weight (W.i) (g)	Marinade composition (%)					Marinade (ml)	Final weight (W.f) (g)
		Condiment	Water	Carrageenan	Phosphate	Ibratéia		
P1	532,60	15	83	2			106,52	591,00
P2	475,32	15	83		2		95,06	538,90
P3	506,80	15	83			2	101,36	574,08
P4	465,10	15	83	1	1		93,02	538,25
P5	441,50	15	83	1		1	13,245	526,12
P6	476,48	15	83		1	1	95,29	537,43
P7	495,61	15	83	0,67	0,67	0,68	99,13	561,53
P8	452,06	15	83	0,67	0,67	0,68	90,41	531,54

The marination process of the samples involved the following steps:

Sample preparation: cooled meat samples ($\pm 4^\circ\text{C}$) were weighed on an analytical balance and the pH was measured using the pH meter;

Marinade preparation: the compounds were weighed and dissolved in distilled water and then homogenized with a blender;

Tumbling: each sample was mixed under vacuum by tumbling equipment for 44 minutes, at 10 rpm for effective marination;

Cooling and Storage: after the tumbling process, some marinade samples were quickly stored under refrigeration at 4°C for 12 hours and others frozen at -18°C by 15 days. The marinade production room was at a constant temperature of 10°C. The preparation and weighed samples stayed were kept between 4°C and 6°C, but vacuum tumbling process was not carried out at a specific temperature because the equipment has not a temperature control.

Determinations

Microbiological analyzes were performed at Laboratory CDA Ltda, located in Francisco Beltrão (Brasil). Three frozen marinade samples with 15 days were sent to analysis. The samples were analyzed for Thermotolerant coliforms by the method of Plate 3MPetrifilm (3MPetrifilm 2013).

The pH analysis was carried out with 10 g crushed samples and water was added (90 ml), followed by stirring. The pH meter was calibrated with buffer pH solutions 4 and 7 (Cecchi 2007). It was measured the pH of fresh beef and post-marinade.

The yield was calculated to determine the percentage absorption of marinade in spent laying hen meat samples cooled and frozen (Cecchi 2007). The calculation made is shown below:

$$\%Yield = W.f - W.i \times 100(\%) \quad (1)$$

As:

%Yield = yield percentage

W.f = Final weight

W.i = Initial weight

The procedure to analyze Drip Loss (DL) by gravimetric method is described by Honikel (1998). Cut up a piece of each sample in uniform quadratic format with weight 80g and then put in small plastic net, wrapped in plastic bags. All sets were stored refrigerated at 4°C by 48 hours. After storage time, samples were weighed again and calculated the DL, as follows:

$$\%DL = \frac{W.i - W.f}{W.i} \times 100(\%) \quad (2)$$

Where:

%DL = Drip loss percentage;

W.f = Final weight;

W.i = Initial weight.

All data collected during the study were subjected to statistical analysis using the software Statística 7.0 (Statsoft 2004). To detect differences between treatments the Tukey test was used with 95% of confiability ($p \leq 0,05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Microbiological Analysis

In Brazil, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) determined in a law (resolution RDC number 12 of January 02nd 2001), that microbiological tests are required according to the type of product, as well as the maximum permissible values for the microbiological load in commodities (Brasil 2001). Three samples were

microbiologically analyzed according the law and all had satisfactory results for coliforms thermotolerant, as shown in Table 2.

Table 2: Microbiological values for marinated samples after storage (15days/-18°C)

Samples	UFC/g
P3	$< 1 \times 10^1$
P5	$< 1 \times 10^1$
P8	3×10^1
RDC 12, 1/02/2001*	1×10^4

*Reference: Brasil 2001.

The low count of thermotolerant coliforms in the samples indicate an efficient manufacturing practice during slaughter, production and storage with efficient hygienic-sanitary conditions (Olivo 2006).

During the slaughter of spent laying hen, a post-evisceration shower with chlorinated water 2ppm was used, associated with pre-cooling immediately after slaughter in chlorinated water 4°C. These treatments possibly assist to a reduction of surface contamination of carcasses, however a strict sanitary control should be done at all production stages in order to avoid other microbiological contamination and ensure the quality of the final product (Allen *et al.* 2002, Bolder 1997).

The fact that the samples were frozen (-18°C) can decrease water availability and microbiological growing, mainly mesophilic and thermophilic microorganisms (Franco 2005).

The values for pH, temperature and yield of samples are shown in Table 3.

Table 3: Average values of pH, temperature and yield of samples

Sample	pH		Temperature (°C)	Yield (%)
	raw	marinated		
1	4,98±0,03	5,61±0,07	4,5	10,97
P2	5,43±0,10	5,50±0,03	4,9	13,38
P3	5,59±0,09	5,72±0,04	5,2	13,27
P4	5,50±0,10	5,51±0,03	4,1	15,73
P5	5,51±0,05	5,66±0,11	4,5	19,17
P6	5,60±0,05	5,65±0,04	4,6	19,17
P7	5,59±0,06	5,66±0,08	4,8	13,30
P8	5,59±0,03	5,82±0,09	5,0	17,58

For pH variable, P8 and P3 samples showed the best results, being 5,82 and 5,72 respectively.

The pH range was directly influenced by the addition of different compounds in marinade, and at this study, ibrateína demonstrate to contribute pH increase.

With greater interaction between the marinated compounds and receptor sites of the muscle fiber it is possible to increase meat water holding capacity, and the pH has a primary role in the electrical charges of the myofibril directly affecting the marinade retention in final product (Borges *et al.* 2012, Gerhardt 2010). Figure 1 illustrates the response surface generated by the statistical analysis of pH variable.

Figure 1: Surface response of quadratic model for pH

Response surface indicates that the ibratéina has positively influenced to pH, followed by carrageenan and phosphate. Formulations with 0.66% carrageenan, 0.66% phosphate and 0.67% ibratéina (P7 or P8) showed good pH in final product with values of 5.66 e 5.82 respectively.

In the yield analysis, samples P5 and P6 showed better weight gain with 19.17% for both formulations.

Statistical model was not significant because it showed values $p=0.40$. Samples did not differ among themselves, however, compounds phosphate ($p=0.024$) and ibratéina ($p=0.025$) has significant influence on product yield. Figure 2 illustrates the response surface in the yield.

Figure 2: Surface response of cubic special model for yield

Yield gain in the product indicates the marinade holding capacity by the muscle fiber. Another study with breast chicken with brine marinade describes yield values in order of 8.62% and 8.60% (Porto 2000). These values are below those found in the present study, however, the formulations have different compounds, which could affect the chemical interaction between the marinade and muscle fiber, influencing the yield.

To explain this, other authors relate the importance of using hydrocolloids in the marinade to increase retention and yield of meat that will subjected to marination process (Xargayó *et al.* 2007, Silva 2013).

As for DL analysis, samples P3 and P8 had the lowest (and best) rates of loss with 2.39% (P3) and 2.64% (P8).

The statistical model showed a value $p=0.15$ and had no effect between formulations. The drip loss was influenced by each one of different variable compounds, but Carrageenan showed a better influence, lowering water loss in final product. Figure 3 illustrates the response surface generated for DL analysis.

Figure 3: Surface response of quadratic model for drip test

Previous research (Novello 2009) evaluated WHC in chicken breast marinated with calcium chloride and sodium chloride and has noted that formulations with calcium chloride, independent of concentration, showed higher values of WHC than those injected with sodium chloride.

The use of NaCl is directly related to the effective marinade absorption by muscle fiber, but researches appoints new alternatives that reduce the use of salt in meat products, mainly sodium chloride, without affecting the sensory characteristics of product (Rocha-García 2013).

In drip loss analysis of frozen samples, formulations with 2% ibratéina (P3) and 0.66% carrageenan, 0,66% of phosphate and 0.67% of ibratéina (P7) presented the lowest rates of water loss with 2.70% and 3.63% respectively.

The statistical special cubic model was significant with value $p=0.02$. The model presented influence between treatments, and the interaction with compounds carrageenan, phosphate and ibratéina showed better influence to the WHC of product.

Figure 4 illustrates the response surface generated for DL of frozen samples.

Figure 4: Surface response of cubic special model for yield.

The process of freezing meat directly affects the components dissolved therein, changing the chemical interactions of the system, and generates a differential gradient concentration between water and compounds, influencing meat exudation.

Fluctuations in temperature throughout the storage period can cause recrystallization of water, creating ice crystals between the fibrous structures of the muscle, causing damage to myofibrillar protein. The freezing process of marinated meat should be fast and efficient to prevent recrystallization during the period of storage ensuring high quality in meat (Olivo 2006).

In other research (Assis 2010), authors analyzing marinade retention in samples of chicken breast that received marinade prepared with soy protein isolate, salt and sodium tripoliphosphate, described moisture values of 77.15% on treatment with 5% of tripoliphosphate and 77.34% with 8% isolated soy protein, demonstrating what these compounds have better results in WHC when used separately.

The use of hydrocolloids is a good alternative to improve WHC in marinade meat and the application in marinade formulation for chicken meat presents a series of technological benefits, directly contributing to better palatability of the product (Xargayó *et al.* 2007, Pietrasik 2003).

Other authors (Giampietro *et al.* 2011), have researched different kinds of meat chicken marinated with industrial

condiment Globalfood (Advanced Food Technology®) injected in the proportion of 15% the weight of the sample and stored by 30 days in -15°C, showed values of WHC in order between 66.49% and 68.18%. These data are consistent with the values obtained during this research, pointing out to the use of hydrocolloids in the junction polyphosphate and salt to increase WHC in meat.

CONCLUSION

The combination of the compounds showed better effect. Marinade sample with 0.66% carrageenan, 0.66% phosphate and 0.67% ibrateína proved to be the best. Marination process for spent laying hen meat was effective in obtaining a new product giving a high yield and good water holding capacity, and also adding commercial value in a meat considered byproduct.

REFERENCES

- 3Mtm Petrifilm™. 2013. Placa para contagem de E. coli e Coliformes: guia de interpretação. Microbiologia 3M do Brasil Ltda.
- Allen VM, Corry JE, Burton CH, Whyte RT, & Mead GC. 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology*, 58:39-48.
- Assis MTQM, Damian C, Magenis RB, Taha P, Rotta J, Gauche C. 2010. Avaliação físico-química de filés de peito de frango adicionados de sal, tripolifosfato de sódio e proteína isolada de soja. *Revista Alimentos e Nutrição*, 21:129-139.
- Bolder NM. 1997. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, 8.7:221-227.
- Brasil Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Anitária (ANVISA).
- Borges EM, Goraieb K, Collins CH. 2012. O desafio de analisar solutos básicos por cromatografia líquida em modo reverso: algumas alternativas para melhorar as separações. *Revista Quimica Nova*, 35:993-1003.
- Centro de Empresas Processadoras Avícolas–CEPA. 2014. Estatísticas.
- Cecchi HM. 2007. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Editora da Unicamp, 2:207.
- Deliberali EA, Viana G, Statudo JR, Rinaldi RN. 2010. Exportações e

habilitações da carne de frango ao mercado internacional: um estudo da mesorregião oeste do estado do paraná. *Informa es Econ micas*, 40:18-30.

Franco BDGM. 2005. *Microbiologia dos alimentos*. Editora Atheneu.

Gerhardt, C. 2010. Estudo da redu o do teor de sódio e absor o de salmoura em filés de frango marinados. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Giampietro-Ganeco A, Borba H, Scatolini-Silva AM, Bioago MM, Souza PA,

Honikel KO. 1998. Reference methods supported for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 19:447-457.

Lima TMA. 2011. Determina o das qualidades físicas e sensoriais da carne de matrizes de descarte de frangos corte. *Archivos de Zootecnia*, 60:717-724.

Novello D, Marques A, Toneto ERI, & Pollonio MAR. 2009. Atributos de qualidade funcional de peito de frango injetado com cloreto de sódio e cálcio. *Revista Alimentos e Nutri o*, 20:403-410.

Nunes TP. 2003. Efeito da pr -cura na estabilidade microbiológica de carne mecanicamente separada e elabora o de carne mecanicamente separada e elabora o de um produto reestruturado com filés de peito de galinhas de descarte. Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutri o, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Olivo R. 2006. *O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango*. Editora e Livraria Varela.

Pietrasik Z. 2003. Binding and textural proprieties of beef gels processed with k-carrageenan, egg albumin and microbial transglutaminase. *Meat Science*, 63:317-324.

Porto ACS, T rres RCO, Ilha EC, Luiz MTB, Sant'anna ES. 2000. Influência da composi o da salmoura sobre os

par metros físico-sensoriais e microbiológicos de filés de peito de frango marinados por imersão. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 18:141-150.

Rocha-Garcia CE, Youssef EY, Souza NE, Matsuchita M, Figueiredo E, Shimokomaki M. 2003. Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. *Journal Applied Poultry Research*, 12:335-340.

Roça RO. 2012. Propriedades da carne. Unesp-Universidade Estadual de São Paulo, Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, 1-11.

Ramos EM, Gomide IAM. 2007. Qualidade de carnes: fundamentos e metodologias. UFV-Universidade Federal de Viçosa, Editora da Universidade Federal de Viçosa.

Ubabef-União Brasileira de Avicultura. 2012. *Relatório anual 2012*.

Silva GP, Drasczeswsky A, Palezi SC. 2013. Utiliza o de diferentes hidrocolóides para melhorar a qualidade sensorial de produtos c rneos. *Unoesc & Ciência*, 5:213-218.

Statsoft Inc. 2004. *Statistica: data analysis software system version 7.0*.

Xargayó M, Lagares J, Fernández E, Borrel D, Junc  G. 2007. Spray marinating: a definitive solution for improving meat texture. *Metalquimia S/A, Technology Department - Espanha*, 182-190.

CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE VINOS **TINTOS REGIONALES**

**Di Carlo BM⁽¹⁾, Pérez, NP⁽¹⁾, Gómez de Díaz R⁽¹⁾,
Salomón R⁽²⁾, Moyano F⁽¹⁾, Peñaranda SS⁽¹⁾, Zerpa
G⁽¹⁾, Rabus P⁽¹⁾, Buttazzoni R⁽¹⁾**

1. Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Argentina

2. Facultad de Ingeniería, Argentina.

bertadcar@yahoo.com.ar

Resumen: Se realizó el estudio microbiológico de vinos tintos de los Valles Calchaquíes, Salta, Argentina, para evaluar su calidad higiénica. Se determinaron bacterias coliformes, acéticas, lácticas, hongos y levaduras. Se analizaron las variedades *Malbec*, *Tannat*, *Cabernet Sauvignon* y *Syrah*, según técnicas de ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). El recuento total se determinó con medio de cultivo APC (Agar Plate Count), hongos y levaduras con Agar Saboraud al 4% de glucosa y coliformes con medio VRBL (Violeta Rojo y Bilis Lactosa Glucosa Agar). El recuento de bacterias acéticas con el medio de Frateurs con 2 mL de nistatina 1mg/mL y 0,3 mL de penicilina 250.000 UI por placa, para inhibir crecimiento de hongos y bacterias lácticas en agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe). Los resultados no superaron los valores permitidos de 500 UFC/mL de recuento total para bebidas hídricas y aguas exigidas por el CAA (Código Alimentario Argentino), con valores máximos de 0,02 UFC/mL para el varietal *Cabernet Sauvignon*; 0,01 UFC/mL para *Malbec*, *Syrah* y 0,001

UFC/ml para *Tannat*, siendo negativos los recuentos de bacterias coliformes. Se concluye que existe buena calidad microbiológica en los vinos que indican aplicación de buenas prácticas de manufactura.

Palabras claves: vinos tintos, calidad microbiológica, Valles Calchaquíes.

Abstract: We studied the microbiological characteristic of regional red wines of the Calchaquíes Valleys of Salta in Argentina for evaluate the hygienic quality. We identified coliform, acetic and lactic bacteria; fungi and yeast. We analyzed regional red wines, varieties *Malbec*, *Tannat*, *Cabernet Sauvignon* and *Syrah*, following techniques of ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). The total plate aerobic count whit APC medium (Agar Plate Count), fungi and yeasts whit Saboraud Agar with 4% glucose and coliform bacteria with VRBL medium (Violet Red Bile Lactose and Glucose Agar). Acetic bacteria count with Frateurs medium with 2 mL of 0.3 mL nystatin 1mg/mL and 250,000 IU of penicillin per plate and lactic acid bacteria with MRS agar (de Man , Rogosa and Sharpe).The results did not exceed the allowed values of 500 CFU / mL total count for drinks and water required by the CAA (Argentine Food Code), with maximum counts of 0.02 CFU / mL for *Cabernet Sauvignon* variety wine, 0,01 CFU/mL for *Malbec*, *Syrah* and 0,001 CFU/mL for *Tannat* being negative the coliform bacteria count.We conclude

that microbiological quality is good in the regional red wines with application of good manufacturing practice.

Keywords: red wines, microbiological quality, Calchaquies Valley.

INTRODUCCIÓN

En la región vitivinícola noroeste de Argentina se encuentran los Valles Calchaquíes, en la provincia de Salta, con características propias, con un clima, suelo y nivel de altura que favorecen el cultivo de una amplia variedad de estilos de vinos, por ello es de importante estudiar las características microbiológicas de los vinos tintos regionales.

La participación de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con diferentes características enológicas en el curso de la fermentación espontánea del mosto está condicionada por la localización geográfica (Guillamón et al., 1996), la campaña estudiada (Van der Whestuizen et al., 2000) y la tecnología de vinificación empleada (Arroyo et al., 1998; Constantí et al., 1998; Torija et al., 2003).

La microflora de las levaduras de la uva es muy compleja, existe diversidad de especies, algunas útiles para la vinificación mezcladas con aquellas que producen enfermedades del vino, como *Candida mycoderma*, *Pichia*, *Brettanomyces*, etc; que son resistentes al alcohol, al anhídrido sulfuroso, a la ausencia del aire y permanecen en el vino durante meses. Por acción de éstos microorganismos dañinos se producen alteraciones en los vinos presentándose enturbiamientos, color, sabor y olor anormal que imposibilita su posterior comercialización (Suarez Lepe e Iñigo Leal, 1992).

Las cepas presentes durante el proceso fermentativo inciden directamente tanto en el correcto desarrollo y acabado de la fermentación, como en las características organolépticas del vino obtenido (Regodón et al., 1997; Eglí et al., 1998; Lambrechts & Pretorius, 2000; Jolly et al., 2003; Granchi et al., 2003). La popularización del uso

de levaduras comerciales (LSA) y los numerosos estudios de selección de levaduras autóctonas que buscan afianzar la tipicidad de los vinos de las diferentes regiones y bodegas, demuestran asimismo, la importancia de la cepa elegida para desarrollar la fermentación.

En los vinos tintos la fermentación maloláctica es el proceso por el cual el ácido málico, se transforma en ácido láctico y dióxido de carbono por medio de bacterias lácticas; pero también tiene productos secundarios siendo el principal el diacetilo responsable del aroma a manteca. Otros productos de la fermentación maloláctica son el propionato, butirato y lactato de etilo. La mezcla de estos compuestos "refinan" el aroma del vino (Peynaud, 1996).

Es importante que se lleve a cabo en tiempo y forma la fermentación maloláctica, ya que el ácido málico es muy agresivo para el gusto del vino, en cambio el ácido láctico lo suaviza, mejorando la calidad del vino con un bouquet agradable. El ácido málico da una sensación de verdor del vino, de dureza en los vinos que provienen de una vendimia no bastante madura. Este ácido sumado a los taninos refuerzan las impresiones de acidez, por tal razón se busca la degradación de éste ácido por la acción fermentativa de las bacterias lácticas del género *Leuconostoc* y las especies del género *Lactobacillus*.

Es fundamental vigilar ésta fermentación en los vinos tintos, porque a menudo se producen paradas fermentativas y a veces pueden pasar semanas para iniciarse luego de terminar la fermentación alcohólica, se debe tratar de acortar este período crítico haciendo más favorables las condiciones como manejar el pH, la temperatura, la aireación que debe ser reducida y el contenido de anhídrido sulfuroso que debe ser el mínimo posible dado que afectan a las bacterias lácticas

responsables de la fermentación que convertirá el ácido málico en ácido láctico.

Además, en el proceso de elaboración y envasado de los vinos se individualiza como peligro de contaminación, el crecimiento de bacterias acéticas, géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, dado que originan productos como el ácido acético y el acetato de etilo, que generan gustos toscos y mal sabor al vino por aumento de la acidez volátil.

El objetivo de éste trabajo es estudiar la microflora presente en vinos tintos producidos por bodegas de los Valles Calchaquíes, variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, con la finalidad de determinar las condiciones de envasado y conservación de los vinos, que esta relacionado con la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura.

Materiales y Métodos

Se analizaron 18 muestras compradas en el mercado local, variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, provenientes de las bodegas de la región vitivinícola de los Valles Calchaquíes, Salta.

El análisis microbiológico se realizó con técnicas de la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1991). El recuento total se efectuó mediante la utilización del medio de cultivo APC (Agar Plate Count), incubación a 32 °C por 48 horas, el recuento de hongos y levaduras con Agar Saboraud al 4% de glucosa incubando a 25 °C por 48 horas.

La cuantificación de bacterias coliformes totales y fecales, con medio VRBL (Violeta Rojo y Bilis Lactosa Glucosa

Agar), incubándose por 24 horas a 37 °C para coliformes totales y a 42,5 °C para fecales.

El recuento de bacterias acéticas se realizó con el medio de Frateurs (Manual Bergey, 1984) con 2 mL de nistatina 1mg/mL y 0,3 mL de penicilina 250.000 UI por placa, para inhibir crecimiento de hongos y bacterias lácticas en agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) incubando a 37 °C por 5 días (Fleet *et al*, 1984).

En el análisis estadístico se aplicó el análisis de la varianza a los resultados y el test de Tukey para comparar medias y análisis de componentes principales mediante el programa estadístico InfoStat (2008).

Resultados y Discusión

Los resultados promedios microbiológicos no superaron los valores permitidos de 500 UFC/mL de recuento total para bebidas hídricas y aguas exigidas por el CAA (Código Alimentario Argentino), con valores promedios de 0,02 UFC/mL para el varietal *Cabernet Sauvignon*, 0,01 UFC/mL para *Malbec*, *Syrah* y 0,001 UFC/ml para *Tannat*, como se puede observar en la figura 1.

Figura 1. Recuento Total de vinos tintos regionales

El envasado de los vinos en las bodegas de los Valles Calchaquíes se realiza generalmente en botellas y damajuanas en instalaciones automatizadas que lavan el envase, embotellan, taponan, capsulan y etiquetan. Para evitar posibles contaminaciones microbiológicas el último punto crítico de control del proceso de

vinificación es la etapa del envasado, siendo por ello de especial importancia su control para evitar posibles riesgos de contaminación final del producto. Es necesario el perfecto lavado y desinfección de las botellas y damajuanas.

Los ciclos de lavado comprenden:

- * Enjuague con agua de las botellas.
- * Lavado con solución de soda cáustica al 2 % en caliente.
- * Enjuague con agua a 70°C.
- * Enjuague con agua a temperatura ambiente de 15-20°C.

En la operación de llenado se inspeccionan visualmente las botellas vacías y llenas, las taponadoras, capsuladores y etiquetadoras. Además de éste control es necesario verificar que la concentración de solución de sosa usada en la limpieza sea la correcta para asegurar la desinfección de los envases.

La monitorización visual resulta adecuada durante el envasado, además del control de concentración de la solución de sosa del agua de lavado de los envases, que debe ser menor al 0,2 % para evitar riesgos de contaminación química en el producto final.

El análisis microbiológico tiene un valor limitado para la comprobación de los puntos críticos de control microbiológico, ya que el tiempo preciso para obtener resultados resulta crítico para el proceso de elaboración, si bien durante la etapa fermentativa es útil la confirmación microscópica de la presencia de las levaduras vínicas en actividad.

El monitoreo o vigilancia de éstos puntos críticos de control se realiza a través de gráficos de control, éstos permiten el seguimiento de la vinificación y detectar cualquier desviación de la especificación, de este modo se pueden establecer acciones correctoras para volver a

controlar el proceso antes de que sea necesario rechazar el producto.

Fueron negativos los recuentos de bacterias coliformes totales y fecales, también para las bacterias acéticas, lo que indica un control higiénico en el proceso de lavado de las botellas y posterior envasado de los vinos tintos y aplicación de buenas prácticas de manufactura o fabricación (BPFs) (ICMSF,1991) ó good manufacturing practices (GMPs), las que deben aplicarse en todas las operaciones de higiene de equipos de la bodega, con a finalidad de minimizar los peligros de contaminación con microorganismos dañinos.

Con respecto a las bacterias acéticas su presencia en los vinos produce la picadura acética que produce ácido acético además de una ligera esterificación de éste ácido, de éste modo el acetato de etilo formado contribuye a caracterizar la degustación de éstos vinos; por otro lado los demás componentes del vino no se ven afectados.

En cuanto al análisis de hongos y levaduras con Agar Saboraud al 4% de glucosa, los recuentos presentaron un máximo de 0,4 UFC/mL para el varietal *Cabernet Sauvignon*, como se puede observar en la figura 2, que analizadas las colonias sólo se encontraron hongos, no así la presencia de levaduras, con lo que se descartó la existencia de levaduras dañinas como las de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Brettanomyces* como *Candida mycoderma* que producen enturbiamientos, color, sabor y olor anormal que imposibilita su posterior comercialización (Suarez Lepe e Iñigo Leal, 1992).

Figura 2. Recuento de hongos y levaduras

Respecto al recuento de las bacterias lácticas, sólo se encontró remanentes en los vinos tintos de uvas variedad *Cabernet Sauvignon*, en cantidades de 0,2UFC/ml, la que no representa un riesgo de alteración de la calidad final de los vinos.

Las bacterias lácticas en el vino elaborado pueden producir alteraciones en el vino, tales como la picadura láctica que se manifiesta en la formación de ácido láctico y ácido acético, otra alteración es la tourne que es la descomposición del ácido tartárico con formación de ácido acético, de gas carbónico y disminución de la acidez del vino, con las consecuencias de turbidez, ennegrecimiento, amarronamiento al aire y gusto soso. Estas bacterias atacan las pentosas infermentescibles por la levadura alcohólica reduciendo a casi cero los azúcares reductores (Ribéreau-Gayon et al, 2006).

Con el objeto de analizar la variabilidad en los resultados microbiológicos, se realizó un Análisis de Componentes principales, del cual se encuentra que los dos primeros componentes del análisis multivariante, explican el 100% de la variabilidad en los resultados, según se muestra en la figura 3.

Figura 3. Análisis multivariado de los vinos regionales

En el gráfico se observa que la componente 1 participa con el 73,4 % y la componente 2 con el 26,6 %, también se determina la asociación de los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* con los mayores recuentos totales y de hongos y levaduras indicando mayor contaminación microbiológica en estos varietales.

Los valores de autovectores e_1 y e_2 , fueron de 0,71 y -0,71 para el recuento total, 0,71 y 0,71 para hongos y levaduras, respectivamente. Esto representa mayor

contaminación microbiológica debida a la presencia de mohos, dado que no se encontraron levaduras dañinas.

Finalmente, se observa que los varietales *Syrah* y *Tannat*, presentan la menor contaminación en los vinos terminados, indicando un mejor proceso higiénico en el envasado y la aplicación de buenas prácticas de manufactura, fundamentales para una futura certificación de calidad en el producto terminado.

Se señala la importancia del monitoreo como puntos crítico de control de la etapa de envasado mediante gráficos de control, a fin de detectar cualquier posible riesgo de contaminación del vino terminado, pudiendo establecer acciones correctoras controlar el proceso antes de que sea necesario rechazar el producto. Se destaca en este estudio microbiológico, que a pesar de la contaminación encontrada, son cantidades que no superan los valores máximos exigidos por el Código Alimentario Argentino para bebidas, por lo que los vinos regionales presentan buena calidad final microbiológica para su comercialización.

CONCLUSIONES

Se concluye que existe buena calidad microbiológica en los vinos, que indican aplicación de buenas prácticas de manufactura, dado que los recuentos totales no superaron los valores permitidos de 500 UFC/mL para bebidas hídricas y aguas exigidas por el CAA (Código Alimentario Argentino), con valores máximos de 0,02 UFC/mL para el varietal *Cabernet Sauvignon*, 0,01 UFC/mL para *Malbec*, *Syrah* y 0,001 UFC/ml para *Tannat*, siendo negativos los recuentos de bacterias coliformes y acéticas.

Respecto al recuento de hongos y levaduras, se registraron valores máximos de 0,4 UFC/ml para el varietal *Cabernet Sauvignon*, con la presencia de hongos y no de levaduras dañinas que puedan alterar el vino terminado. Las bacterias lácticas, también se determinaron en éste varietal en cantidades de 0,2 UFC/ML que no representa un riesgo de alteración para el producto vitivinícola. De estos resultados, se puede concluir que existe buena calidad microbiológica en los vinos tintos de los Valles Calchaquíes, indicando la aplicación de buenas prácticas de manufactura, tanto en el proceso de elaboración como de envasado.

BIBLIOGRAFÍA

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología. (2010). Código Alimentario Argentino. Artículo 1104. Cap. XIII. <http://www.anmat.gov.ar>
- Arroyo T.; Cabellos J. M., Pedregosa A., Minguez J. M. y Gómez J. L. 1998. Identificación genética de levaduras en vinos blancos de la D. O. Madrid. Incidencia en la composición cromática. Reunión Anual INDO. La Guardia (Alava).
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (1984). New York, USA, Ed. N.R. Krieg and J.G. Holt. Vol I, pp. 207-278.
- Constantí M., Poblet M., Arola I., Mas A. and Guillamón J. M. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. Am. J. Enol. Vitic., 48(3): 339-344.
- Egli C.M., Edinger W. D., Mitrakul C. M. and Heinck-Kling T. 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. J. Appl. Microbiol. , 85: 779-789.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. (2008). InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fleet G. H., Lafon-Lafourcade S. and Ribéreau-Gayon P. (1984). Evolution of Yeasts and Lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux Wines. Applied and Environmental Microbiology, 48 (5), 1034-1038.
- Guillamón J. M., Barrio E., Huerta T. and Querol A. 1996. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to

mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 708-714.

Granchi L., Ganucci C., Giovannetti L. and Vincenzini M. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity in spontaneous commercial fermentation of grape musts with "adequate" and "inadequate" assimilable-nitrogen content. *Letters in Applied Microbiology.*, 36: 54-58.

ICMSF.1991. *El Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos*. Zaragoza, España: Ed. Acribia. pag.452

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1983) *Técnicas de Análisis microbiológico*. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 430-452.

Jolly N. P., Augustin O. P. H. and Pretorius Y. S. 2003b. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *S. Afr. Enol. Vitic.*, 24:2: 55-62.

Lambrechts M. G. and Pretorius J. S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma: a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21: 97-129.

Peynaud, E.1996. Balance in wine. En: *The taste of wine*. Cap. 9, p 188-209. New York, USA : 2º Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Regodón J. A., Pérez F., Valdés M. E., De Miguel C. and Ramirez M. 1997. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiology.*, 14: 247-254.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud E., Sudrad P. y Ribéreau-Gayon P. 2006. *Ciencias y Técnicas del vino*. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pag.537.

Suarez Lepe J. A. e Iñigo Leal B.1992. "Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación". España: Editorial Mundi-Prensa. pag.534.

Torija M.J., Rozès N., Poblet M., Guillamón J.M. and Mas A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain

population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International. Int. J. Food Microbiol.*, 80: 47-53.

Van Der Westhuizen T. J., Augustyn O. P. H., Khan W. and Pretorius I. S. 2000. Seasonal variation of Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21 (nº 1): 10-16.

UTILIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE SOJA COMO MATERIAL DE PARED PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE CHÍA MICROENCAPSULADO

González A.¹, Martínez M.L.², Paredes A.³, Ribotta P.¹ y León A.E.¹

¹ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC), CONICET. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

² Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET and Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA - FCEFN).

Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

³ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, UNITEFA-CONICET. Argentina.

e-mail: agustingonzalez24@gmail.com

Resumen

El aceite de chía (ACh) (*Salvia hispanica* L.) posee excelentes propiedades nutricionales pero debido al elevado nivel de insaturación (> 80%) es altamente susceptible a reacciones oxidativas que deterioran su calidad química y organoléptica. La microencapsulación resulta una alternativa tecnológica para preservar este tipo de ingrediente. En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de encapsulamiento y la estabilidad oxidativa del ACh microencapsulado mediante secado por aspersión utilizando proteínas de soja (SPI) y maltodextrina (MD) como material de pared. En todos los casos el tamaño de gota de las emulsiones estuvo

comprendido entre 2 y 40 µm. Los porcentajes de sólidos recuperados fueron del 63,8; 63,7; 57,2 y 32,8% y el contenido de humedad del 5,5; 5,5; 6,0 y 5,6% para las muestras SPI/AC 1, SPI/AC 2, SPI/AC 3 y SPI/MD/AC, respectivamente. Las microcápsulas de 2 a 50 µm de tamaño formadas por SPI presentaron una morfología irregular, mientras que las microcápsulas que contienen MD mostraron una forma esférica. La mayor eficiencia de encapsulamiento (77,3%) fue obtenida mediante la combinación de SPI con MD. Finalmente, a través de un ensayo de oxidación acelerada se determinó que, el material de pared ejerce un marcado efecto protector sobre el ACh incrementando de 2 a 2,5 veces su período de inducción.

Palabras clave: Proteínas de soja; maltodextrina; secado por aspersión, microcápsulas, aceite de chía

Abstract

The omega-3 and omega-6 rich oils incorporation into processed foods is an interesting alternative for increase its consumption. However, these components have oxidative stability issues, resulting in a shorter life of the food. These problems can be minimized by the use of microencapsulation technology. The objective of the present work was to study the encapsulation efficiency and the oxidative stability of chia oil microencapsulated by spray drying using isolated soybean protein (SPI) and maltodextrin (MD) as wall materials. It was observed that the microcapsules (MC) formed from SPI have a spherical structure with big depressions, while the MC containing maltodextrin has a perfect spherical and homogeneous morphology. Protection factors around 2 were determined in all cases under accelerated oxidation

conditions. From this, it can be affirmed that MC have a protective effect on the chía oil. From the low peroxides values determined, it could be observed that the spray drying treatment is not imparting oxidative issues to the encapsulated oil.

Keywords: Soy protein; maltodextrin; spray drying; microcapsules; chía oil.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos ricos en ácidos grasos insaturados proveen numerosos beneficios para la salud. El mayor conocimiento acerca de la influencia del tipo de ácidos grasos ingeridos sobre la salud ha despertado interés en aumentar el consumo de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales se agrupan en las series omega-9, omega-6 y omega-3. Una alimentación rica en estos compuestos disminuye el riesgo de padecer muchas enfermedades, especialmente las cardiovasculares, cáncer y síndrome metabólico. Su consumo habitual constituye un remedio eficaz para reducir el nivel de colesterol y de triglicéridos en sangre, y contribuye a regular la presión arterial. Diversos estudios han demostrado que esta familia de ácidos grasos no sólo hay que consumirlos en cantidades suficientes, sino que además hay que guardar una cierta proporción entre ambos tipos. Se ha descrito que una relación omega-6/omega-3 de al menos 5:1 produce cambios benéficos en personas asmáticas, y una proporción de 4:1 ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares hasta en un 70%(Simopoulos, 2002). Entre las fuentes vegetales, las semillas de chía, con un 32-39% de aceite, constituyen la fuente más rica en ácidos grasos omega-3 (61-70%). El consumo de 1 g de aceite de chía diario cubre los requerimientos básicos en un adulto sano. En un estudio llevado a cabo con ratas alimentadas a base de semillas de chía se informó un incremento en la proporción omega-3 en sangre con una consecuente mejora de la relación omega-6/omega-3 (Ayerza & Coates, 2004). Un alimento que contenga mayor contenido de ácidos grasos insaturados, resulta

favorable desde el punto de vista nutricional, sin embargo, a menudo se presentan inconvenientes de estabilidad oxidativa lo que se traduce en una menor vida útil del alimento ya que cuando estos aceites se encuentran expuestos a factores medioambientales como el aire, la luz y la temperatura, se oxidan alterando su calidad química y organoléptica(Martínez, Penci, Ixtaina, Ribotta, & Maestri, 2013). En este sentido, la incorporación de aceites, ricos en omega-3 y omega-6, microencapsulados a productos de panificación resulta una alternativa interesante desde el punto de vista científico-tecnológico.

La utilización de la tecnología de microencapsulación es capaz de prevenir la oxidación del aceite y mantener sus características nutricionales intactas. Diversos materiales de pared han sido empleados siendo los polisacáridos los más utilizados (Davidov-Pardo, Rocchia, Salgado, León, & Pedroza-Islas, 2008). Por otro lado, el uso de proteínas vegetales como material de pared está siendo ampliamente desarrollado. Sus excelentes propiedades tensioactivas hacen que este material resulte muy adecuado para las técnicas de microencapsulamiento que requieren emulsiones preliminares tales como el secado por aspersión. Además, su excelente capacidad de formación de película y sus excelentes propiedades de barrera a gases hacen de las proteínas muy buenos materiales para la formación de microencapsulados(A. Nesterenko, Alric, Silvestre, & Durrieu, 2012). Se pueden encontrar en literatura algunos ejemplos de utilización de proteínas de soja para microencapsular vitaminas (Nesterenko, Alric, Violleau, Silvestre, & Durrieu, 2014), aceite de pescado (Gan, Cheng, & Easa, 2008), aceite de soja (Tang & Li, 2013a, 2013b), etc. Sin embargo, el microencapsulamiento de aceite de chía (ACh) utilizando

este material de pared aún no ha sido descrito. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de encapsulamiento y la estabilidad oxidativa del AC microencapsulado mediante secado por aspersión utilizando proteínas de soja (SPI) como material de pared.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

En este trabajo se utilizó un aislado de proteínas de soja (SUPRO E, TheSolae Co.), maltodextrinas (DE-15, Distribuidora Nicco), aceite de chía (ACh) obtenido a partir de las semillas prensadas en frío (Martínez *et al.*, 2012). Los solventes y reactivos utilizados fueron hexano p.a., ioduro de potasio, cloroformo, ácido acético y almidón.

Preparación de las emulsiones

Se prepararon tres emulsiones utilizando proteínas de soja (SPI) en agua (8% p/v) y maltodextrina (MD) en tres proporciones diferentes: SPI 100%, SPI/MD 50/50 y SPI/MD 25/75. Se utilizó una relación 2/1 entre la masa de SPI y aceite agregado. Para realizar esto, se realizaron dispersiones de SPI en agua mediante agitación vigorosa. A las mismas se les agregó la MD en solución acuosa y se procedió a agitar por 30 min más. Posteriormente se calentaron las dispersiones a 95 °C por 1 h y se enfriaron rápidamente con corriente de agua fría. Las dispersiones se dejaron reposar 24 h en heladera antes de la formación de las emulsiones. Para realizar las mismas, se procedió a la incorporación del aceite gota a gota sobre las dispersiones mediante agitación mecánica utilizando

un homogeneizador Ultraturrax T18 (IKA, China) durante 15 min a 18.000 rpm. La homogeneización se realizó en un baño de hielo, a fin de mantener la temperatura a 5 °C aproximadamente. Las emulsiones fueron observadas mediante un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i (IZASA, Spain), acoplado a una cámara Leica DFC 490 (Alemania), y se empleó una magnificación de 40x.

Preparación de las microcápsulas por secado por aspersión

La obtención de las microcápsulas(MC) se realizó mediante secado por aspersión en un equipo Mini Spray Dryer Büchi B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza). Se utilizó un atomizador de boquilla de doble fluido con un orificio de salida de 5 mm; la presión de atomización de aire se mantuvo a 4,4 L/h durante todos los experimentos de secado. Se secaron 300 mL de cada emulsión bajo las siguientes condiciones experimentales: temperatura del aire de entrada, 130 °C; temperatura del aire de salida, 79 °C; flujo del aire de atomización, 538 L/h; funcionamiento de la bomba, 10% y configuración del aspirador 38 m³/h.

Rendimiento de sólidos recuperados

La cantidad de sólidos recuperados luego del secado de las emulsiones (%Secado) se obtuvo por diferencia entre la cantidad de sólidos totales contenidos en la emulsión inicial (b.s., base seca) y los obtenidos luego del secado por aspersión (b.s.), según la siguiente ecuación:

(1)

SR%: Rendimiento de sólidos recuperados, expresado en porcentaje.

STi: peso de sólidos totales iniciales presentes en la emulsión (b.s.).

STf: peso de sólidos totales finales luego del secado por aspersión (b.s.).

Caracterización de las MC

Luego del secado por aspersión de las emulsiones, se procedió a realizar el análisis físico-químico y morfológico de los polvos obtenidos. Para ello se llevaron a cabo las siguientes determinaciones.

Contenido de humedad

El contenido de humedad de las MC, fue determinado con una estufa halógena Modelo M45, OHAUS. La muestra se sometió a un programa de temperatura de 115 °C durante 5 min. Cada muestra fue analizada inmediatamente después del proceso de secado por aspersión, impidiendo de esta manera que el resultado sea afectado por la posterior incorporación de humedad. El porcentaje de humedad (H%) se calculó según la Ecuación 2:

(2)

H%: Humedad expresada en porcentaje (b.h., base húmeda).

STh: Sólidos Totales iniciales obtenidos mediante secado por aspersión.

STd: Sólidos Totales finales sometidos a deshidratación.

Determinación de aceite superficial (AS)

Para determinar el contenido de aceite en la superficie (AS) de las MC se procedió a utilizar una metodología descrita en bibliografía con algunas modificaciones (Gallardo et al., 2013). Para esto, se pesaron $2,00 \pm 0,01$ g de muestra y se le incorporaron 30 ml de éter de petróleo. Se mantuvo agitación constante por 1 min y se procedió a separar por filtración. El sólido filtrado fue lavado con 10 mL de éter de petróleo y se juntaron las fases orgánicas. Posteriormente se procedió a evaporar el solvente y el aceite obtenido se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante, determinando su cantidad por pesada indirecta. Este ensayo fue realizado por duplicado.

Determinación de aceite total (AT)

El contenido total de aceite (AT) en las MC fue definido como la suma de la cantidad de aceite que fue efectivamente encapsulado y la que se encuentra en la superficie (AS) de las MC. Para su determinación se procedió según una metodología extraída en bibliografía con algunas modificaciones (Calvo, Lozano, Espinosa-Mansilla, & González-Gómez, 2012). Para esto, se realizó la extracción del aceite total pesando 4 g de cada muestra y colocándolas en cartuchos previamente confeccionados con papel de filtro. A éstas se las sometió a extracción continua sólido-líquido en equipo de Soxhlet, durante 24 h, utilizando como disolvente n-hexano. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y

posterior a la extracción, y se expresó como porcentaje de aceite (b.s.). Este ensayo fue realizado por duplicado.

Eficiencia de retención (ER%)

La eficiencia de retención (ER%) fue definida como la relación entre el aceite total contenido en las microcápsulas (AT) y el aceite inicial agregado a la emulsión (Ai) y fue calculado como indica la Ecuación 3.

(3)

Eficiencia de encapsulación (EE%)

La eficiencia de encapsulación (EE%) fue determinada mediante la relación entre el aceite total (AT) contenido en la microcápsula y el aceite localizado en su superficie (AS) (Davidov-Pardo et al., 2008) de acuerdo a la Ecuación 4.

(4)

Análisis morfológico de las MC

La morfología superficial de las MC fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, los polvos obtenidos luego del secado por aspersión fueron colocados sobre una cinta adhesiva de doble cara, y montados sobre soportes para SEM, recubiertos con una película de 3-5 mA de oro/paladio al vacío y examinados con un microscopio electrónico de barrido FEG SEM (Carl Zeiss - Sigma, Alemania). Se utilizó una magnificación entre 3000x y 30000x.

Determinación de estabilidad oxidativa de aceite Índice de peróxidos

La determinación del índice de peróxidos del aceite microencapsulado de cada muestra se llevó a cabo según el procedimiento descrito por la AOCS con las modificaciones necesarias para emplear pequeñas cantidades de aceite (AOCS, 2009). Para esto se procedió a extraer el aceite encapsulado de cada muestra por extracción en hexano frío por 24 h. Posteriormente, se pesaron $0,200 \pm 0,001$ g de los aceites extraídos y se colocaron en viales de 10 mL. Se agregaron 3mL de solución de ácido acético: cloroformo (3:2 %, v/v) y se agitó vigorosamente hasta su disolución completa. Se adicionaron 0,5mL de solución saturada de ioduro de potasio y se mantuvo en oscuridad durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 3 mL de agua destilada, 0,5mL de solución de almidón (1%, p/v) y se tituló agitando continuamente, con solución 0,001N de Na_2SO_3 , hasta la desaparición del color marrón. El cálculo del índice de peróxidos se realizó en base a la Ecuación 5 y se expresó en miliequivalentes de oxígeno/kg de aceite. Este ensayo fue realizado por duplicado.

(5)

S = mL de solución de tiosulfato de sodio consumidos por la muestra.

B = mL de solución de tiosulfato de sodio consumidos por el blanco.

N = normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

W = masa de aceite expresada en g.

Test de Rancimat

Los aceites microencapsulados y sin encapsular fueron sometidos a condiciones de oxidación acelerada mediante el test de Rancimat (Gallardo *et al.*, 2013). Las muestras fueron expuestas a temperaturas elevadas en una corriente de aire de caudal fijo. Los productos de oxidación ligeramente volátiles (en su mayor parte derivados del ácido fórmico) se transfieren con la corriente de aire al equipo donde se absorben en la solución de medición (agua destilada). Mediante el registro continuo de la conductividad de esta solución se consiguen curvas de oxidación cuyo punto de inflexión se designa como tiempo de inducción (TI), el cual se expresa en horas. En el presente trabajo las condiciones utilizadas fueron: 100°C, flujo de aire de 20L/h, cantidad de aceite 1 g y cantidad de MC 1,5 g.

A su vez se definió el Factor de Protección (FP) como el cociente entre el tiempo de inducción del aceite microencapsulado sobre el tiempo de inducción del aceite sin encapsular. Este ensayo fue realizado por duplicado.

Resultados y discusión

Preparación y caracterización de las MC

El proceso de formación de las emulsiones es uno de los pasos más importantes y críticos en la microencapsulación de aceites comestibles mediante secado por aspersión. La estabilidad de la emulsión, la viscosidad y el tamaño de las gotas formadas juegan un papel clave en la eficiencia de encapsulación y la morfología de las microcápsulas (Tonon *et al.*, 2011;

Carneiro *et al.*, 2013). Las microfotografías mostraron gotas de forma redondeada, separadas unas de otras, localizadas sobre toda la superficie capturada (Figura 1). El tamaño de gota en las emulsiones estudiadas estuvo comprendido entre 5 y 60 μm independientemente de la proporción de SPI y MD en el material de pared. A partir de estos resultados se caracterizó al sistema SPI/ACh y SPI/MD/ACh como una micro-emulsión, debido a que el total de las gotas evaluadas tuvieron un tamaño superior a los 300 nm. Las emulsiones formadas a partir de gotas por debajo de dicho tamaño son consideradas nano-emulsiones (Anton y Vandamme, 2011). Rodea-González *et al.* (2012) evaluaron emulsiones que contenían aceite de chía y mezclas de proteínas concentradas de suero y goma arábiga como material de pared en diferentes concentraciones, observando diámetros de gota promedio entre 2,97 μm y 9,01 μm . Por otra parte, Carneiro *et al.* (2013) informaron un tamaño promedio de gota de 2 μm - 3 μm en emulsiones formadas con aceite de lino y diferentes combinaciones de maltodextrina; mientras que Tononet *et al.* (2011), obtuvieron diámetros de entre 2,27 μm y 4,77 μm para emulsiones de aceite de lino/goma arábiga.

Fig. 1. Imágenes tomadas con microscopio óptico de las emulsiones SPI/ACh (izquierda) y SPI/MD/ACh (derecha).

Las emulsiones se atomizaron bajo las siguientes condiciones de proceso: temperatura del aire de entrada, 130 °C; temperatura del aire de salida, 79 °C; flujo del aire de atomización, 538 L/h; funcionamiento de la bomba, 10% y configuración del aspirador 38 m³/h. Una de las variables que es controlada exhaustivamente es la

temperatura del aire de secado, debido a su influencia sobre la morfología y la estabilidad oxidativa de las microcápsulas. El uso de altas temperaturas de secado proporciona más energía disponible para el proceso de oxidación lipídica, favoreciendo la formación de peróxidos (Tononet al., 2011; Sefertet al., 2009). A diferencia de otros autores que trabajaron con temperatura de entrada de aire entre 160 – 180 °C (Davidov-Pardo et al., 2008; Tononet al., 2011; Gallardo et al., 2013), en el presente estudio se utilizó una temperatura de 130 °C dado que, mediante estudios preliminares (datos no mostrados), se observó un comportamiento de secado similar del sistema a 130 y a 160 °C.

En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de humedad, rendimientos de sólidos recuperados, eficiencias de retención y eficiencias de encapsulación determinados para cada muestra (SPI 100, SPI/MD 50/50 y SPI/MD 25/75).

Muestra	H% (%)	SR% (%)	ER% (%)	EE% (%)
SPI 100	3,31	50,05	88,12 ± 6,80 ^B	57,30 ± 2,93 ^A
SPI / MD 50/50	3,96	40,39	86,33 ± 2,17 ^B	60,17 ± 3,85 ^A
SPI / MD 25/75	3,11	30,93	62,42 ± 4,77 ^A	52,54 ± 4,95 ^A

Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo al test de Tukey con un nivel de significancia ($p \leq 0,05$).

Tabla 1: Porcentajes de humedad (H%), rendimientos de sólidos recuperados (SR%), eficiencias de retención (ER%) y eficiencias de encapsulación (EE%) para los tres tipos de microcápsulas preparadas.

Las microcápsulas obtenidas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí en el contenido de humedad por lo que se puede inferir que esta propiedad es una consecuencia de las condiciones del proceso de secado principalmente. Resultados similares fueron informados por Rodea-González et al., (2012) para microcápsulas de aceite de chía obtenidas con distintas combinaciones de proteínas concentradas de suero, goma arábica y goma mezquita.

En las tres formulaciones ensayadas se obtuvieron valores relativamente bajos de SR% y EE%. Sin embargo, en las muestras SPI y SPI/MD, el %SR fue superior al obtenido por Rocca et al. (2014) y Martínez et al. (2015) en la encapsulación de aceite de girasol (39,94%) y chía (39,42%), respectivamente. Resulta importante destacar que la muestra constituida sólo por proteína de soja (SPI) como material de pared fue la que presentó los mayores % de SR y ER; a su vez se evidencia que, a medida que aumenta la proporción de MD, disminuye significativamente el % de SR y ER. Generalmente se estima que un porcentaje de SR cercano al 40% se encuentra en el límite de lo que es aceptable para polvos obtenidos mediante secado por aspersión a escala de laboratorio (Rocca et al., 2014). Las diferencias expuestas en los diversos estudios demuestran claramente que tanto el material a encapsular, como el material de pared y las condiciones de secado tienen una estrecha relación con la recuperación del producto final.

La eficiencia de encapsulación se situó alrededor del 57% (Tabla 1). Estos resultados son inferiores a los informados en numerosos estudios donde se realizó la microencapsulación de aceites vegetales (Velasco et al., 2009; Tononet al., 2011; Martínez et al., 2012; Gallardo et al., 2013; Rocca et al., 2014). Respecto a los valores

obtenidos de EE% podemos afirmar que el aceite retenido en las microcápsulas se distribuye de igual manera (entre encapsulado y superficial) independientemente de la composición del material de pared.

Las morfologías de las partículas formadas a partir de SPI presentan una estructura esférica con depresiones, mientras que las que contienen MD como componente presenta una morfología bien esférica y homogénea (Figura 2). En la muestra que contiene ambos componentes en igual proporción se observan ambas estructuras. Kalab (1979) sugirió que las depresiones que se observan en la superficie se forman por la contracción de las partículas durante el secado y posterior enfriamiento. Según Ré (1998) estas depresiones están relacionadas con el colapso sufrido por las gotas durante las etapas iniciales de secado. En ningún caso se observó la presencia de fisuras o poros que indiquen la rotura de las MC. Con respecto al tamaño de las MC, se pudo observar una gran diversidad de tamaños, pudiendo encontrar microcápsulas desde 5 a 40 μm siendo la mayor cantidad de aproximadamente 10 μm de diámetro. Además, se observó la presencia de cúmulos o agregados formados probablemente en la fase de preparación de la muestra para la microscopía SEM.

Figura 2. Microscopías SEM de MC formadas por SPI (A) y SPI/MD 25/75 (B) tomadas a 30000x

Estabilidad oxidativa del aceite y evaluación del efecto protector de las MC

Mediante tests de Rancimat, se logró determinar un incremento de la estabilidad oxidativa del ACh

microencapsulado, independientemente del material de pared, respecto a su homólogo sin encapsular (Tabla 2). La tecnología de microencapsulación mediante secado por aspersión logró incrementaren más de 2 veces el período de inducción del ACh. Resultados similares fueron informados por Gallardo et al., 2013 en aceite de lino microencapsulado evaluado a 100 °C. Es notable también que la presencia y proporción de MD no influyó significativamente en los tiempos de inducción determinados. Si bien, los aceites microencapsulados, por efecto de las condiciones de secado, presentaron cantidades de productos de oxidación primaria significativamente superiores al del ACh sin encapsular, los TI demuestran que, dicho incremento en IP no afectó la estabilidad oxidativa del producto final bajo las condiciones de oxidación acelerada, evidenciando el efecto protector adicional que ejerce el material de pared.

Muestra	TI (h)	Factor de Protección	IP (meq O ₂ /Kg oil)
SPI 100	6,40 ± 0,01 ^A	2,29	1,14 ± 0,09 ^B
SPI / MD 50/50	5,96 ± 0,04 ^A	2,14	1,50 ± 0,04 ^{BC}
SPI / MD 25/75	6,2 ± 0,2 ^A	2,21	1,9 ± 0,2 ^C
Aceite de chía	2,77 ± 0,04 ^B	-	0,52 ± 0,01 ^A

Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo al test de Tukey con un nivel de significancia ($p \leq 0,05$).

Tabla 2: Tiempos de inducción (h), factor de protección e índice de peróxidos (IP) (meq O₂/Kg oil) para los tres tipos de microcápsulas preparadas

CONCLUSIÓN

El aceite de chía obtenido por prensado en frío presentó una calidad química aceptable con niveles mínimos de peróxidos lipídicos.

Las emulsiones preparadas, previo al secado por aspersión, presentaron una distribución de tamaño de gotas pequeñas, de forma esférica, con una adecuada separación y poca coalescencia, permitiendo caracterizar al sistema como una micro-emulsión.

El secado por aspersión del aceite de chía y sus distintas formulaciones, permitió la obtención de polvos cuyas características (rendimiento, porcentaje de humedad y eficiencia de encapsulación) se encontraron dentro de los valores aceptados para la microencapsulación de aceites vegetales.

El análisis morfológico demostró que las microcápsulas formadas a partir de SPI presentaron una estructura esférica con depresiones, mientras que las que contenían MD como componente presentaron una morfología bien esférica y homogénea. La superficie de las partículas no presentó poros ni grietas aparentes, lo que se relacionó con un buen proceso de encapsulación. Con respecto al tamaño de las MC, se pudo observar una gran diversidad de tamaños, pudiendo encontrar microcápsulas desde 5 a 40 μm siendo la mayor cantidad de aproximadamente 10 μm de diámetro.

La estabilidad oxidativa del aceite de chía microencapsulado aumentó, independientemente del material de pared, respecto a su homólogo sin encapsular. Este resultado brinda ventajas importantes para evaluar la posibilidad de incorporar este aceite en

alimentos, en particular en productos panificados ya que resulta muy conveniente la incorporación de estos polvos a las harinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anton N, Vandamme T. 2011. Expert Review: Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research Associates*, 28:978-985.
- AOCS. 2009. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*, AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Ayerza, R., & Coates, W. 2004. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America. *Tropical Science*, 44(3): 131–135.
- Calvo, P., Lozano, M., Espinosa-Mansilla, A., & González-Gómez, D. 2012. In-vitro evaluation of the availability of ω -3 and ω -6 fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Research International*, 48(1): 316–321.
- Carneiro H, Tonon R, Grosso C, Hubinger M. 2013. Encapsulation Efficiency and Oxidative Stability of Flaxseed Oil Microencapsulated by Spray-drying using Different Combinations of Wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115: 443-451.
- Davidov-Pardo, G., Rocchia, P., Salgado, D., León, A. E., & Pedroza-Islas, R. 2008. Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil.pdf. *American Journal of Food Technology*, 3(6): 384–393.

- Gallardo, G., Guida, L., Martínez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... Hermida, L. G. 2013. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2): 473–482.
- Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., & Easa, A. M. 2008. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4): 563–569.
- Kalab M. 1979. Microstructure of dairy foods. Milk products based on protein. *Journal of Dairy Science*. 62 (8): 1352-1364.
- Martínez M.L., Marín M.A., Salgado Faller C.M., Revol J., Penci M.C., Ribotta P.D. 2012. Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. *Food Science and Technology*, 47: 78-82.
- Martínez M, Roccia P, Llabot, Penci M, Marin M, Ribotta P, Maestri D. 2012. Effect of Rosemary Extract on Walnut Oil (*Juglans Regia* L.) oxidative Stability Microencapsulated by Spray Drying. En: IV Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos: libro de trabajos completos: microbiología, nutrición, educación. Eds. López A, Pécora R, Brutti N, Pérez G. Primera ed. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. pp. 178-185.
- Martínez, M. L., Penci, M. C., Ixtaina, V., Ribotta, P. D., & Maestri, D. 2013. Effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of walnut oil under different storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1): 44–50.
- Martínez M.L., Curti M.I., Roccia P., Llabot J.M., Penci M.C., Bodoira R.M., Ribotta P.D. Oxidative stability of walnut (*Juglans regia* L.) and chia (*Salvia hispanica* L.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technology* (in press).
- Nesterenko, a., Alric, I., Violleau, F., Silvestre, F., & Durrieu, V. 2014. The effect of vegetable protein modifications on the microencapsulation process. *Food Hydrocolloids*, 41: 95–102.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., & Durrieu, V. 2012. Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48(2): 387–396.
- Ré, M. 1998. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*, 16:1195-1236.
- Roccia P, Martínez M, Llabot JM, Ribotta PD. 2014. Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Technology*, 254: 307–313.
- Rodea-González D, Cruz-Olivares J, Román-Guerrero A, Rodríguez-Huezo M, Pérez-Alonso V. 2012. Spray-Dried Encapsulation of Chia Essential Oil (*Salvia Hispanica* L.) in Whey Protein Concentrate-Polysaccharide Matrices. *Journal of Food Engineering*, 111: 102-109.
- Serfert Y, Drusch S, Schwarz K. 2009. Chemical Stabilization of Microencapsulated Oils Rich in Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Food Chemistry*, 113(4): 1106-1112.
- Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.*, 56: 365–379.
- Tang, C.-H., & Li, X.-R. 2013a. Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, 52(1): 419–428.

- Tang, C.-H., & Li, X.-R. 2013b. Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose. *Journal of Food Engineering*, 117(3): 281–290.
- Tonon R, Grosso C, Hubinger M. 2011. Influence of Emulsion Composition and Inlet Air temperature on The Microencapsulation of Flaxseed Oil by Spray Drying. *Food Research International*, 44: 282-289.
- Velasco J, Dobarganes M, Holgado F, Márquez-Ruiz G. 2009. A Follow-Up Oxidation Study in Dried Microencapsulated Oils under the Accelerated Conditions of the Rancimat Test. *Food Research International*, 42: 56-62.

Agradecimientos:

Los autores quieren agradecer a SECyT (UNC) por el proyecto Categoría B: "Alternativas tecnológicas para la conservación de aceites vegetales no tradicionales". Código: 203/14. A. González también quiere agradecer a CONICET por la beca proporcionada.

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE *LACTOBACILLUS CASEI* Y DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO EN EL COLOR DE CALABAZA DESHIDRATADA

Genevois C.^{1,2}, Flores S.K.^{1,2}, de Escalada Pla M.F.^{1,2}

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: CONICET, Argentina.

cgenevois@di.fcen.uba.ar

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de la presencia de *Lactobacillus casei* (ATCC-393) en el color de un ingrediente funcional a base calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). La vida útil del producto fue determinada por una carga de *L. casei* viable inferior a 10^6 UFC g/producto. Durante los 35 días de almacenamiento, se evaluó el color en el espacio CIE Lab y se calculó el valor de chroma a dos temperaturas diferentes (22°C/8°C). De igual forma, se llevó a cabo un sistema control pero sin *L. casei*. Los valores experimentales de color evolucionaron de acuerdo a una cinética de primer orden. En todos los sistemas se observó un incremento de la luminosidad durante el almacenamiento. Tanto la cromaticidad (Chr) como los valores de a^* y de b^* , disminuyeron durante el almacenamiento. La velocidad de disminución fue significativamente mayor a 22°C, lo cual estaría asociado a una pérdida de color rojo-amarillo por degradación de los compuestos carotenoides. Por otro lado, no se observaron diferencias debido a la presencia de probióticos. Se pudo concluir que la presencia de *L. casei*

no afectó la cinética de decoloración de los sistemas almacenados a 22 y 8°C. Sin embargo, el almacenamiento a 8°C redujo significativamente la velocidad de pérdida de color.

Palabras clave: alimentos funcionales, color, *Lactobacillus casei*, calabaza.

Abstract: The aim of the present work was to analyze the effect of *Lactobacillus casei* (ATCC-393) presence, on the color of a functional ingredient based on pumpkin (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). The shelf life of the product was determined by a viable *L. casei* count lower than 10^6 UFC/g of product. The color in a CIE Lab space was evaluated on the final product during 35 storage days and also chroma value was calculated at two different temperatures (22°C and 8°C). Additionally, a control system without *L. casei* was performed. Experimental data of color fitted to a first order kinetic. In all cases, an increase in the luminosity was observed during storage. The chromaticity (Chr) as well as a^* and b^* parameters decreased during storage. Decreasing rate was significantly higher at 22°C. It would be related to the loss of the red-yellow color by degradation of carotenoids compounds. On the other hand, no differences were observed due to probiotic presence. It could be concluded that *L. casei* presence did not affect the kinetic of the loss of systems color at 22 and 8°C. Nevertheless, the storage at 8°C significantly reduced the rate of color loss.

Keywords: functional foods, color, *Lactobacillus casei*, pumpkin.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la FAO/WHO (2002), las bacterias probióticas son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas a un huésped le confieren beneficios a la salud. Múltiples estudios han descrito sus beneficios en infecciones gastrointestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, metabolismo de la lactosa, disminución del colesterol en plasma, estimulación del sistema inmune, propiedades anti-mutagénicas y anti-carcinogénicas, actividad antimicrobiana, y supresión de infección por *Helicobacter pylori* (Pereira *et al.* 2011, do Espirito Santo *et al.* 2011).

Existe un consenso general acerca de la importancia de la microflora intestinal en la salud y en el bienestar de los seres humanos y animales (Senaka *et al.* 2013). La modulación de la microflora del huésped se logra a través de la administración o consumo de microorganismos probióticos y/o fibras prebióticas. Los microorganismos probióticos deben mantener su efectividad y potencialidad a lo largo de la vida útil del producto, y una vez ingeridos por el individuo deben tener la habilidad de resistir los jugos gástricos y la exposición a las sales biliares. Más aún, deben ser capaces de proliferar y colonizar el epitelio intestinal (Saad *et al.* 2013).

Actualmente, los microorganismos probióticos más utilizados en el mercado pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo los productos lácteos como yogures o leches fermentadas los más utilizados como matrices soporte de estos microorganismos. Sin embargo, existe un creciente

interés en el desarrollo de productos que puedan ser consumidos por individuos con dislipemias, intolerancia a la lactosa, o vegetarianos (Martins *et al.* 2013). Por lo tanto, el desarrollo de productos probióticos utilizando matrices vegetales es aún un desafío pendiente en el segmento de alimentos funcionales, y para ello es necesario evaluar el crecimiento, la viabilidad, y la funcionalidad del probiótico en la matriz del alimento, así como también el efecto de los factores extrínsecos e intrínsecos del alimento (Guergoletto *et al.* 2010, Martins *et al.* 2013).

Hasta el momento, existe poca información sobre el efecto de la adición de probióticos a matrices vegetales, y entre las matrices más estudiadas se encuentran los jugos a base de fruta, frutas o vegetales mínimamente procesados, snacks, y bebidas a base de cereales (Martins *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2011).

Debido a que los métodos de preservación afectan la viabilidad de los microorganismos probióticos, es necesario optimizar los procesos a fin de garantizar durante la vida útil del producto una carga de células viables entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} de alimento con el objetivo de cumplir con las exigencias de la legislación local (ANMAT, 2011).

En otro aspecto, los procesos industriales como la elaboración de sopas y caldos instantáneos, o la producción de conservas suelen generar gran cantidad de residuos sólidos que se destinan generalmente a la alimentación de ganado o como abonos orgánicos. En cuanto a la calabaza, incluso el manejo pos cosecha es importante debido a que las pérdidas pueden llegar al 100% del cultivo por problemas de daño mecánico, pudrición y/o deshidratación (USAID, 2006). Los integrantes del presente proyecto han estudiado

ampliamente este tejido. Se buscaron formas de aprovechar la cáscara y partes de la calabaza no utilizadas en los procesos involucrados, para la elaboración de fibra dietaria de buena funcionalidad (de Escalada Pla *et al.*, 2007a, 2013b); sin embargo queda el desafío pendiente de agregarle mayor valor a esta cadena productiva aun poco desarrollada. Cabe destacar que la calabaza *Cucurbita moschata* o Butternut se cultiva ampliamente en todo el país a lo largo de todo el año.

De esta forma, el presente trabajo tiene como objetivo analizar el efecto de la presencia de *Lactobacillus casei* (ATCC-393) en el color de un ingrediente funcional a base calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) deshidratado al vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Preparación del residuo de calabaza deshidratado:

La calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, adquirida en un supermercado local, fue cuidadosamente lavada en su superficie con detergente y agua potable, y finalmente enjuagada con agua destilada. Las calabazas fueron cortadas longitudinalmente en forma paralela a su eje longitudinal. La pulpa fue separada para otros ensayos mientras que la cáscara con algo de pulpa remanente, una relación aproximada de 70/30, fue destinada para este trabajo. Cáscara y pulpa remanente, fueron procesadas con un molino (C6-0700, China). Finalmente, la calabaza triturada fue secada al vacío (Martin Christ Alpha 1-4 LSD, Alemania) durante 24 h y almacenada a -18°C hasta su utilización.

Preparación del inóculo inicial de *L. casei*:

Se preparó un inóculo inicial a partir de estrías de *L. casei* ATCC-393 en un erlenmeyer de 250 mL conteniendo 30 mL de caldo MRS estéril (Biokar Diagnostics, Francia). El crecimiento del inóculo se llevó a cabo en una incubadora (I-290, INGELAB, Argentina) durante 18-20 h a 37°C con agitación orbital (Vicking Shaker Pro, Argentina) a 45 rpm. La concentración final aproximada de *L. casei* fue de 10^9 UFC mL⁻¹, siendo luego utilizado para inocular los frascos de 500 mL conteniendo el residuo de calabaza.

Preparación de residuo de calabaza con probióticos:

Brevemente, en dos frascos de 500 mL se colocaron 10 g del residuo de calabaza deshidratado junto con agua destilada, se procedió a esterilizar el material a 121°C durante 15 minutos. Seguidamente, cada frasco se inoculó con el inóculo inicial descrito previamente, y luego fueron incubados durante 24 h a 37°C con agitación orbital (Vicking Shaker Pro, Argentina) a 45 revoluciones por minuto (rpm). Finalizado el período de fermentación, el material fue centrifugado y el pellet obtenido fue lavado dos veces con solución fisiológica (glucosa 5%, NaCl 0,9%), centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos y secado al vacío (Christ 1-4 LD, Germany) durante 24 h. Una vez obtenido el residuo sólido, éste fue tamizado con una malla ASTM 40 con apertura de poro de 420 micrones, envasado en tubos Falcon de 50 mL y cerrados herméticamente para ser almacenados a dos temperaturas diferentes (22°C y 8°C) durante 35 días (**Figura 1**). El fin de la vida útil del

producto fue determinado por una carga de *L. casei* viable inferior a 10^6 UFC g⁻¹.

De igual forma, se llevó a cabo un lote control bajo las mismas condiciones detalladas anteriormente pero sin el agregado de la suspensión de *L. casei* a los efectos de realizar un análisis comparativo.

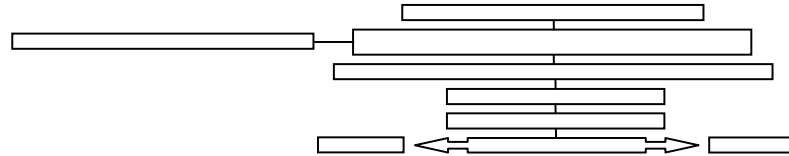
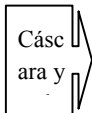


Figura 1: Diagrama de flujo de elaboración de residuo de calabaza deshidratada con *L. casei*.

Determinación de la viabilidad celular:

El recuento de células viables de *L. casei* fue realizado al final del período de fermentación, después del tratamiento de secado al vacío, y durante los 35 días de almacenamiento con el objetivo de garantizar una concentración de células viables superior al mínimo valor

recomendado por el C.A.A. Para ello, se realizaron diluciones seriadas por duplicado de 1 g de muestra en 9 ml de agua peptona estéril 0.1% (p/v) (Biokar Diagnostics, Francia). Cien µL de las diluciones seleccionadas fueron sembrados sobre placas con agar MRS (Biokar diagnostics, Francia) e incubación a 37°C durante 72 h en condiciones aeróbicas. Los resultados fueron expresados como log (UFC g⁻¹ calabaza seca), informando el valor promedio ± desvío estándar (DE) de las determinaciones. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Determinación y análisis del color:

Las determinaciones de color de las muestras durante el período de almacenamiento fueron realizadas en el espacio CIE lab: L* (0-100), a* (verde:-86,183; rojo:+98,233), b* (azul:-107,857; amarillo:+94,478) mediante un fotocolorímetro (Minolta Co. Ltd., Japón), bajo el iluminante D65 y un ángulo de observación de 2°. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado, informando el valor promedio ± DE.

A partir de los parámetros a* y b* se calculó el valor de chroma (Chr), el cuál describe la intensidad del color (Olivera *et al.* 2008):

(3)

Los valores experimentales fueron ajustados de acuerdo a una cinética de primer orden:

(4)

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para discriminar diferencias significativas entre las medias de la distintas variables dependientes estudiadas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha:0,05$) seguido de un test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Los análisis de la varianza así como los análisis de regresión fueron realizados con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06 StatPoint, Inc. 2007, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el proceso aplicado se obtuvo un polvo claro, ligeramente amarillo-anaranjado, con $a_w < 0,6$ lo que garantiza su estabilidad desde el punto de vista microbiológico (Muggeridge y Clay 2001). En todo momento, el recuento de *L. casei* se mantuvo por encima de 10^6 UFC g^{-1} calabaza, garantizando de este modo la concentración mínima de células viables exigida por el C.A.A durante el período que duró el ensayo.

Se observó que la luminosidad de los sistemas estudiados y la de sus respectivos controles incrementó durante el período de almacenamiento, lo cual significa que la matriz se aclaró conforme transcurre el tiempo. El almacenamiento a 8°C tendería a reducir la velocidad del incremento de la luminosidad con respecto al sistema almacenado a 8°C (**Figura 2**).

Figura 2: Logaritmo de la Luminosidad (L^*) en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas

almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

Debido a que el color mayoritario de la calabaza es naranja (mezcla de amarillo y rojo), la cromaticidad ($\text{Chr} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) fue calculada a fin de evaluar el cambio de su intensidad a lo largo del almacenamiento en las distintas condiciones ensayadas. La **Figura 3** muestra cómo el valor de Chr se redujo significativamente durante el período de almacenamiento en todos los casos.

Figura 3: Logaritmo de la Cromaticidad (Chr) en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

La disminución de este parámetro en la matriz vegetal estaría asociada a una degradación de los pigmentos carotenoides (Ahmed *et al.* 2002) responsables de la coloración de la calabaza. Esta reducción se vio afectada principalmente por una disminución de las componentes a^* y b^* , que se traduce en una pérdida del color rojo y amarillo respectivamente. Es así que puede observarse en la **Figura 4**, en todos los sistemas estudiados, la reducción significativa del parámetro a^* durante el período de almacenamiento.

Figura 4: Logaritmo de la coordenada a^* en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

El parámetro de b^* presentó el mismo comportamiento que a^* . Se pudo observar que los cuatro sistemas estudiados presentaron una reducción significativa ($p < 0,05$) durante el período de almacenamiento (**Figura 5**). Al igual que a^* , la pendiente de los sistemas almacenados a 22°C fue significativamente mayor que la de los sistemas a 8°C. De acuerdo a algunos autores, los carotenos sufren cambios durante el procesamiento y almacenamiento a través de la isomerización *trans/cis* de sus dobles enlaces, la pérdida de color amarillo y el incremento de la luminosidad gradual podrían estar más asociados a la isomerización *cis* de los dobles enlaces de los carotenoides (Gonzalez *et al.* 2001, Melendez-Martinez *et al.* 2004). Los compuestos con todos enlaces *trans* presentan una coloración oscura, mientras que los compuestos con todos enlaces *cis* presentan mayor luminosidad (Pereira *et al.* 2011).

Figura 5: Logaritmo de la coordenada b^* en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

En la **Tabla 1**, se muestran las constantes y bondades de los ajustes a una cinética de primer orden para cada uno de los parámetros de color evaluados. El parámetro k (días^{-1}) indica la velocidad del cambio observado y se corresponde con las pendientes de las respectivas rectas de las figuras precedentes. Al comparar cada sistema con su control, no se observaron diferencias significativas. De manera que la presencia de probióticos no estaría afectando las velocidades de cambios observadas. La componente asociada al color rojo, a^* , es la que se pierde más rápido. De manera que la componente b^* pasa a ser controlante en la intensidad de color, Chr. La velocidad de incremento de luminosidad, L^* , se encuentra un orden por debajo de las velocidades de pérdida de intensidad de color, Chr.

Por otro lado, el almacenamiento a 22°C presentó mayores ($p < 0,05$) velocidades de pérdida de la intensidad con respecto al sistema almacenado a 8°C, lo cual estaría directamente asociado con las pérdidas de color rojo y amarillo del producto.

Algunos autores como Pereira *et al.* (2011) y Garcia Maia Costa *et al.* (2013) han descrito la evaluación de color durante el proceso de fermentación con bacterias probióticas en jugos a base de frutas dónde reportaron reducción de la intensidad de color (Chr) debido a una disminución de la componente a^* y/o b^* . Sin embargo, no se encontraron resultados acerca de la evaluación de color en un residuo vegetal adicionado con bacterias probióticas y deshidratado al vacío como el del presente trabajo. El metabolismo del probiótico se encuentra inhibido en la matriz deshidratada, por la actividad de agua reducida, y en consecuencia su presencia no produciría ningún tipo de efecto sobre el color de la matriz en las condiciones aquí ensayadas.

En cuanto al efecto de la temperatura, Dutta *et al.* (2006) reportaron un incremento en la velocidad de pérdida de los beta carotenos y del color del puré de zapallo conforme aumentaba la temperatura durante el tratamiento térmico en un rango de 60°C a 100°C.

Tabla 1: Parámetros de color y bondades de ajuste para L*, a*, b* y Chr.

Parámetro de color	Co \pm σ Co	(k \pm σ k) x 10 ² (días ⁻¹)	R ²	R ² _{aj}
Chr 22°C	58 \pm 2	2,1 \pm 0,3 ^a	94,83	93,54
Chr 22°C control	57 \pm 2	2,0 \pm 0,2 ^a	97,02	96,28
Chr 8°C	54 \pm 1	1,1 \pm 0,1 ^b	97,45	96,6
Chr 8°C control	57 \pm 2	1,2 \pm 0,2 ^b	94,41	93,01
b* 22°C	57 \pm 2	2,1 \pm 0,3 ^a	94,91	93,63
b* 22°C control	56 \pm 2	2,0 \pm 0,2 ^a	97,01	96,26
b* 8°C	54 \pm 2	1,1 \pm 0,2 ^b	92,02	90,02
b* 8°C control	56 \pm 2	1,2 \pm 0,2 ^b	93,73	92,16
a* 22°C	8,9 \pm 0,7	4,3 \pm 0,7 ^a	92,05	90,06
a* 22°C control	8,9 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5 ^a	97,58	96,98
a* 8°C	10,5 \pm 0,4	2,7 \pm 0,3 ^b	97,28	96,60
a* 8°C control	11,4 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2 ^b	99,13	98,91
L* 22°C	75 \pm 1	0,28 \pm 0,07 ^a	84,22	78,97
L* 22°C control	74,8 \pm 0,9	0,29 \pm 0,06 ^a	86,06	82,58
L* 8°C	72,8 \pm 0,4	0,23 \pm 0,02 ^a	99,89	99,85
L* 8°C control	73,3 \pm 0,5	0,16 \pm 0,03 ^a	94,47	92,63

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento para un mismo parámetro de color (p<0,05).

CONCLUSIONES

En base a los valores experimentales, se determinó que los parámetros de color analizados evolucionaron de acuerdo a una cinética de primer orden. Los resultados mostraron que, para todos los sistemas, la intensidad de color, Chr, fue el parámetro más afectado. Este hecho estaría asociado, fundamentalmente, a una pérdida de color amarillo posiblemente por la degradación de los pigmentos carotenoides responsables de la coloración de la calabaza. Se pudo concluir que la presencia de *L. casei* no tuvo efecto significativo sobre la cinética de decoloración de los sistemas almacenados a 22 y 8°C. Sin embargo, se observó que la temperatura de almacenamiento afectó significativamente, siendo el sistema almacenado a 8°C el que presentó menor velocidad de la pérdida del color.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmend J, Shivhare US, Sandhu KS. 2002. Thermal Degradation Kinetics of Carotenoids and Visual Color of Papaya Puree. *Journal of Food Science*, 67 (7): 2692-2695.
- ANMAT. 2011. Resolución conjunta 261/211-22/2011.
- Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK. 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 849-859.
- Código Alimentario Argentino. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).
- de Escalada Pla MF, Ponce NM, Stortz CA, Gerschenson LN, Rojas AM. 2007. Composition and functional properties of enriched fibre products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). *LWT, Food Science and Technology*, 40: 1176-1185.
- de Escalada Pla MF, Rojas AM, Gerschenson LN. 2013. Effect of butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) fibres on bread making, quality and staling. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 828-838
- De' Nobili, MD, Curto LM, Delfino JM, Soria M, Fissore EN, Rojas AM. 2013. Performance of alginate films for retention of L-(+)-ascorbic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 95-103.
- do Espirito Santo AP, Perego P, Converti A, Oliveira MN. 2011. Influence of food matrices on probiotic viability. A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 377-385.
- Dutta D, Dutta A, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2006. Rheological characteristics and thermal degradation

- kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, 76: 538–546.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pag. 1-11.
- Garcia Maia Costa M, Vidal Fonteles T, Tibério de Jesus AL, Rodrigues S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139, 261–266.
- Genevois C, Flores S, de Escalada Pla M. 2014. Effect of iron and ascorbic acid addition on dry infusion process and final color of pumpkin tissue. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2): 563-570.
- González E, Montenegro MA, Nazareno MA, López de Mishima BA. 2001. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4): 395-399.
- Guergoletto KB, Magnani M, San Martín J, Tardeli de Jesús Andrade CG, García S. 2010. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovated Food Science and Emerging Technologies*, 11: 415-421.
- Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1–12.
- Klayraunga S, Viernsteinb H, Okonogia S. 2009. Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*, 370: 54–60
- Kongan L, Abeyá Gilardón E, Biglieri A, Mangialavori G, Calvo E, Durán. 2008. La desnutrición oculta. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud.
- Lago-Vanzela ES, do Nascimento P, Fontes EAF, Mauro MA, Kimura M. 2013. Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50: 420-425.
- Martins EF, Mota Ramos A, Silva Lago Vanzela E, Stringheta PC, de Oliveira Pinto CL, Martins JM. 2013. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51: 764-770.
- Meléndez-Martínez, Heredia FJ. 2004. Nutritional importance of carotenoid pigments. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54 (2):149-154.
- Muggeridge M, Clay M. 2001. Quality specifications for herbs and spices. In: Peter KV (eds) *Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, pag.13-21.
- Olivas GI, Barbosa-Cáneas G. 2009. Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. En: Embuscado ME, Huber KC editores. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer. Pag 211-243.
- Olivera D, Viña S, Marani C, Ferreyra R, Mugridge A, Chaves A, Mascheroni R. 2008. Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. *Gemmifera* DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 84: 148-155.
- Pereira AL, Maciel T, Rodrigues S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44: 1276-1283.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 1-16.
- Ranadheera SC, Evans CA, Adams MC, Baines SK. 2014. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell

adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods*, 8: 18–25.

Tripathy AK y Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9: 225-241.

USAID. 2006. Boletín técnico de poscosecha: Manejo poscosecha de calabaza. USAID-RED. Oficina FHIA, La Lima, Cortes, Honduras. Pag. 3.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos por el soporte financiero brindado a UBACYT GEF 2012-2014 (20020110200192) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE UN ALIMENTO FUNCIONAL A BASE DE CALABAZA FORTIFICADO CON HIERRO Y RECUBIERTO CON COBERTURA COMESTIBLE CONTENIENDO PROBIÓTICOS

Genevois C. ^(1, 2), de Escalada Pla M.F. ^(1, 2), Flores S.K. ^(1, 2)

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: CONICET, Argentina.

cgenevois@di.fcen.uba.ar

Resumen : El objetivo del presente trabajo fue evaluar las características organolépticas de un alimento funcional a base de calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) fortificado con hierro mediante un proceso de impregnación en seco y recubierto con cobertura comestible a base de hidroxipropil metilcelulosa conteniendo *Lactobacillus casei* (ATCC-393). Se evaluaron tres sistemas, A: impregnación con hierro y cobertura conteniendo *L. casei*; B: impregnación con hierro y cobertura, C: impregnación sin hierro y cobertura conteniendo *L. casei*. El producto final presentó una pérdida de agua promedio de $15\pm 3\%$ después de la impregnación; mientras que la humedad, la a_w y el pH después del secado y durante el almacenamiento fueron en promedio $28\pm 4\%$, $0,85\pm 0,01$ y $4,42\pm 0,08$, respectivamente. La viabilidad del probiótico fue de $7,31\pm 0,07$ log (UFC g^{-1} calabaza) a los 14 días. La luminosidad se mantuvo constante ($p>0,05$) durante el

almacenamiento, mientras que la intensidad del color disminuyó significativamente. Tanto la firmeza como el esfuerzo requerido para lograr la fractura del tejido disminuyeron significativamente en los sistemas con cobertura con *L. casei*. La evaluación sensorial mostró diferencias perceptibles entre A y C debido a la presencia de hierro, sin embargo, ambos productos presentaron igual aceptabilidad. La calidad microbiológica del producto cumplió con las exigencias del Código Alimentario Argentino.

Palabras clave: hierro, *Lactobacillus casei*, cobertura comestible, calabaza.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the organoleptic characteristics of a pumpkin based functional food (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) iron-fortified through a dry impregnation process and coated with edible hydroxypropyl methylcellulose containing *Lactobacillus casei* (ATCC-393). Three different systems were evaluated, A: dry impregnation with iron and edible coating containing *L. casei*; B: dry impregnation with iron and edible coating, and C: dry impregnation without iron and edible coating containing *L. casei*. The final product presented a water loss of $15\pm 3\%$ after impregnation process, while moisture, a_w and pH after drying treatment and during storage were $28\pm 4\%$, 0.852 ± 0.008 and 4.42 ± 0.08 , respectively. The viability of the probiotic bacteria was 7.31 ± 0.07 log (CFU g^{-1} pumpkin) during 14 days of storage. The luminosity was constant ($p>0.05$) during storage, while the color intensity decreased significantly. Both the firmness and the stress required to achieve fracture tissue were significantly decreased in systems covered with edible

coating containing *L. casei*. Sensory evaluation showed significant differences between A and C due to the presence of iron; however, both products were equally accepted. The microbiological quality of the product was accorded with the requirements of the Argentine Food Code.

Keywords: hierro, *Lactobacillus casei*, cobertura comestible, calabaza.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la FAO/WHO (2002), las bacterias probióticas son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas a un huésped le confieren beneficios a la salud. Múltiples estudios han descrito sus beneficios en infecciones gastrointestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, metabolismo de la lactosa, disminución del colesterol en plasma, estimulación del sistema inmune, propiedades anti-mutagénicas y anti-carcinogénicas, actividad antimicrobiana, y supresión de infección por *Helicobacter pylori* (Pereira *et al.* 2011, do Espirito Santo *et al.* 2011).

Para proveer efectos benéficos a la salud del huésped, los microorganismos probióticos deben sobrevivir su pasaje a través de las barreras gastro-intestinales en un número suficiente, tolerando los jugos gástricos, sales biliares y enzimas, y finalmente deben ser capaces de proliferar y colonizar el epitelio intestinal. Además de éstas propiedades funcionales, los probióticos deben mantener su efectividad y potencialidad a lo largo de la vida útil del producto (Saad *et al.* 2013, Ranadheera *et al.* 2014).

Por otra parte, un alimento adicionado con bacterias probióticas debe cumplir con las exigencias de la legislación local. El Código Alimentario Argentino exige un recuento de células viables entre 10^6 y 10^9 UFC g⁻¹ de alimento durante su vida útil (ANMAT, 2011).

La anemia por deficiencia de hierro es una patología que afecta tanto el desarrollo físico como intelectual de los individuos, y es considerada hasta el momento la más prevalente de las desnutriciones por carencia de nutrientes (Allen *et al.* 2006). En Argentina, la anemia por

deficiencia de hierro es aún considerada un problema de salud pública que afecta al 34,1% de niños/as menores de 2 años (ENNyS 2004-2005, Kongan *et al.* 2008).

Dentro de las estrategias efectivas contra la anemia por deficiencia de hierro, la fortificación de alimentos, es considerada hasta el momento, la práctica más sustentable y costo efectiva a largo-plazo (Zimmermann *et al.* 2007).

Asimismo, se ha comprobado que existen componentes de la dieta que favorecen la absorción del hierro-no hemínico, como es el caso del ácido ascórbico y los β -carotenos. Éstos últimos, incrementarían la absorción del hierro a través de un mecanismo que podría estar asociado a su actividad como pro-vitamina A (de Escalada Pla *et al.* 2009, Binaghi *et al.* 2005).

En Argentina, el zapallo anco es uno de los vegetales más consumidos a lo largo de todo el año, y es considerado fuente de carotenos (González *et al.* 2001). Recientemente, los investigadores del presente trabajo, pudieron ensayar diferentes estrategias para fortificar el tejido de calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiré a fin de desarrollar un alimento funcional fortificado con hierro y ácido ascórbico (Genevois *et al.* 2014).

A su vez, la aplicación de coberturas comestibles como soporte de aditivos es actualmente estudiada como una alternativa para la preservación de alimentos, ya que reducen la contaminación microbiana y actúan como barreras semipermeables a los gases y al vapor de agua. La aplicación de coberturas comestibles junto con otras tecnologías de obstáculos ayuda a preservar y/o mejorar la calidad y las características organolépticas del producto durante su vida útil. Recientemente, se ha demostrado que su aplicación en frutas y vegetales ha

mejorado la retención de color y sabor durante el almacenamiento (Campos *et al.* 2011, De'Nobili *et al.* 2013).

La celulosa es un homopolímero lineal que está compuesto por unidades de D-glucosa con enlace $\beta(1\rightarrow4)$ glucosídico. Su utilización y aplicación como cobertura comestible se encuentra limitada por su insolubilidad en agua y por su estructura asociada altamente cristalina. Sin embargo, algunos derivados de la celulosa de uso comercial como es el caso de la hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) podrían superar las limitaciones de la celulosa nativa (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2009). Actualmente, la utilización de derivados de celulosa está principalmente orientada a la investigación en la industria farmacéutica, por lo tanto, podría ser considerado como un nicho de mercado para el desarrollo e innovación de alimentos funcionales (Klayraung *et al.* 2009).

Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar las características organolépticas de un alimento funcional a base de calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) fortificado con hierro a través de un proceso de impregnación en seco y recubierto con una cobertura comestible a base de HPMC conteniendo *Lactobacillus casei* (ATCC-393).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras:

Se utilizaron calabazas *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret adquiridas en el mercado local, que fueron cuidadosamente lavadas y enjuagadas con agua destilada. Se cortaron cilindros de mesocarpio de 10 mm

de espesor por 29 mm de diámetro mediante un sacabocados, luego se escaldaron durante 7 minutos, seguido de una etapa de enfriamiento por inmersión en agua a 0°C durante 1 minuto. Seguidamente, se procedió a una impregnación en seco con glucosa, sacarosa, ácido cítrico, sorbato de potasio, y hierro (como $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), durante 48 h a 18°C con agitación orbital a 45 revoluciones por minuto (rpm), de acuerdo a la metodología descrita por Genevois *et al.*, 2014. De igual forma, se llevó a cabo un lote sin el agregado de hierro en la impregnación. Luego de alcanzar el equilibrio, las calabazas fueron escurridas y recubiertas con la cobertura comestible.

Para la preparación de los recubrimientos se utilizó HPMC (Methocel[®] E4M, Dow Chemical, USA) (28 a 30% de grupos metoxilo) al 1,6% p/p. Se formularon tres diferentes sistemas, A: impregnación con hierro y cobertura HPMC conteniendo *L. casei*, B: impregnación con hierro y cobertura HPMC, C: impregnación sin hierro y cobertura HPMC conteniendo *L. casei*.

La cobertura comestible fue formulada con HPMC 1,6% p/p., glicerol 0,5% p/p. (plastificante) y sorbato de potasio 0,03% p/p. (antimicrobiano) (Aldrich Sigma, USA).

Para vehiculizar las bacterias probióticas en la cobertura comestible, se prepararon inóculos de *L. casei* en tubos Falcon de 50 mL con 30 mL de caldo MRS estéril (Biokar diagnostics, Francia), seguido de incubación durante 18-20 h a 37°C con agitación orbital a 45 rpm (Vicking Shaker Pro, Argentina). Finalizado el período de incubación, los tubos fueron centrifugados (Eppendorf 5804 R, Alemania) durante 20 minutos a 10.000 rpm, seguido de dos lavados con solución fisiológica (glucosa 5%, NaCl 0,9%, Anedra, Argentina) estéril. Una vez obtenido el pellet, el mismo se re-suspendió en solución

fisiológica y se incorporó a la cobertura comestible de HPMC, obteniéndose una concentración final promedio de *L. casei* de $10,1 \pm 0,1 \log$ (UFC mL⁻¹) de gel. Todos los sistemas fueron secados en corriente convectiva a 46°C durante 4 h, y finalmente almacenados en bolsas de polietileno provistas de cierre fácil tipo Ziploc® a 8°C durante 14 días (**Figura 1**).

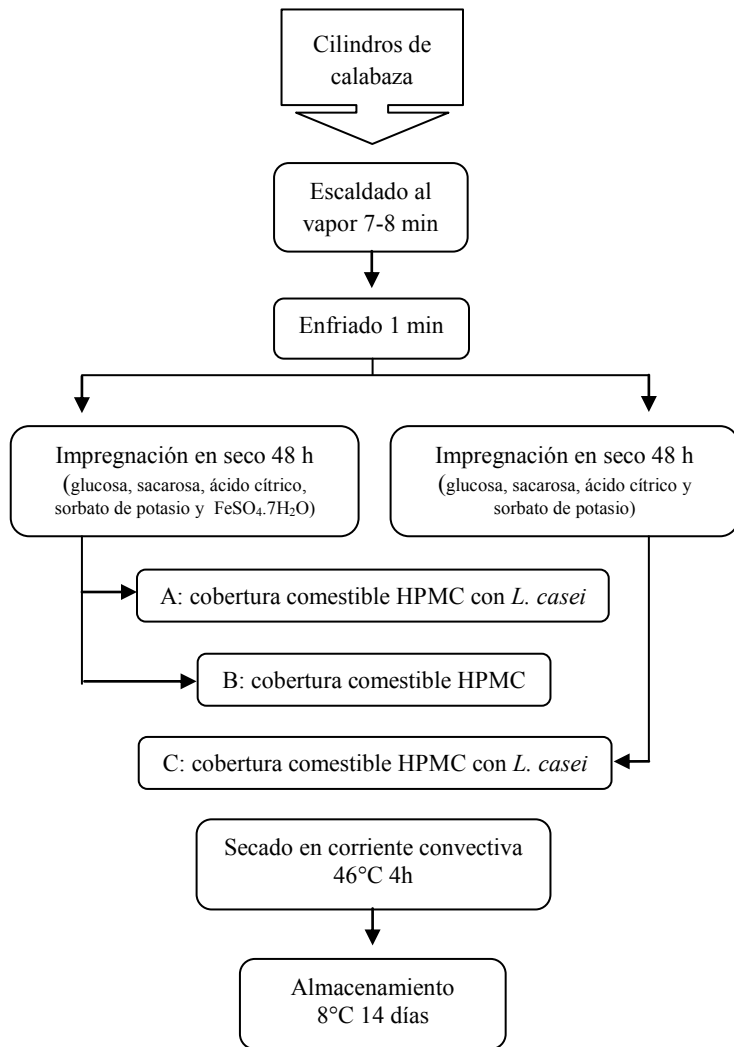


Figura 1: Diagrama de preparación de calabaza fortificada con hierro y recubierta con cobertura comestible a base de HPMC.

Caracterización física de los sistemas:

- Pérdida de agua

La pérdida de agua durante el tratamiento de secado en corriente convectiva se calculó considerando la diferencia de masa antes y después del proceso de secado.

$$Pa \text{ pérdida de agua} = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{P_{inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Dónde, P_i : masa de los cilindros de calabaza antes del secado por corriente convectiva.

P_f : masa de los cilindros después del secado por corriente convectiva.

- Actividad de agua (a_w)

La determinación de la a_w se realizó durante el almacenamiento de 14 días utilizando un higrómetro marca Aqualab Serie 3 (Washington, USA) a 25°C.

- pH

La determinación de pH se realizó mediante un electrodo de superficie combinado de vidrio Ag°/ AgCl conectado a un pH metro (Cole-Parmer, USA) durante los 14 días de almacenamiento.

- **Humedad**

La humedad relativa se determinó con un analizador de humedad (Ohaus MB-45, Suiza) utilizando un perfil de tiempo de secado de 5 minutos a 130°C seguido de una etapa de secado a 105°C hasta obtener una pérdida de humedad menor a 1 mg en 30 segundos durante los 14 días de almacenamiento.

Los resultados se expresaron en % de humedad en base húmeda:

$$\text{Humedad \%} = \frac{M_i - M_f}{M_i} \times 100 \quad (2)$$

Dónde, M_i : masa inicial antes del secado

M_f : masa final después del secado

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado en cada uno de los sistemas estudiados.

Características organolépticas y nutricionales:

- **Color**

Las determinaciones de color de las muestras antes, después del secado en corriente convectiva y durante el período de almacenamiento fueron realizadas en el espacio CIE Lab: L^* (0-100), a^* (verde:-86,183; rojo:+98,233), b^* (azul:-107,857; amarillo:+94,478) mediante un fotocolorímetro (Minolta Co. Ltd., Japón), bajo el iluminante D65 y un ángulo de observación de 2°. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado, informando el valor promedio \pm desvío estándar (DE).

A partir de los parámetros a^* y b^* se calculó el valor de chroma (Chr), el cuál describe la intensidad del color (Olivera *et al.* 2008):

$$\text{Chr} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (3)$$

- **Textura**

El análisis de textura fue realizada mediante un ensayo de compresión hasta fractura en una prensa Universal Instron Modelo 1101 (Mass, USA) equipada con una celda de carga de 500 N y un plato paralelo de compresión de 30 mm de diámetro. Se trabajó a una velocidad de cabezal de 5 mm/min y se utilizaron 4 replicados de cada sistema, informando en los resultados el valor promedio \pm DE.

Durante cada ensayo, se registró la fuerza (N) y el desplazamiento del cabezal (mm). A partir de estos datos, se calculó el esfuerzo (MPa) y el % de deformación con las ecuaciones (4) y (5), y se graficaron las curvas de esfuerzo en función del % de deformación.

$$\text{Esfuerzo (MPa)} = \frac{F}{ST} \quad (4)$$

Dónde, F: fuerza (N) requerida para deformar el tejido vegetal.

ST: sección transversal del cilindro de calabaza (mm^2).

$$\text{Deformación (\%)} = \frac{D}{A} \times 100 \quad (5)$$

Dónde, D: desplazamiento en mm del cabezal.
A: altura (mm) inicial del cilindro de calabaza.

A partir de la curva obtenida, se determinaron el esfuerzo (MPa) y la deformación (%) en el punto de fractura. A su vez, se calculó la firmeza (MPa) de cada muestra como el cociente entre el esfuerzo y la deformación previamente mencionados.

- **Ensayo sensorial**

La evaluación sensorial se llevó a cabo utilizando un método discriminativo a través de una Prueba Triangular con el objetivo de determinar si el producto fortificado y recubierto con cobertura comestible con probióticos (sistema A) era diferenciado del producto sin fortificar (sistema C) y recubierto con probióticos. Este método es recomendado para determinar diferencias en productos con cambios en los ingredientes, procesamiento o almacenamiento, o bien para determinar diferencias globales (Pedrero y Pangborn, 1989). Existen numerosos estudios, dónde la adición de fuentes de hierro en los alimentos producen cambios indeseables principalmente en el color y sabor, afectando de forma negativa la aceptación del producto por parte del consumidor (Zimmermann *et al.* 2007). Seguidamente, se aplicó un método afectivo utilizando una Escala Hedónica

En ambas pruebas se utilizó un n=60 y se trabajó con un nivel de significancia de 95%.

En la Prueba Triangular, las muestras se codificaron en 6 diferentes combinaciones y cada una se presentó en un orden aleatorio y balanceado 10 veces para cubrir los 60 panelistas. Cada panelista recibió un set de 3 muestras

codificadas, informándole que dos muestras eran similares y una diferente. Se le solicitó que eligiera la muestra diferente y justifique su elección (BS ISO 4120:2004).

La Escala Hedónica utilizada fue discreta de 7 puntos horizontales, con un punto central neutro y 3 categorías negativas y positivas a cada lado. Los descriptores utilizados van desde “*me agrada mucho*” hasta “*me desagradaba mucho*” (BS ISO 4121:2003).

- **Viabilidad de *Lactobacillus casei***

El recuento de células viables probióticas fue realizado por duplicado en la cobertura comestible antes de su aplicación, y en cada uno de los sistemas luego del período de secado y a los 14 días de almacenamiento. En una primera dilución, cuatro gramos de cada sistema fueron colocados en bolsas estériles y homogeneizados en un equipo tipo Stomacher® con agua peptona estéril 0.1% (p/v) (Biokar Diagnostics, Francia) durante 2 min a 35 rpm. El número de *L. casei* viables fue determinado mediante el recuento en profundidad de diluciones seriadas hasta 10^{-8} en placas con agar MRS (Biokar diagnostics, Francia). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 72 h en condiciones aeróbicas. Los resultados fueron expresados como log UFC g⁻¹ calabaza seca, informando el valor promedio ± DE de las determinaciones.

Calidad microbiológica

Para determinar la inocuidad y estabilidad microbiológica de los sistemas estudiados, se realizaron—diluciones seriadas por duplicado en agua peptona al día 1 y 14 de

almacenamiento y se llevaron a cabo los siguientes recuentos:

- Bacterias coliformes totales con agar bilis rojo neutro cristal violeta lactosa (AVRB-L) (Biokar Diagnostics, Francia), incubando las placas a 37°C durante 24 h.
- Hongos y levaduras en agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Francia), incubando las placas a 25°C durante 5 días.

Análisis estadístico

Para establecer diferencias significativas entre las muestras, se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha:0,05$) seguido por una prueba de múltiples rangos con un test de Fisher (LSD), utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06 StatPoint, Inc. 2007, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físicas del producto:

Después del tratamiento de secado en corriente convectiva, la pérdida de agua fue en promedio de $15\pm 3\%$. La a_w promedio durante el período de almacenamiento fue de $0,85\pm 0,01$, y el pH superficial promedio de $4,40\pm 0,03$. La actividad metabólica de las bacterias probióticas se caracteriza por metabolizar los azúcares presentes y producir ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, que reducen el pH del medio. En este caso, no se observaron cambios durante el almacenamiento en el pH superficial, lo cual podría

traducirse como una actividad metabólica reducida debido a la inmovilización del probiótico en la matriz biopolimérica.

La humedad porcentual presentó valores promedio de 23 ± 2 después del tratamiento de secado y 28 ± 3 a los 14 días de almacenamiento.

Características organolépticas y nutricionales del producto:

El contenido de *L. casei* en la cobertura comestible a base de HPMC presentó un recuento de células viables de $10,1\pm 0,1$ log (UFC mL⁻¹ de gel). Luego de la aplicación de la cobertura comestible y del secado en corriente convectiva la viabilidad del probiótico fue de $8,9\pm 0,2$ y $8,5\pm 0,1$ log (UFC g⁻¹ calabaza) en el sistema A y C, respectivamente. A los 14 días de almacenamiento, el recuento de *L. casei* fue de $7,30\pm 0,07$ y $8,6\pm 0,2$ log (UFC g⁻¹ calabaza), siendo estos valores superiores al mínimo recuento exigido por el C.A.A.

Los valores tanto de coliformes como de hongos y levaduras, también se encuadraron dentro de la normativa vigente, mostrando de este modo la inocuidad del producto obtenido con el método aplicado,

Con respecto a los parámetros de color, se pudo observar que la luminosidad de los tres sistemas se mantuvo constante ($p>0,05$) durante el período de almacenamiento. Los sistemas A y B presentaron valores similares de L* durante el almacenamiento, mientras que el sistema C presentó una tendencia a valores más bajos de luminosidad entre los días 1 y 14, siendo significativa dicha disminución al final del ensayo, en comparación con los sistemas A y B (**Figura 2**).

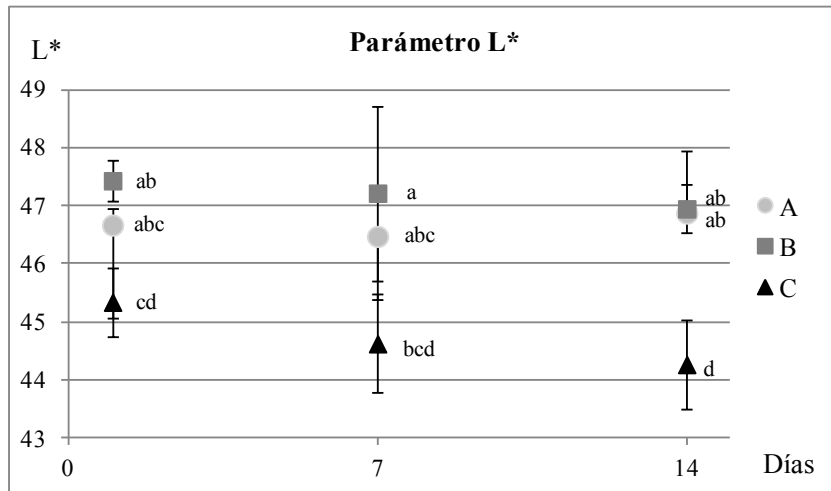


Figura 2: Parámetro de luminosidad.

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas y durante el período de almacenamiento.

Como se puede observar en la **Figura 3**, el valor de chr, que se refiere a la intensidad del color, se redujo significativamente a partir de los 7 días de almacenamiento en los sistemas B y C. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento, todos los sistemas presentaron una reducción significativa del color respecto del valor inicial. Esta reducción se vio afectada principalmente por una disminución de la componente b* (**Figura 4**), que se traduce en una pérdida del color amarillo posiblemente asociada a la degradación de los pigmentos carotenoides responsables de la coloración de la calabaza.

Durante el tratamiento de secado, los carotenos pueden ser degradados al ser expuestos al calor y al oxígeno, y por lo tanto, se produciría un incremento de los isómeros *cis*. A su vez, este fenómeno estaría directamente

asociado a una mayor pérdida de actividad como provitamina A, y alteración de la bioaccesibilidad y bioconversión de los carotenos (Genevois *et al.* 2014, González *et al.* 2001, Lago-Vanzela *et al.* 2013). Por lo tanto, la aplicación de coberturas comestibles como estrategia para preservar y/o mejorar las características organolépticas y nutricionales del producto, también mejoraría la retención de compuestos carotenoides debido a su capacidad de actuar como barrera contra el oxígeno (Lago-Vanzela *et al.* 2013).

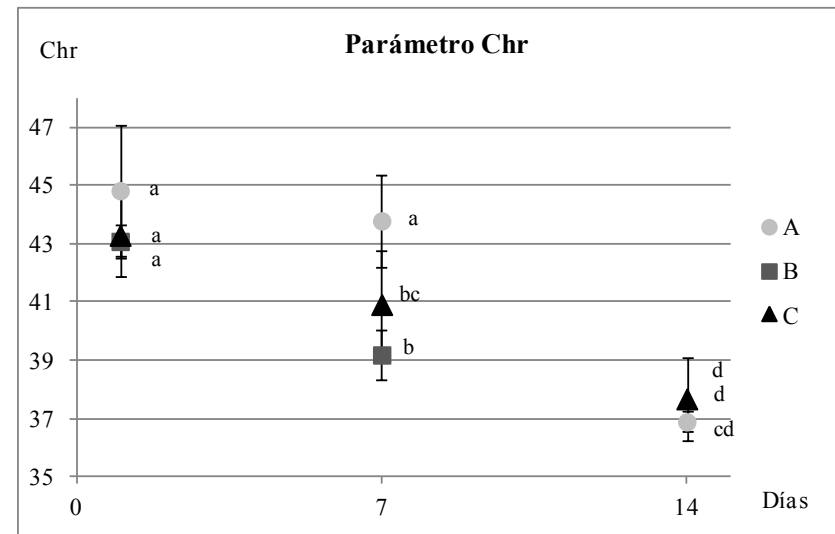


Figura 3: Parámetro de chroma.

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas y durante el período de almacenamiento.

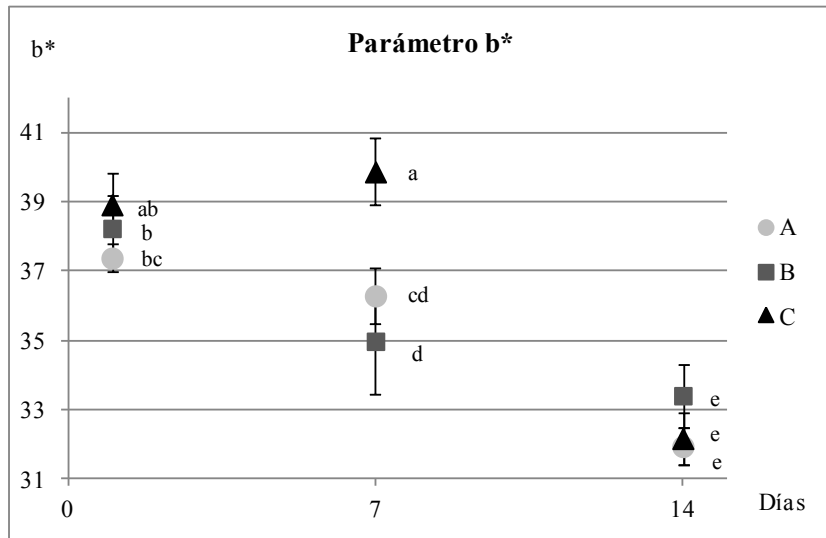


Figura 4: Parámetro de b*.

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre sistemas y durante el período de almacenamiento.

Con respecto a las propiedades de textura, se pudo observar que no hubo diferencias ($p > 0,05$) en el porcentaje de deformación entre los sistemas impregnados con hierro (A y B), y entre los sistemas recubiertos con cobertura comestible con probióticos (A y C). Mientras que, la firmeza y el esfuerzo máximo requerido para lograr la fractura del tejido fueron significativamente menores en los sistemas que contenían cobertura con *L. casei* (A y C). De esta forma, el sistema que fue impregnado con hierro y recubierto con cobertura sin probióticos (B) presentó mayor ($p < 0,05$) firmeza y requirió de mayor esfuerzo para lograr la ruptura del tejido (**Tabla 1**).

De acuerdo a Tapia *et al.* (2007), la presencia de probióticos en coberturas a base de alginato y gelano

aplicado en frutas mínimamente procesadas, produciría un incremento de los espacios entre las cadenas poliméricas, aumentando de esta forma la difusividad a través de la cobertura y acelerando la transmisión de agua. Este efecto plastificante podría, en parte, explicar un aumento de la plasticidad y la consecuente reducción de la firmeza del producto al encontrarse los probióticos presentes en la cobertura.

Tabla 1: Parámetros del ensayo de compresión hasta fractura.

Sistema	Esfuerzo (MPa)	Deformación (%)	Firmeza (MPa)
A	0,30±0,12 ^a	0,86±0,10 ^{ab}	0,36±0,18 ^a
B	0,69±0,28 ^b	0,76±0,03 ^a	0,89±0,30 ^b
C	0,22±0,06 ^a	0,84±0,16 ^b	0,28±0,14 ^a

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre sistemas.

Las curvas típicas de esfuerzo vs deformación de los tres sistemas estudiados a tiempo inicial se muestran en la **Figura 5**.

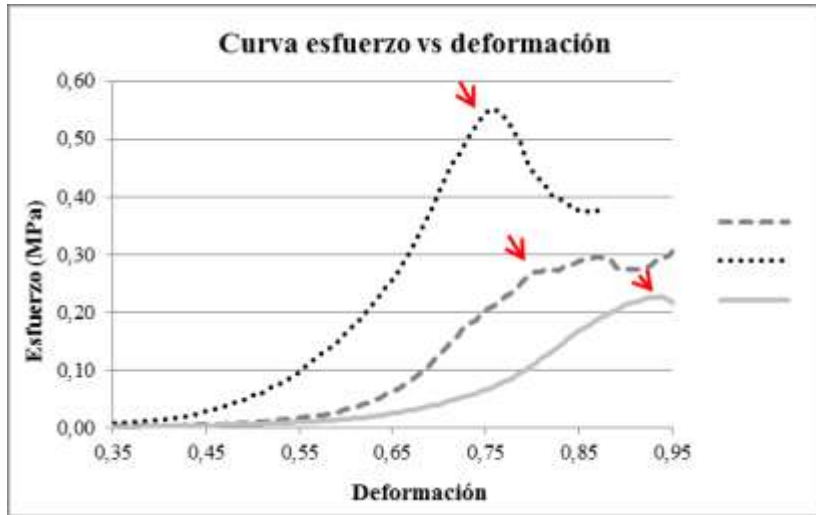


Figura 5: Curvas típicas de esfuerzo vs deformación de los tres sistemas estudiados a tiempo inicial.

En la **Figura 6** se presentan las imágenes de los tres sistemas evaluados al final del período de almacenamiento.

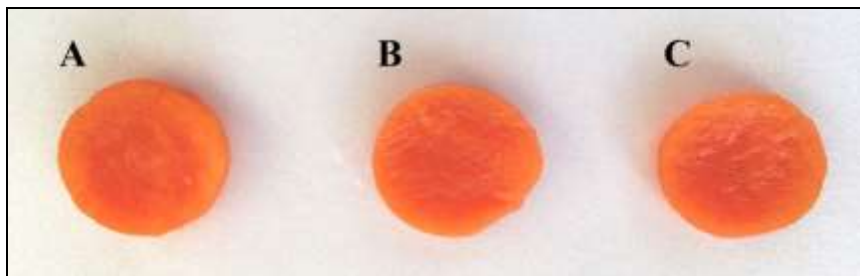


Figura 6: Sistemas A, B y C al final del período de almacenamiento.

De acuerdo a la Organización Internacional de Normalización Británica (ISO 4120:2004), para un total de

60 panelistas se requieren 27 respuestas correctas para concluir que existe una diferencia perceptible con un nivel de significancia del 95%.

A partir de los resultados obtenidos, 28 panelistas (46,7%) encontraron diferencias entre los productos, mientras que 32 panelistas (53,3%) no pudieron encontrar diferencias entre los sistemas A y C, por lo tanto, ambas muestras fueron percibidas diferentes ($p < 0,05$) debido a la presencia de hierro.

Sin embargo, en la apreciación en la Escala Hedónica, tanto el sistema A como el C presentaron en promedio $5,45 \pm 0,92$ y $5,37 \pm 1,01$ de 7 puntos, respectivamente, y ambos fueron igualmente clasificados como "me gusta un poco". La prueba t aplicada para ambos productos demostró que los dos productos fueron igualmente aceptados ($p > 0,05$) por los consumidores.

Calidad microbiológica del producto:

La calidad microbiológica del producto al inicio y final del período de almacenamiento se llevó a cabo mediante el recuento de bacterias coliformes y hongos y levaduras como indicadores de la calidad higiénica del proceso. Tanto el recuento de bacterias coliformes como el de hongos y levaduras, fueron $< 10 \text{ UFC g}^{-1}$ calabaza durante el período de almacenamiento, cumpliendo de esta forma con las exigencias del Código Alimentario Argentino en su artículo 1340.

CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que todos los sistemas estudiados no presentaron pérdida de la luminosidad durante los 14 días de almacenamiento, sin embargo la intensidad del color representada por el valor de chroma se redujo significativamente. Los sistemas que contenían *L. casei* en la cobertura comestible presentaron menor firmeza, y por ende requirieron de menor esfuerzo para la deformación. La aceptabilidad de los sistemas fortificados con hierro fue igualmente calificada como "me gusta un poco" a pesar de que fueron percibidos como diferentes debido a la presencia de hierro. La calidad microbiológica de los sistemas estuvo por debajo de los límites establecidos para garantizar la seguridad e inocuidad del producto según al C.A.A.

De acuerdo a nuestros cálculos, el producto final fortificado con hierro y recubierto con una cobertura comestible a base de HPMC conteniendo probióticos aportaría en promedio por cada gramo de calabaza $0,18 \pm 0,04$ mg de hierro y $7,31 \pm 0,07$ log (UFC g⁻¹) de *L. casei*.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen L, Benoist B, Dary O, Hurrell R. 2006. Guidelines on food fortification with micronutrients. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, pag 3-122.
- ANMAT. 2011. Resolución conjunta 261/211-22/2011.
- Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS). 2004-2005. Ministerio de Salud. Argentina.
- Binaghi MJ, Greco CB, López LB, Ronayne PA, Valencia ME. 2005. Influencia de distintos componentes de la dieta sobre la biodisponibilidad potencial de hierro. Actas del X Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Mar del Plata, Argentina. ISBN: 987-22165-1-7, 2006.
- BS ISO 4120:2004. Sensory Analysis-Methodology- Triangle Test.
- BS ISO 4121:2003. Sensory Analysis-Guidelines for the use of quantitative response scales.
- Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK. 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. Food and Bioprocess Technology, 4: 849-859.
- Código Alimentario Argentino. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).
- de Escalada Pla MF, Campos C, Gerchenson L. 2009. Pumpkin (*Curcubita moschata* Duchesne ex Poiret) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. Journal of Food Engineering, 92: 361-369.
- De' Nobili, MD, Curto LM, Delfino JM, Soria M, Fissore EN, Rojas AM. 2013. Performance of alginate films for

- retention of L-(+)-ascorbic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 95-103.
- do Espirito Santo AP, Perego P, Converti A, Oliveira MN. 2011. Influence of food matrices on probiotic viability. A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 377-385.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pag. 1-11.
- Genevois C, Flores S, de Escalada Pla M. 2014. Effect of iron and ascorbic acid addition on dry infusion process and final color of pumpkin tissue. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2): 563-570.
- González E, Montenegro MA, Nazareno MA, López de Mishima BA. 2001. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4): 395-399.
- Guergoletto KB, Magnani M, San Martín J, Tardeli de Jesús Andrade CG, García S. 2010. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovated Food Science and Emerging Technologies*, 11: 415-421.
- Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1-12.
- Klayraung S, Viernstein H, Okonogi S. 2009. Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*, 370: 54-60
- Kongan L, Abeyá Gilardón E, Biglieri A, Mangialavori G, Calvo E, Durán. 2008. La desnutrición oculta. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud.
- Lago-Vanzela ES, do Nascimento P, Fontes EAF, Mauro MA, Kimura M. 2013. Edible coatings from native and modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50: 420-425.
- Olivas GI, Barbosa-Cáneas G. 2009. Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. En: Embuscado ME, Huber KC editores. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer. Pag 211-243.
- Olivera D, Viña S, Marani C, Ferreyra R, Mugridge A, Chaves A, Mascheroni R. 2008. Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. *Gemmifera* DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 84: 148-155.
- Pedrero DL y Pangborn RM. 1989. Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos. México: Ed. Alhambra Mexicana. 251 páginas. ISBN: 9684440936.
- Pereira AL, Maciel T, Rodrigues S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44: 1276-1283.
- Saad N, Delattre C, UrdaciM, Schmitter JM, Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*: 50, 1-16.
- Ranadheera SC, Evans CA, Adams MC, Baines SK. 2014. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods*, 8: 18-25.
- Tapia MS, Rojas-Graü MA, Rodríguez FJ, Ramírez J, Carmona A, Martín-Belloso O. 2007. Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. *Journal of Food Science*, 72(4): 190-196.
- Zimmermann M, Hurrell RF. 2007. Nutritional iron deficiency. *The Lancet*, 370: 511-20.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos por el soporte financiero brindado a UBACYT GEF 2012-2014 (20020110200192) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

EFFECTO DE LA PRESENCIA DE *LACTOBACILLUS CASEI* Y DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO EN EL COLOR DE CALABAZA DESHIDRATADA

Genevois C.^{1,2}, Flores S.K.^{1,2}, de Escalada Pla M.F.^{1,2}

1: Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.

2: CONICET, Argentina.

cgenevois@di.fcen.uba.ar

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de la presencia de *Lactobacillus casei* (ATCC-393) en el color de un ingrediente funcional a base calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). La vida útil del producto fue determinada por una carga de *L. casei* viable inferior a 10^6 UFC g/producto. Durante los 35 días de almacenamiento, se evaluó el color en el espacio CIE Lab y se calculó el valor de chroma a dos temperaturas diferentes (22°C/8°C). De igual forma, se llevó a cabo un sistema control pero sin *L. casei*. Los valores experimentales de color evolucionaron de acuerdo a una cinética de primer orden. En todos los sistemas se observó un incremento de la luminosidad durante el almacenamiento. Tanto la cromaticidad (Chr) como los valores de a^* y de b^* , disminuyeron durante el almacenamiento. La velocidad de disminución fue significativamente mayor a 22°C, lo cual estaría asociado a una pérdida de color rojo-amarillo por degradación de los compuestos carotenoides. Por otro lado, no se observaron diferencias debido a la presencia de

probióticos. Se pudo concluir que la presencia de *L. casei* no afectó la cinética de decoloración de los sistemas almacenados a 22 y 8°C. Sin embargo, el almacenamiento a 8°C redujo significativamente la velocidad de pérdida de color.

Palabras clave: alimentos funcionales, color, *Lactobacillus casei*, calabaza.

Abstract: The aim of the present work was to analyze the effect of *Lactobacillus casei* (ATCC-393) presence, on the color of a functional ingredient based on pumpkin (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret). The shelf life of the product was determined by a viable *L. casei* count lower than 10^6 UFC/g of product. The color in a CIE Lab space was evaluated on the final product during 35 storage days and also chroma value was calculated at two different temperatures (22°C and 8°C). Additionally, a control system without *L. casei* was performed. Experimental data of color fitted to a first order kinetic. In all cases, an increase in the luminosity was observed during storage. The chromaticity (Chr) as well as a^* and b^* parameters decreased during storage. Decreasing rate was significantly higher at 22°C. It would be related to the loss of the red-yellow color by degradation of carotenoids compounds. On the other hand, no differences were observed due to probiotic presence. It could be concluded that *L. casei* presence did not affect the kinetic of the loss of systems color at 22 and 8°C. Nevertheless, the storage at 8°C significantly reduced the rate of color loss.

Keywords: functional foods, color, *Lactobacillus casei*, pumpkin.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a la FAO/WHO (2002), las bacterias probióticas son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas a un huésped le confieren beneficios a la salud. Múltiples estudios han descrito sus beneficios en infecciones gastrointestinales, enfermedades inflamatorias intestinales, metabolismo de la lactosa, disminución del colesterol en plasma, estimulación del sistema inmune, propiedades anti-mutagénicas y anti-carcinogénicas, actividad antimicrobiana, y supresión de infección por *Helicobacter pylori* (Pereira *et al.* 2011, do Espirito Santo *et al.* 2011).

Existe un consenso general acerca de la importancia de la microflora intestinal en la salud y en el bienestar de los seres humanos y animales (Senaka *et al.* 2013). La modulación de la microflora del huésped se logra a través de la administración o consumo de microorganismos probióticos y/o fibras prebióticas. Los microorganismos probióticos deben mantener su efectividad y potencialidad a lo largo de la vida útil del producto, y una vez ingeridos por el individuo deben tener la habilidad de resistir los jugos gástricos y la exposición a las sales biliares. Más aún, deben ser capaces de proliferar y colonizar el epitelio intestinal (Saad *et al.* 2013).

Actualmente, los microorganismos probióticos más utilizados en el mercado pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo los productos lácteos como yogures o leches fermentadas los más utilizados como matrices soporte de estos

microorganismos. Sin embargo, existe un creciente interés en el desarrollo de productos que puedan ser consumidos por individuos con dislipemias, intolerancia a la lactosa, o vegetarianos (Martins *et al.* 2013). Por lo tanto, el desarrollo de productos probióticos utilizando matrices vegetales es aún un desafío pendiente en el segmento de alimentos funcionales, y para ello es necesario evaluar el crecimiento, la viabilidad, y la funcionalidad del probiótico en la matriz del alimento, así como también el efecto de los factores extrínsecos e intrínsecos del alimento (Guergoletto *et al.* 2010, Martins *et al.* 2013).

Hasta el momento, existe poca información sobre el efecto de la adición de probióticos a matrices vegetales, y entre las matrices más estudiadas se encuentran los jugos a base de fruta, frutas o vegetales mínimamente procesados, snacks, y bebidas a base de cereales (Martins *et al.* 2013, Pereira *et al.* 2011).

Debido a que los métodos de preservación afectan la viabilidad de los microorganismos probióticos, es necesario optimizar los procesos a fin de garantizar durante la vida útil del producto una carga de células viables entre 10^6 y 10^9 UFC g^{-1} de alimento con el objetivo de cumplir con las exigencias de la legislación local (ANMAT, 2011).

En otro aspecto, los procesos industriales como la elaboración de sopas y caldos instantáneos, o la producción de conservas suelen generar gran cantidad de residuos sólidos que se destinan generalmente a la alimentación de ganado o como abonos orgánicos. En cuanto a la calabaza, incluso el manejo pos cosecha es importante debido a que las pérdidas pueden llegar al 100% del cultivo por problemas de daño mecánico, pudrición y/o deshidratación (USAID, 2006). Los

integrantes del presente proyecto han estudiado ampliamente este tejido. Se buscaron formas de aprovechar la cáscara y partes de la calabaza no utilizadas en los procesos involucrados, para la elaboración de fibra dietaria de buena funcionalidad (de Escalada Pla *et al.*, 2007a, 2013b); sin embargo queda el desafío pendiente de agregarle mayor valor a esta cadena productiva aun poco desarrollada. Cabe destacar que la calabaza *Cucurbita moschata* o Butternut se cultiva ampliamente en todo el país a lo largo de todo el año.

De esta forma, el presente trabajo tiene como objetivo analizar el efecto de la presencia de *Lactobacillus casei* (ATCC-393) en el color de un ingrediente funcional a base calabaza (*Cucurbita moschata*, Duchesne ex Poiret) deshidratado al vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

Preparación del residuo de calabaza deshidratado:

La calabaza *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret, adquirida en un supermercado local, fue cuidadosamente lavada en su superficie con detergente y agua potable, y finalmente enjuagada con agua destilada. Las calabazas fueron cortadas longitudinalmente en forma paralela a su eje longitudinal. La pulpa fue separada para otros ensayos mientras que la cáscara con algo de pulpa remanente, una relación aproximada de 70/30, fue destinada para este trabajo. Cáscara y pulpa remanente, fueron procesadas con un molino (C6-0700, China). Finalmente, la calabaza triturada fue secada al vacío (Martin Christ Alpha 1-4 LSD, Alemania) durante 24 h y almacenada a -18°C hasta su utilización.

Preparación del inóculo inicial de *L. casei*:

Se preparó un inóculo inicial a partir de estrías de *L. casei* ATCC-393 en un erlenmeyer de 250 mL conteniendo 30 mL de caldo MRS estéril (Biokar Diagnostics, Francia). El crecimiento del inóculo se llevó a cabo en una incubadora (I-290, INGELAB, Argentina) durante 18-20 h a 37°C con agitación orbital (Vicking Shaker Pro, Argentina) a 45 rpm. La concentración final aproximada de *L. casei* fue de 10^9 UFC mL⁻¹, siendo luego utilizado para inocular los frascos de 500 mL conteniendo el residuo de calabaza.

Preparación de residuo de calabaza con probióticos:

Brevemente, en dos frascos de 500 mL se colocaron 10 g del residuo de calabaza deshidratado junto con agua destilada, se procedió a esterilizar el material a 121°C durante 15 minutos. Seguidamente, cada frasco se inoculó con el inóculo inicial descrito previamente, y luego fueron incubados durante 24 h a 37°C con agitación orbital (Vicking Shaker Pro, Argentina) a 45 revoluciones por minuto (rpm). Finalizado el período de fermentación, el material fue centrifugado y el pellet obtenido fue lavado dos veces con solución fisiológica (glucosa 5%, NaCl 0,9%), centrifugado a 10.000 rpm durante 15 minutos y secado al vacío (Christ 1-4 LD, Germany) durante 24 h. Una vez obtenido el residuo sólido, éste fue tamizado con una malla ASTM 40 con apertura de poro de 420 micrones, envasado en tubos Falcon de 50 mL y cerrados herméticamente para ser almacenados a dos temperaturas diferentes (22°C y 8°C) durante 35 días (**Figura 1**). El fin de la vida útil del

producto fue determinado por una carga de *L. casei* viable inferior a 10^6 UFC g^{-1} .

De igual forma, se llevó a cabo un lote control bajo las mismas condiciones detalladas anteriormente pero sin el agregado de la suspensión de *L. casei* a los efectos de realizar un análisis comparativo.

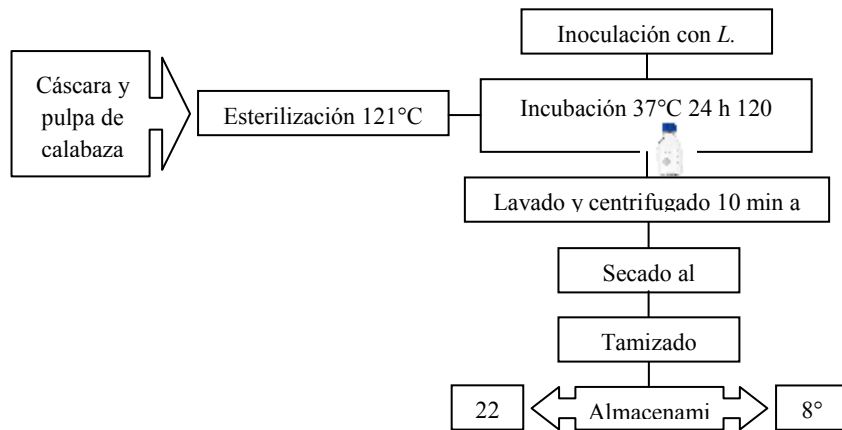


Figura 1: Diagrama de flujo de elaboración de residuo de calabaza deshidratada con *L. casei*.

Determinación de la viabilidad celular:

El recuento de células viables de *L. casei* fue realizado al final del período de fermentación, después del tratamiento de secado al vacío, y durante los 35 días de almacenamiento con el objetivo de garantizar una concentración de células viables superior al mínimo valor recomendado por el C.A.A. Para ello, se realizaron diluciones seriadas por duplicado de 1 g de muestra en 9

ml de agua peptona estéril 0.1% (p/v) (Biokar Diagnostics, Francia). Cien μ L de las diluciones seleccionadas fueron sembrados sobre placas con agar MRS (Biokar diagnostics, Francia) e incubación a 37°C durante 72 h en condiciones aeróbicas. Los resultados fueron expresados como \log (UFC g^{-1} calabaza seca), informando el valor promedio \pm desvío estándar (DE) de las determinaciones. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

Determinación y análisis del color:

Las determinaciones de color de las muestras durante el período de almacenamiento fueron realizadas en el espacio CIE lab: L^* (0-100), a^* (verde:-86,183; rojo:+98,233), b^* (azul:-107,857; amarillo:+94,478) mediante un fotocolorímetro (Minolta Co. Ltd., Japón), bajo el iluminante D65 y un ángulo de observación de 2° . Las mediciones se realizaron por cuadruplicado, informando el valor promedio \pm DE.

A partir de los parámetros a^* y b^* se calculó el valor de chroma (Chr), el cuál describe la intensidad del color (Olivera *et al.* 2008):

$$\text{Chr} = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (3)$$

Los valores experimentales fueron ajustados de acuerdo a una cinética de primer orden:

$$\ln \text{ parámetro color} = \ln C_0 - k * \text{ tiempo} \quad (4)$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para discriminar diferencias significativas entre las medias de las distintas variables dependientes estudiadas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA, $\alpha:0,05$) seguido de un test de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher.

Los análisis de la varianza así como los análisis de regresión fueron realizados con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06 StatPoint, Inc. 2007, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el proceso aplicado se obtuvo un polvo claro, ligeramente amarillo-anaranjado, con $a_w < 0,6$ lo que garantiza su estabilidad desde el punto de vista microbiológico (Muggeridge y Clay 2001). En todo momento, el recuento de *L. casei* se mantuvo por encima de 10^6 UFC g^{-1} calabaza, garantizando de este modo la concentración mínima de células viables exigida por el C.A.A durante el período que duró el ensayo.

Se observó que la luminosidad de los sistemas estudiados y la de sus respectivos controles incrementó durante el período de almacenamiento, lo cual significa que la matriz se aclaró conforme transcurre el tiempo. El almacenamiento a 8°C tendería a reducir la velocidad del incremento de la luminosidad con respecto al sistema almacenado a 8°C (**Figura 2**).

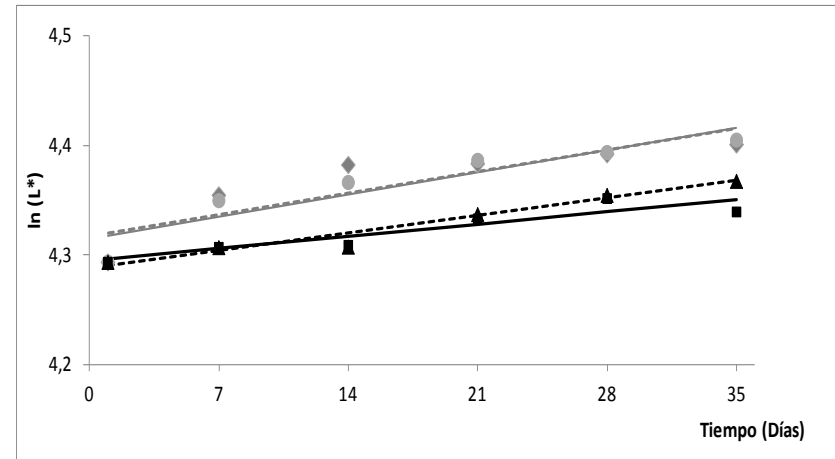


Figura 2: Logaritmo de la Luminosidad (L^*) en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

Debido a que el color mayoritario de la calabaza es naranja (mezcla de amarillo y rojo), la cromaticidad ($\text{Chr} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) fue calculada a fin de evaluar el cambio de su intensidad a lo largo del almacenamiento en las distintas condiciones ensayadas. La **Figura 3** muestra cómo el valor de Chr se redujo significativamente durante el período de almacenamiento en todos los casos.

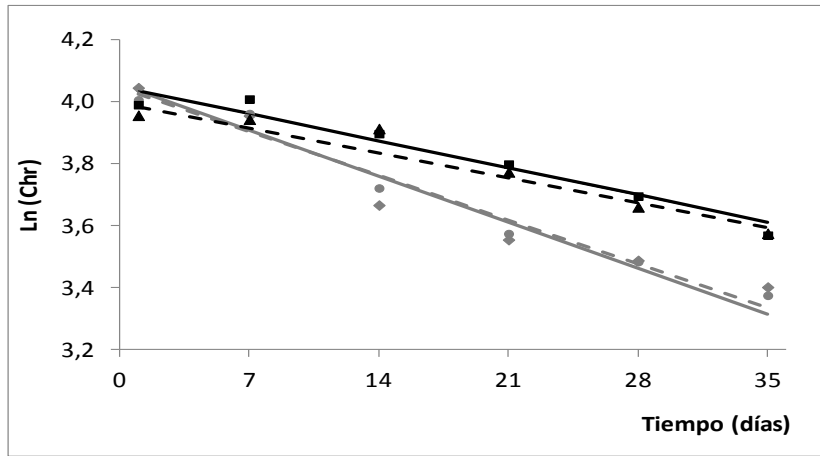


Figura 3: Logaritmo de la Cromaticidad (Chr) en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

La disminución de este parámetro en la matriz vegetal estaría asociada a una degradación de los pigmentos carotenoides (Ahmed *et al.* 2002) responsables de la coloración de la calabaza. Esta reducción se vio afectada principalmente por una disminución de las componentes a^* y b^* , que se traduce en una pérdida del color rojo y amarillo respectivamente. Es así que puede observarse en la **Figura 4**, en todos los sistemas estudiados, la reducción significativa del parámetro a^* durante el período de almacenamiento.

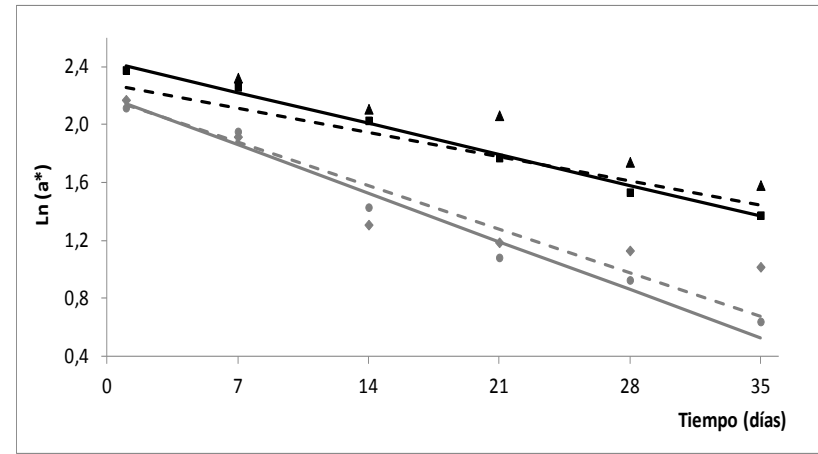


Figura 4: Logaritmo de la coordenada a^* en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

El parámetro de b^* presentó el mismo comportamiento que a^* . Se pudo observar que los cuatro sistemas estudiados presentaron una reducción significativa ($p < 0,05$) durante el período de almacenamiento (**Figura 5**). Al igual que a^* , la pendiente de los sistemas almacenados a 22°C fue significativamente mayor que la de los sistemas a 8°C. De acuerdo a algunos autores, los carotenos sufren cambios durante el procesamiento y almacenamiento a través de la isomerización *trans/cis* de sus dobles enlaces, la pérdida de color amarillo y el incremento de la luminosidad gradual podrían estar más asociados a la isomerización *cis* de los dobles enlaces de los carotenoides (Gonzalez *et al.* 2001, Melendez-Martinez *et al.* 2004). Los compuestos con todos enlaces

trans presentan una coloración oscura, mientras que los compuestos con todos enlaces *cis* presentan mayor luminosidad (Pereira *et al.* 2011).

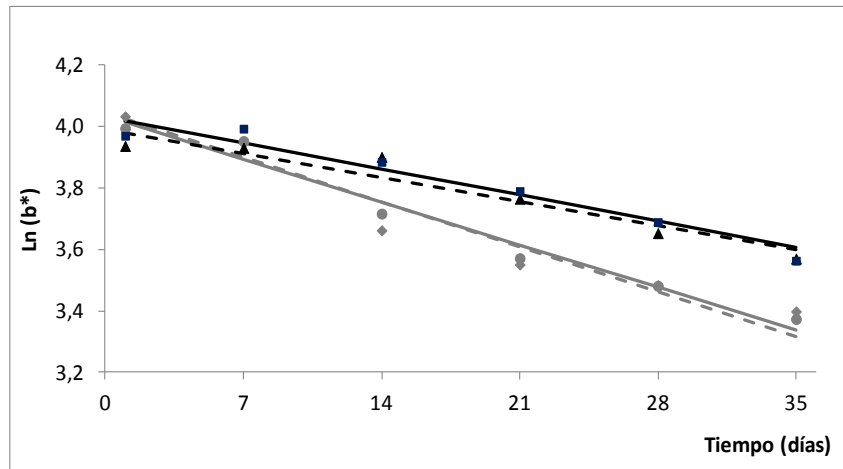


Figura 5: Logaritmo de la coordenada b^* en función del tiempo de almacenamiento para los sistemas almacenados a 8°C en negro ▲; 8°C Control ■; y 22°C en gris ◆; 22°C Control●. Las líneas representan el ajuste de 1er. orden. Líneas continuas representan los sistemas controles.

En la **Tabla 1**, se muestran las constantes y bondades de los ajustes a una cinética de primer orden para cada uno de los parámetros de color evaluados. El parámetro k (días^{-1}) indica la velocidad del cambio observado y se corresponde con las pendientes de las respectivas rectas de las figuras precedentes. Al comparar cada sistema con su control, no se observaron diferencias significativas. De manera que la presencia de probióticos no estaría afectando las velocidades de cambios observadas. La

componente asociada al color rojo, a^* , es la que se pierde más rápido. De manera que la componente b^* pasa a ser controlante en la intensidad de color, Chr. La velocidad de incremento de luminosidad, L^* , se encuentra un orden por debajo de las velocidades de pérdida de intensidad de color, Chr.

Por otro lado, el almacenamiento a 22°C presentó mayores ($p < 0,05$) velocidades de pérdida de la intensidad con respecto al sistema almacenado a 8°C, lo cual estaría directamente asociado con las pérdidas de color rojo y amarillo del producto.

Algunos autores como Pereira *et al.* (2011) y García Maia Costa *et al.* (2013) han descrito la evaluación de color durante el proceso de fermentación con bacterias probióticas en jugos a base de frutas donde reportaron reducción de la intensidad de color (Chr) debido a una disminución de la componente a^* y/o b^* . Sin embargo, no se encontraron resultados acerca de la evaluación de color en un residuo vegetal adicionado con bacterias probióticas y deshidratado al vacío como el del presente trabajo. El metabolismo del probiótico se encuentra inhibido en la matriz deshidratada, por la actividad de agua reducida, y en consecuencia su presencia no produciría ningún tipo de efecto sobre el color de la matriz en las condiciones aquí ensayadas.

En cuanto al efecto de la temperatura, Dutta *et al.* (2006) reportaron un incremento en la velocidad de pérdida de los beta carotenos y del color del puré de zapallo conforme aumentaba la temperatura durante el tratamiento térmico en un rango de 60°C a 100°C.

Tabla 1: Parámetros de color y bondades de ajuste para L*, a*, b* y Chr.

Parámetro de color	Co $\pm\sigma$ Co	(k $\pm\sigma$ k) x 10 ² (días ⁻¹)	R ²	R ² _{aj}
Chr 22°C	58 \pm 2	2,1 \pm 0,3 ^a	94,83	93,54
Chr 22°C control	57 \pm 2	2,0 \pm 0,2 ^a	97,02	96,28
Chr 8°C	54 \pm 1	1,1 \pm 0,1 ^b	97,45	96,6
Chr 8°C control	57 \pm 2	1,2 \pm 0,2 ^b	94,41	93,01
b* 22°C	57 \pm 2	2,1 \pm 0,3 ^a	94,91	93,63
b* 22°C control	56 \pm 2	2,0 \pm 0,2 ^a	97,01	96,26
b* 8°C	54 \pm 2	1,1 \pm 0,2 ^b	92,02	90,02
b* 8°C control	56 \pm 2	1,2 \pm 0,2 ^b	93,73	92,16
a* 22°C	8,9 \pm 0,7	4,3 \pm 0,7 ^a	92,05	90,06
a* 22°C control	8,9 \pm 0,5	4,8 \pm 0,5 ^a	97,58	96,98
a* 8°C	10,5 \pm 0,4	2,7 \pm 0,3 ^b	97,28	96,60
a* 8°C control	11,4 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2 ^b	99,13	98,91
L* 22°C	75 \pm 1	0,28 \pm 0,07 ^a	84,22	78,97
L* 22°C control	74,8 \pm 0,9	0,29 \pm 0,06 ^a	86,06	82,58
L* 8°C	72,8 \pm 0,4	0,23 \pm 0,02 ^a	99,89	99,85
L* 8°C control	73,3 \pm 0,5	0,16 \pm 0,03 ^a	94,47	92,63

* Letras diferentes indican diferencias significativas entre temperaturas de almacenamiento para un mismo parámetro de color (p<0,05).

CONCLUSIONES

En base a los valores experimentales, se determinó que los parámetros de color analizados evolucionaron de acuerdo a una cinética de primer orden. Los resultados mostraron que, para todos los sistemas, la intensidad de color, Chr, fue el parámetro más afectado. Este hecho estaría asociado, fundamentalmente, a una pérdida de color amarillo posiblemente por la degradación de los pigmentos carotenoides responsables de la coloración de la calabaza. Se pudo concluir que la presencia de *L. casei* no tuvo efecto significativo sobre la cinética de decoloración de los sistemas almacenados a 22 y 8°C. Sin embargo, se observó que la temperatura de almacenamiento afectó significativamente, siendo el sistema almacenado a 8°C el que presentó menor velocidad de la pérdida del color.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmend J, Shivhare US, Sandhu KS. 2002. Thermal Degradation Kinetics of Carotenoids and Visual Color of Papaya Puree. *Journal of Food Science*, 67 (7): 2692-2695.
- ANMAT. 2011. Resolución conjunta 261/211-22/2011.
- Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK. 2011. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 849-859.
- Código Alimentario Argentino. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).
- de Escalada Pla MF, Ponce NM, Stortz CA, Gerschenson LN, Rojas AM. 2007. Composition and functional properties of enriched fibre products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). *LWT, Food Science and Technology*, 40: 1176-1185.
- de Escalada Pla MF, Rojas AM, Gerschenson LN. 2013. Effect of butternut (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) fibres on bread making, quality and staling. *Food and Bioprocess Technology*, 6: 828-838
- De' Nobili, MD, Curto LM, Delfino JM, Soria M, Fissore EN, Rojas AM. 2013. Performance of alginate films for retention of L-(+)-ascorbic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 450: 95-103.
- do Espirito Santo AP, Perego P, Converti A, Oliveira MN. 2011. Influence of food matrices on probiotic viability. A review focusing on the fruity bases. *Trends in Food Science and Technology*, 22: 377-385.
- Dutta D, Dutta A, Raychaudhuri U, Chakraborty R. 2006. Rheological characteristics and thermal degradation

kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, 76: 538–546.

FAO/WHO. 2002. Guidelines for evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, pag. 1-11.

Garcia Maia Costa M, Vidal Fonteles T, Tibério de Jesus AL, Rodrigues S. 2013. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139, 261–266.

Genevois C, Flores S, de Escalada Pla M. 2014. Effect of iron and ascorbic acid addition on dry infusion process and final color of pumpkin tissue. *LWT - Food Science and Technology*, 58(2): 563-570.

González E, Montenegro MA, Nazareno MA, López de Mishima BA. 2001. Carotenoid composition and vitamin A value of an Argentinian squash (*Cucurbita moschata*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51(4): 395-399.

Guergoletto KB, Magnani M, San Martín J, Tardeli de Jesús Andrade CG, García S. 2010. Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovated Food Science and Emerging Technologies*, 11: 415-421.

Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125: 1–12.

Klayraunga S, Viernsteinb H, Okonogia S. 2009. Development of tablets containing probiotics: Effects of formulation and processing parameters on bacterial viability. *International Journal of Pharmaceutics*, 370: 54–60

Kongan L, Abeyá Gilardón E, Biglieri A, Mangialavori G, Calvo E, Durán. 2008. La desnutrición oculta. Resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud.

Lago-Vanzela ES, do Nascimento P, Fontes EAF, Mauro MA, Kimura M. 2013. Edible coatings from native and

modified starches retain carotenoids in pumpkin during drying. *LWT-Food Science and Technology*, 50: 420-425.

Martins EF, Mota Ramos A, Silva Lago Vanzela E, Stringheta PC, de Oliveira Pinto CL, Martins JM. 2013. Products of vegetable origin: a new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, 51: 764-770.

Meléndez-Martínez, [Heredia FJ](#). 2004. Nutritional importance of carotenoid pigments. [Archivos Latinoamericanos de Nutrición](#), 54 (2):149-154.

Muggeridge M, Clay M. 2001. Quality specifications for herbs and spices. In: Peter KV (eds) *Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, pag.13-21.

Olivas GI, Barbosa-Cáneas G. 2009. Edible Films and Coatings for Fruits and Vegetables. En: Embuscado ME, Huber KC editores. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. New York: Springer. Pag 211-243.

Olivera D, Viña S, Marani C, Ferreyra R, Mugridge A, Chaves A, Mascheroni R. 2008. Effect of blanching on the quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. *Gemmifera* DC) after frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 84: 148-155.

Pereira AL, Maciel T, Rodrigues S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44: 1276-1283.

Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 1-16.

Ranadheera SC, Evans CA, Adams MC, Baines SK. 2014. Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell

adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Foods*, 8: 18–25.

Tripathy AK y Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional foods*, 9: 225-241.

USAID. 2006. Boletín técnico de poscosecha: Manejo poscosecha de calabaza. USAID-RED. Oficina FHIA, La Lima, Cortes, Honduras. Pag. 3.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos por el soporte financiero brindado a UBACYT GEF 2012-2014 (20020110200192) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

EFFECTO DEL COMBUSTIBLE EMPLEADO EN EL PROCESAMIENTO DE LA YERBA MATE SOBRE LA CALIDAD

**Holowaty S.A.¹, Thea A.E.¹, Bohaczenko E.A.¹,
Schmalko M.E.¹**

1: Facultad de Ciencias exactas Químicas y Naturales,
Univ. Nac. de Misiones, Argentina.
saholowaty@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto sobre parámetros fisicoquímicos de calidad de la yerba mate al procesar el producto con biomasa renovable como combustible (chip de madera de monte implantado y comparar con el producto obtenido al utilizar leña de monte nativo. Cada tipo de combustible tiene una tecnología específica de quemado. El extracto acuoso fue significativamente mayor en muestras procesadas con chip. Las cenizas totales en muestras procesadas con chip fueron de 6,52 %bs (g/ 100 g de sólido seco), y menores que las procesadas con leña, de 6,98 %bs. El Ca tuvo diferencias significativas con 570 mg/100 g bs y 637 mg/100 g bs en muestras procesadas con chip y con leña, respectivamente. El procesamiento con leña de monte tiene valores mayores de polifenoles totales y capacidad antioxidante. Se concluyó que se obtienen diferentes productos de acuerdo al combustible utilizado.

Palabras clave: Yerba mate, procesamiento alternativo, combustible, calidad fisicoquímica.

Abstract: The aim of this research was to evaluate the effect on physicochemical quality parameters of yerba mate when it is processed using a renewable biomass fuel (wood chip implanted) and to compare with the product obtained using native forest wood as fuel. Each fuel has a specific burning technology. The aqueous extract was significantly higher in samples processed with chip. Total ash content in samples processed with chip was 6.52% db, and lower than those processed with wood, 6.98% db. Ca content had significant differences with 570 mg / 100 g and 637 mg / 100 g in samples processed with chip and native wood, respectively. The processing of native forest wood has higher values of total polyphenols and antioxidant capacity. We concluded that different products were obtained according to the fuel used in the processing.

Keywords: Yerba maté, alternative processing, fuel, physicochemical quality.

INTRODUCCIÓN

El procesamiento de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) comprende 5 etapas: zapecado, secado, molienda gruesa o canchado, estacionamiento y molienda fina. Las tres primeras se llevan a cabo en establecimientos denominados de "procesamiento primario" o "secaderos".

El zapecador tradicional es un tambor rotatorio en el que las ramas se ponen en contacto con gases de combustión de leña en corriente paralela. El tiempo de residencia varía entre 2 y 4 minutos y en el mismo las hojas alcanzan temperaturas superiores a los 100 °C, lo que produce la inactivación de las enzimas presentes en ellas, que podrían producir su pardeamiento en la etapa de secado. También se produce en el zapecador una pérdida muy importante de humedad. El contenido de humedad de las hojas se reduce desde un 55% (base húmeda, bh) hasta un 20% (bh) aproximadamente; mientras que en los palos varía desde el 55% (bh) hasta el 50% (bh) (Schmalko y Alzamora 2005). Las ramas son luego introducidas al secadero, que generalmente son de tipo cinta y pueden tener 1 o 2 etapas. A su vez, las cintas se pueden ubicar en formas superpuestas una arriba de la otra. La temperatura del aire o gases de combustión que ingresa al secadero varía entre 90 y 120°C, siendo la más usual de 100°C. (Schmalko y Alzamora 2001, Schmalko 2005).

Luego de la primera molienda, la yerba mate es colocada en bolsas de 40-50 Kg y éstas son almacenadas en depósitos para su estacionamiento.

En los últimos tiempos, se han realizado estudios para modificar método tradicional de procesamiento (Xander

et al. 2000, Pasardiet *al.* 2006). Dos fueron los motivos que llevaron a buscar procesos alternativos. En primer lugar, algunos mercados cuestionaron el consumo de yerba mate por el contacto directo de los gases de combustión de leña con el producto, detectándose niveles elevados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Camargo y Toledo 2002, Ziegenhals *et al.* 2008, Kamangar *et al.* 2008, Golozaret *al.* 2012, Thea *et al.* 2014). El segundo problema que se pretende abordar en este estudio es el remplazo de leña de monte nativo. Años atrás, su uso en el procesamiento primario de la yerba mate, representaba menos del 5% del costo de producción, ya que la leña provenía del raleo en el reemplazo por araucarias, el cual era un cultivo subsidiado por el estado. Sin embargo, la deforestación y la progresiva escasez de leña de monte nativo en el territorio misionero, provocó un impacto significativo en los costos de producción, a su vez, una nueva ley vigente, Ley XVI N° 106 (2007), dicta que a partir del año 2013 los establecimientos industriales dedicados a la producción de yerba mate, (y otras agroindustrias) deberían reducir en un 50% el consumo madera nativa, y a partir del año 2015, los secaderos deberán sustituir su consumo total por madera proveniente de bosque implantado (renovables) o bien con otras fuentes de energía como biomasa. Por esto, muchos secaderos buscaron alternativas de combustibles a partir de biomasa, y otras fuentes, al no contar con redes de gas natural que permitirían la optimización del secado. La opción que se tomó como alternativa fue modificar los sistemas de combustión para quemar los residuos de aserraderos, presentes en gran número en la provincia de Misiones, en forma de aserrín o chip de madera. En la provincia existen 218 secaderos de yerba mate

habilitados, de los cuales el 25% han implementado sistemas de combustión que permiten utilizar chip como combustibles. La sustitución de hornos a leña por quemadores de chip permitió, a priori, desde el punto de vista técnico, lograr un mejor control del proceso, utilizar temperaturas menores de trabajo y evitar grandes oscilaciones térmicas e incompleta combustión que se producen generalmente en los sistemas anteriores de secado. (Schmalko *et al.* 2011).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto sobre parámetros fisicoquímicos de calidad de la yerba mate al procesar el producto con biomasa como combustible (chip de madera de monte implantado o renovable) y comparar con el producto obtenido al utilizar leña de monte nativo como combustible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de yerba mate

Se trabajó con muestras de yerba mate canchada proveniente de 8 (ocho) secaderos de diferentes zonas de la Provincia de Misiones, todos ellos funcionan con un sistema tradicional de zapeado en tambor rotativo con aspas y el secado tipo cinta. Cuatro (4) muestras corresponden a establecimientos que procesan su materia prima íntegramente con leña como combustibles. Las muestras restantes provienen de secaderos que utilizan chip de madera en todo su proceso productivo. Las muestras tomadas fueron de 2 kg aproximadamente de yerba mate canchada, las cuales en el laboratorio se separaron para obtener una mezcla con 20% de palo. Cada muestra fue molida a fin de realizar los diferentes análisis fisicoquímicos.

Análisis fisicoquímicos

Determinación del contenido de humedad: El contenido de humedad se determinó por calentamiento a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta pesada constante (IRAM 20503).

Determinación del color: Se realizó con un colorímetro mini-Scan EZ HuterLab modelo 4500L (MSEZ0061). Se utilizaron las coordenadas "L" que midió el grado luminosidad (asigna 0 al negro y 100 al blanco); "a" que midió la escala del verde (negativo) al rojo (positivo), y "b" que midió la escala del azul (negativo) al amarillo (positivo) (Woniatckzuk *et al.* 2005). La matiz (Hue o h) para determinar la intensidad del color, o pureza el mismo, fue calculado mediante la ecuación 1.

$$(1) \quad H = \frac{a}{\sqrt{a^2 + b^2}}$$

Determinación de sólidos solubles en agua: Se extrajeron los sólidos solubles en agua y se llevaron a sequedad de acuerdo a la norma IRAM 20510.

Determinación del contenido de cafeína: La extracción y determinación se realizó de acuerdo a la Norma IRAM 20512 (extracción en medio acuoso por tratamiento con MgO). En una alícuota filtrada se determinó por HPLC con columna C18 y fase móvil Acetonitrilo-Agua, en proporción 30:70. Se utilizó como referencia una solución patrón de cafeína de 0,05 g/l.

Determinación de las cenizas totales e insolubles: La determinación se realizó de acuerdo a la Norma IRAM 20505 y 20507 respectivamente. Se calcinaron 2 g de la muestra en una cápsula de porcelana y se llevó a una mufla a 550°C durante 5 horas. De esta forma se determinaron las cenizas totales. Este material se disolvió

en una solución de HCl al 1,5 %, y se llevó a ebullición durante 1 hora. Se filtró con un papel libre de cenizas, se colocó en una cápsula de porcelana y se calentó en una mufla a 550°C durante 5 horas.

Determinación de minerales: Para el análisis de los minerales se calcinaron 2 g de material en una mufla a 550°C. Luego se realizó la dilución en 100 ml de ácido clorhídrico al 10%, y posterior filtración de una alícuota de 10 ml y se hizo una dilución de 1/10. Se utilizó espectrofotometría de absorción atómica con llama aire/acetileno, con un equipo modelo PerKin Elmer AAnalyst 700 (Aire - Acetileno), y lámparas de cátodo Hueco. La metodología de determinación de minerales se realizó según Norma EPA 600/R-94/111 Método 200.2.

Contenido de polifenoles totales (CPT) y actividad antioxidante (CAO): Se realizó mediante la técnica descrita en la Norma IRAM 20533 de acuerdo al método en la norma ISO/FDIS 14502-1(E) (2004). El CPT se determinó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu y ácido gálico como estándar y se expresó como g de polifenoles totales equivalentes a ácido gálico en 100 g de materia seca (g EAG % ms). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 765 nm usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. La CAO se determinó mediante el ensayo del radical libre DPPH•, usando ácido ascórbico como estándar y se expresó como g equivalentes a ácido ascórbico por cada 100 g de la materia seca (g EAA % ms).

Análisis Estadístico: Se determinaron las diferencias entre valores medios utilizando un Análisis de varianza y comparaciones de medias con el test de mínima significancia, (LSD) y un nivel de confianza de 95%. Se utilizó el paquete Statgraphics CENTURION XV (2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El procesamiento de yerba mate es, en algunos aspectos, bastante heterogéneo en su metodología, uno de los parámetros más afectados por esto es el contenido de humedad, el cual se ha mostrado tener una elevada variabilidad durante todo su proceso (Schmalko y Alzamora 2001) y solamente al final del mismo se pretende alcanzar valores que permitan la estabilidad del producto durante el estacionamiento desde el punto de vista de calidad y microbiológico. Estos valores no dependen del tipo de combustible utilizado y si lo hacen del tiempo de secado, siendo aceptables valores de contenido de humedad menores al 5-6% en base húmeda antes del estacionamiento. Este estudio mostró la variabilidad de la humedad en muestras provenientes de 8 establecimientos industriales. (**Figura 1 - Tabla 1**).

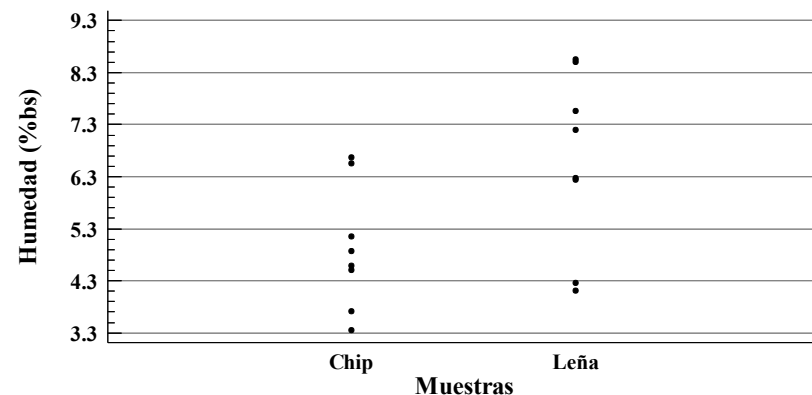


Figura 1: Variabilidad en el contenido de humedad en muestras provenientes de establecimientos que procesan la materia prima con diferentes combustibles.

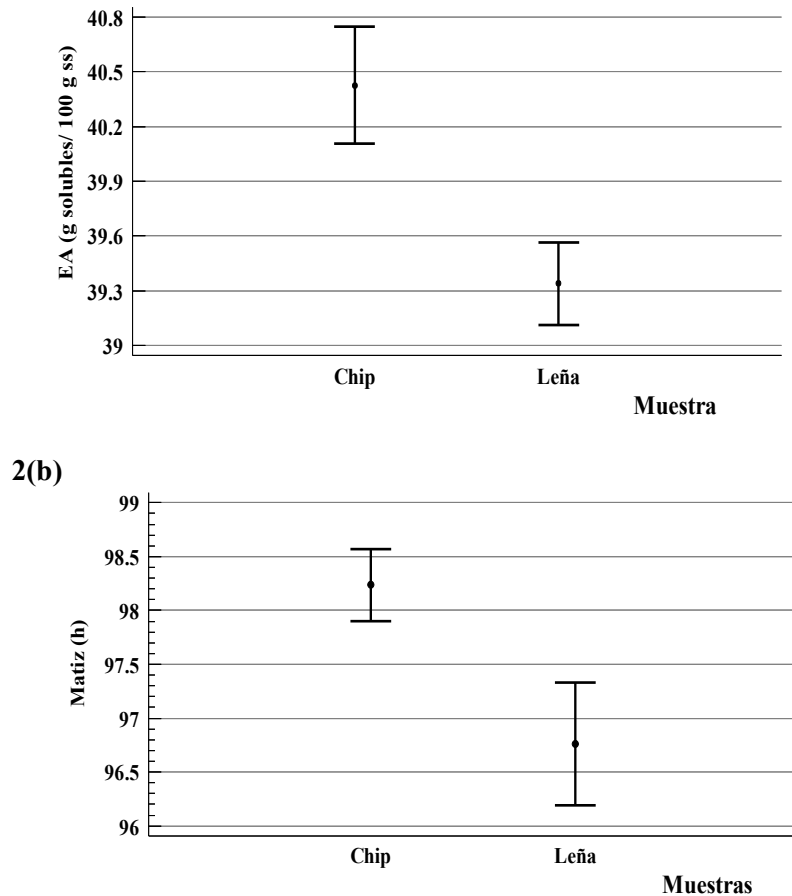


Figura 2(a): Valores medios del extracto acuoso en las muestras procesadas con chip y/o con leña, y sus desviaciones estándar. **(b)** Valores medios de Matiz determinados en las muestras con sus desviaciones estándar, según el tipo de combustible de procesamiento.

Se determinaron las concentraciones de sólidos solubles con el extracto acuoso (EA). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Las muestras procesadas con chip mostraron valores medios 5 %bs mayores que el procesado con leña. Desde el punto de vista de variabilidad del proceso, existen datos publicados con variabilidades del orden de 10%, además estos valores de EA son valores normales dentro de los parámetros establecidos por la normativa vigente (**Figura 2a**) (IRAM 20510).

Los parámetros de color determinados L, a y b no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre la yerba mate canchada procesada con leña y procesada con chip. Sin embargo, al estudiar la matiz (**Figura 2b**) de las muestras se han encontrado diferencias significativas entre los dos tipos de procesamiento. Se encontró que las muestras procesadas con chip resultaron con mayor intensidad o pureza de color verde.

Las concentraciones medias de cafeína determinadas fueron $0,93 \pm 0,24$ g /100 g sólido seco y $0,91 \pm 0,13$ g /100 g sólido seco, para las muestras procesadas con Leña y con Chip respectivamente, sin embargo no se encontraron diferencias entre las muestras provenientes de uno u otro tipo de procesamiento. Los valores se expresan en la Tabla 1.

Se establecieron también diferencias significativas en la concentración de polifenoles totales (CPT) y capacidad antioxidante (CAO). El procesamiento con leña tiene valores mayores de CPT 10,82 g EAG/100 g sólido seco (%bs) y en el procesamiento con chip 10,14 g EAG/100 g sólidos secos (% bs). (**Figura 3a**). Es decir menos del 10% de diferencias, lo cual puede atribuirse únicamente al procesamiento y no a las muestras. La CAO media del

procesamiento con leña fue 11% mayor, (19,13 g EAA %bs y con chip de 17,20 g EAA %bs), lo cual también podríamos atribuir a la variabilidad del proceso.

El contenido de cenizas totales en yerba mate procesada con leña fue superior en un 10% respecto a las muestras de chip (**Figura 3b**). Por otra parte, el valor de cenizas insolubles en HCl no mostró diferencias entre muestras.

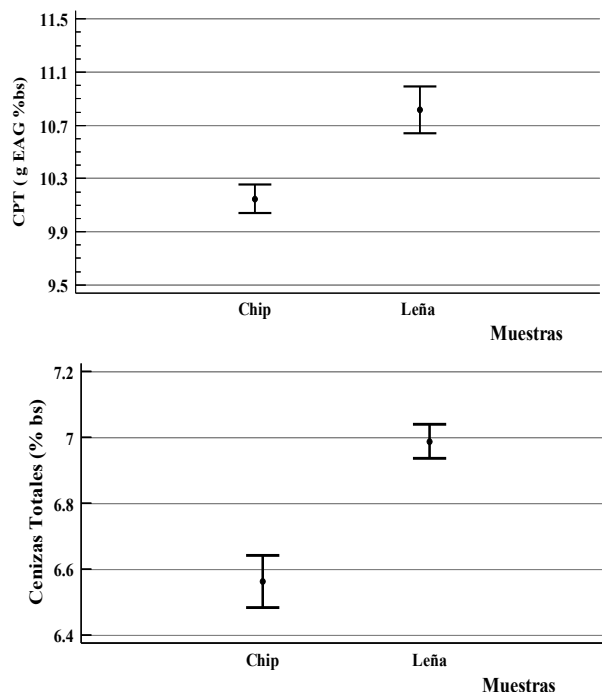


Figura 3(a): Valores medios del contenido de polifenoles totales en las muestras procesadas con chip y/o con leña, con sus desviaciones estándar. **(b)** Valores medios de cenizas totales en las muestras con sus desviaciones estándar, según el tipo de combustible de procesamiento.

Tabla 1: Resumen de valores medios con sus respectivas desviaciones estándar de cada parámetro estudiado, según el tipo de combustible de procesamiento (expresados por cada 100 g de sólido seco o base seca).

Parámetro	Combustible		Parámetro	Combustible		
	Leña	Chip		Leña	Chip	
Color L	43,90 ± 1,26	44,40 ± 1,18	Humedad (g agua % bs)	6,59 ± 0,61	4,92 ± 0,42	
Color a	-1,86 ± 0,82	-2,22 ± 0,41		Na	5,10 ± 1,78	4,29 ± 0,69
Color b	15,54 ± 1,02	15,33 ± 0,27	mg/100 g sólido seco	K	1140,89 ± 165,78	1008,08 ± 214,21
CAO (g EAA %bs)	19,13 ± 0,97	17,20 ± 1,27		Ca	637,20 ± 52,00	562,18 ± 61,22
Cafeína (g %bs)	0,93 ± 0,24	0,91 ± 0,13		Mg	202,10 ± 35,83	235,02 ± 111,98
Cenizas Insolubles HCl (% bs)	0,48 ± 0,12	0,43 ± 0,05		Fe	6,75 ± 2,32	6,41 ± 1,88

No se encontraron diferencias entre métodos de procesamiento cuando se determinaron los minerales, en los procesamientos con leña y con chip. La Tabla 1, muestra un resumen de los valores medios de otros parámetros determinados en este estudio, con sus desviaciones estándar según el tipo de combustible utilizado en el proceso.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudió si se podían establecer diferencias significativas en los parámetros de calidad fisicoquímicos de muestras de yerba mate procesadas industrialmente con diferentes combustibles, al considerar que el producto se encuentra en continuo contacto con los gases de combustión del proceso. Se encontró menor variabilidad de parámetros de color y de la humedad en muestras procesadas con chip de madera. Los valores de cenizas totales, polifenoles totales y capacidad antioxidante fueron mayores en muestras procesadas con leña de monte nativo. Mientras que los valores de extracto acuoso y matiz fueron menores en las muestras respecto a la yerba mate procesada con chip. En todos los casos, los cambios fueron menores o iguales al 10%.

BIBLIOGRAFIA

- Camargo LS y Toledo MCF. 2002. Chá mate e café como fontes de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22, pp. 49-53.
- Golozar A, Fagundes R B, Etemadi A, Schantz MM, Kamangar F, Abnet CC, Dawsey SM. 2012. Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba maté samples by brand, batch and processing method. *Environmental Science Technology*, 46(24), pp. 13488-13493.
- IRAM N° 20503. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de masa a 103°C. 1995
- IRAM N° 20507. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de cenizas Totales. 1995
- IRAM N° 20503. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de cenizas insolubles en ácido. 1995.
- IRAM N° 20510, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales- Norma 20510: Yerba Mate: Determinación del Extracto Acuoso. 1995.
- IRAM N° 20512, Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Norma 20512: Yerba Mate: Determinación del Contenido de Cafeína. 2000.
- IRAM N° 20533. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales. Norma 20533: Yerba Mate: Determinación Polifenoles y Capacidad antioxidante.

Kamangar F, Schantz M, Abnet C, Fagundes R, Dawsey S. 2008. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 17(5), pp. 1262-68.

Laube NH. 2008. Hornos Rotativos Continuo de Alta Frecuencia para zapecado y secado de yerba mate. PRASY-INYM N° 023/08.

Ley XVI N° 106. 2007. www.diputadosmisiones.gov.ar/digesto.../mostrar_archivo.php.

Pasardi LR, Schvezov CE, Schmalko ME y González AD. 2006. Drying of *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire by Microwave Radiation. *Drying Technology* 24: 1437-1442.

Schmalko ME, Lovera NN, Kolomiejec GC. 2011. Moisture migration during a tempering time after the heat treatment step in yerba maté processing. *Revista Latin American Applied Research*. Vol. 41, No. 2, 153-156.

Schmalko ME y Alzamora SM. 2005. Modeling the drying of a Twig of "Yerba Maté" considering as a composite material: Part I: Shrinkage, Apparent density and Equilibrium moisture content. *Journal of Food Engineering* 66, pp. 455-461.

Schmalko ME. 2005. Estudio y Modelado del procesamiento Primario de la Yerba Mate. Tesis para acceder al Doctorado de la Universidad de Buenos Aires – Área Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Dirigida por la Dra. Stella Maris Alzamora.

Schmalko ME y Alzamora SM. 2005. Modeling the drying of a Twig of "Yerba Maté" considering as a composite material: Part II: Mathematical model. *Journal of Food Engineering* 67, pp. 267-272.

Thea AE, Ferreira D, Brumovsky LA, Schmalko M.E. 2014. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en infusiones preparadas con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hillarie), Memorias del VI Congreso Sudamericano de la yerba mate y II Simposio Internacional de yerba mate y salud. ISBN: 978-9974-0-1085-7. (en CD).

Woniaczuk MI y Schmalko ME. 2005. Estudio de la Variabilidad de los Parámetros de Calidad de la Yerba Mate Elaborada en Diferentes Establecimientos. X Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Mar del Plata 18 al 20 de Mayo de 2005(en CD).

Xander CG, Acosta LM, Scipioni GP y Argüello B. 2000. Inactivación térmica de peroxidasas en *Ilex paraguariensis* St. Hil. y *dumosa*. *Anales del 2° Congreso Sul-Americano da Erva-Mate*, Encantado 19 al 23/11/00, Brasil, 366-369.

Ziegenhals K, Jira W, Speer K. 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea. *European Food Research and Technology*, 228, pp. 83-91.

**UTILIZACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS DE
POLISACÁRIDO
(HIDROXIPROPILMETILCELULOSA) PARA
INCREMENTAR LA SOLUBILIDAD DE UNA
POLIMETOXIFLAVONA (NOBILETINA) EN
SISTEMAS ACUOSOS**

Jara F.L.^{1,*}, Lobatto I.², Pilosof A.M.R.¹

1: CONICET - FCEN - UBA, CABA, Argentina.

2: INTI, Buenos Aires, Argentina.

* fjara@di.fcen.uba.ar

Resumen: La Nobiletina (NOB) es una polimetoxiflavona presente en la piel de los cítricos. Posee un extenso rango de actividades farmacológicas y bioactivas. Sin embargo, su solubilidad en agua (16,2 µg/mL) (Onoue *et al.* 2011) es un determinante crítico de su biodisponibilidad. Una estrategia es incluirla en nanopartículas de polisacáridos como las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMCs). El objetivo de este trabajo fue incrementar la solubilidad de la NOB en sistemas acuosos mediante distintas HPMCs. Las nanopartículas de polisacárido-NOB, se obtuvieron por mezcla directa de soluciones de distintas HPMCs al 1% p/p y suspensiones de NOB (0,01 % p/p) a una temperatura de 85°C. Las muestras se analizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía óptica. Todas las mezclas presentaron una distribución de tamaño de partículas multi-modal y similar a la HPMC sola, observándose la desaparición del pico correspondiente a la NOB. El calentamiento promovió la disolución de la NOB, y todas las HPMCs fueron capaces de mantener hasta 100 µg/mL de NOB. Además, las HPMCs fueron

capaces de mantener en solución a la NOB durante 14 días; más allá de este tiempo se observó en todas las mezclas la aparición de cristales de tamaño milimétrico, por un proceso de re-cristalización de la NOB.

Palabras Clave: Hidroxipropilmetilcelulosa; Nanopartículas carriers; Nobiletina.

Abstract: Nobiletin (NOB) is a polymethoxyflavone present in citric peels. It has an extensive range of pharmacologic and bioactive activities. However, its water solubility (16.2 µg/mL) (Onoue *et al.* 2011) is a critical determinant in its bioavailability. One strategy is to incorporate NOB in nanoparticles of polysaccharides such as hydroxypropylmethylcelluloses (HPMCs). The aim of this work was to increment NOB solubility in aqueous systems using different HPMCs. The polysaccharide-NOB nanoparticles were obtained by direct mixing at 85°C of different 1% p/p HPMCs and 0.01% p/p NOB suspensions. Samples were analyzed by dynamic light scattering (DLS) and optical microscopy. All samples presented multi-modal particle size distributions and similar to those of HPMC alone, observing the NOB peak disappearance. Heating promoted NOB dissolution and all HPMCs were able to maintain up to 100 µg/mL of NOB. Three kind of HPMCs used were capable of maintaining the NOB soluble during 14 days; beyond this time all samples showed NOB crystals due to a recrystallization process.

Keywords: Hydroxypropylmethylcellulose; Carrier nanoparticles; Nobiletin.

INTRODUCCIÓN

La Nobiletina (NOB) (5, 6, 7, 8, 3', 4' hexametoxiflavona) es una polimetoxiflavona presente en la piel de los cítricos (**Figura 1**). Posee seis sustituyentes metoxilo, lo que le confiere un gran carácter hidrofóbico. La NOB posee un extenso rango de actividades farmacológicas (Li *et al.* 2014) incluyendo entre otras, antioxidante, antimicrobiana (Yi *et al.* 2008), antiinflamatoria (Onishi *et al.* 2014) y antiproliferativa (Kunimasa *et al.* 2010; Shi *et al.* 2013). Sin embargo, la solubilidad en agua de la NOB (16,2 µg/mL) (Onoue *et al.* 2011) es un determinante crítico en la biodisponibilidad cuando es administrada oralmente (Kawabata *et al.* 2011). Una estrategia para evitar este inconveniente es incluir la NOB en matrices poliméricas tales como nano-partículas de polisacáridos (Luque-Alcaraz *et al.* 2012).

Existen numerosos derivados obtenidos por modificaciones químicas de la celulosa natural. Las hidroxipropilmetilcelulosas (HPMCs) son derivados de celulosa que forman parte de una familia que incluye entre otros a la metilcelulosa (MC), en la cual los sustituyentes son grupos metilo y a la metilhidroxietilcelulosa (MHEC) la que posee como sustituyentes grupos hidroxietilo en hasta un 5%. Las HPMCs presentan en su cadena grupos metilo e hidroxipropilos (**Figura 2**). Difieren principalmente entre sí en su peso molecular, viscosidad, grado de sustitución (DS) y sustitución molar (MS) (**Tabla 1**). A lo largo de la cadena de celulosa, los grupos metilos constituyen zonas hidrofóbicas mientras que los grupos hidroxipropilos son más hidrofílicos. La introducción de estos sustituyentes

permite a la HPMC comportarse como surfactante. La utilidad de los éteres no iónicos de celulosa se basa fundamentalmente en cuatro atributos: son espesantes eficientes, presentan actividad superficial, tienen la habilidad de formar películas interfaciales y la capacidad de formar geles termorreversibles (Camino *et al.* 2012; Pérez *et al.* 2006).

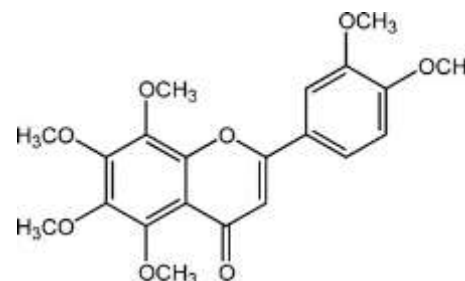


Figura 1. Estructura de la Nobiletina; 5,6,7,8,3',4' hexametoxiflavona.

Los estudios realizados muestran que estos polisacáridos en solución presentan un comportamiento complejo que se manifiesta en la asociación/autoensamblaje mediado por interacciones hidrofóbicas y modulado fuertemente por el pH, como también por la concentración y la temperatura. El grado de asociación/autoensamblaje también puede modificarse por la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad, impactando en algunas propiedades físicoquímicas de las celulosas (Camino *et al.* 2009). En la interfase aceite/agua, las HPMCs, especialmente las de bajo peso molecular, presentan una importante actividad, la cual está modulada también por el pH (Camino *et al.* 2011).

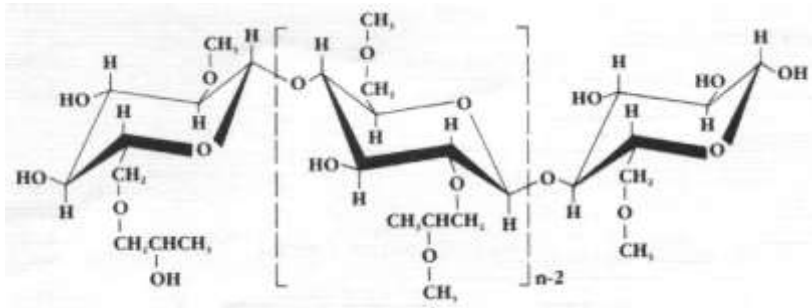


Figura 2. Estructura de la hidroxipropilmetilcelulosa.

Debido a sus acciones terapéuticas, la NOB tiene mucho potencial como componente bioactivo, por lo que resulta de interés estudiar su interacción con polisacáridos de grado alimentario, a fin de aumentar su biodisponibilidad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción entre NOB y distintas HPMCs para incrementar la solubilidad de la NOB en sistemas acuosos.

Tabla 1: Propiedades físico-químicas de las hidroxipropilmetilcelulosas utilizadas en este trabajo.

HPMC	% Metilos	% Hidroxipropilos	Relación Metilo/Hidroxipropilo	D	MS	Sustitución Total (DS+MS)	Viscosidad (cp), solución 2 % p/p, 20 °C	PM (Da)
E4M	28,0	10,2	2,7	1, 9	0,2 3	2,13	4965	9000 0
E5LV	29,5	9,7	3,0	1, 9	0,2 3	2,13	5,4	2000 1200
K15	22,0	8,1	2,7	4	1	1,61	16125	00

MATERIALES Y MÉTODOS

Las hidroxipropilmetilcelulosas Methocell® E5LV, K15, E4M (grado alimentario), fueron gentilmente donadas por Colorcon Argentina, representantes de Dow Chemical Company y empleadas sin purificación posterior.

Nobiletina en polvo fue donada por Xian Xiao Cao Botanical Development Co. Ltd. (Shaanxi, China). Composición porcentual, Nobiletina 98% (determinación por HPLC); humedad 0,1%; cenizas 0,3%.

La preparación de las mezclas se realizó de la siguiente manera: se preparó una solución NOB al 0,02 % p/p; para ello se disolvió el compuesto en agua bidestilada, se mantuvo en agitación por 4 hs, se almacenó a 4°C durante 12 hs y luego se volvió a agitar durante 4 hs. Se tomó el volumen necesario de esta solución madre de NOB para lograr el 0,01% p/p en la mezcla; se calentó a 85°C en baño maría durante 10 minutos. Luego se agregó HPMC en polvo para lograr el 1% p/p en la mezcla y se disolvió con agitación. Posteriormente se llevó a volumen final con agua bidestilada y se almacenó 24 hs a 4°C para lograr la total hidratación del polisacárido.

Las soluciones y/o dispersiones acuosas de los distintos sistemas (NOB, HPMCs, y sus mezclas) se analizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS, de sus siglas en inglés, Dynamic Light Scattering) (equipo Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments, UK) y microscopía óptica: Microscopio Olympus Corp. modelo BX43 (Japón) equipado con una cámara digital Q-Color 3C (Canadá).

La dispersión dinámica de luz es una técnica no invasiva, que requiere poco volumen para el análisis de una muestra y se emplea para la medición del tamaño de partícula, principalmente en la escala submicrónica. Las aplicaciones más usuales del DLS son las mediciones de

tamaño y distribución de tamaños de las gotas de una emulsión y moléculas dispersas o disueltas en un líquido como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos, nanopartículas y dispersiones coloidales.

La intensidad de dispersión de luz de una molécula es proporcional al cuadrado del peso molecular. Por lo tanto, esta técnica es muy sensible a la aparición de formas asociadas o agregadas. DLS también permite determinar las poblaciones existentes en una muestra con múltiples tamaños de partículas. En un equipo de DLS, las partículas en la muestra dispersan la luz en diferentes direcciones, la cual incide en ellas desde una fuente de luz láser a una determinada longitud de onda. La luz dispersada es recibida por un detector óptico y fluctúa con el tiempo debido al movimiento browniano de las partículas y es medido en DLS y relacionado con el tamaño de la partícula.

La muestra es iluminada con un láser y la intensidad de la luz dispersada producida por las partículas fluctúa a una velocidad que es dependiente del tamaño de las partículas. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite estimar el coeficiente de difusión translacional (D) de la partícula y a partir de éste el tamaño de la misma mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

donde, d(H): diámetro hidrodinámico (m); D: coeficiente de difusión translacional ($m^2.s^{-1}$); k: constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} N.m.K^{-1}$); T: temperatura absoluta (K); η : viscosidad ($N.s.m^{-2}$).

El tamaño se obtiene a partir de la función de correlación usando varios algoritmos. Aunque la distribución de tamaño fundamental generada por el equipo es la distribución por intensidad, ésta se puede convertir, mediante la teoría de Mie (1908), a distribución por volumen con el objetivo de analizar la importancia de los diferentes picos en relación a la cantidad de partículas que lo conforman.

Las soluciones de mezclas de HPMC-NOB y las dispersiones acuosas de los distintos sistemas se analizaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) para determinar el tamaño de las partículas. En este tipo de análisis se obtienen las distribuciones de tamaños de las partículas dispersas o disueltas en un líquido. Los ensayos se llevaron a cabo en el equipo de escala nanométrica Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La NOB es cristalina a temperatura ambiente, por eso es necesario calentarla para disolverla y así intentar vehicularla en algún sistema acuoso como los que se proponen en este trabajo. Tanto macroscópicamente como microscópicamente, se observó una completa disolución al calentar la NOB a 85°C pero esta solubilidad es rápidamente revertida cuando la muestra se enfría, formando grandes cristales con forma de "agujas" que se aglomeran en clusters (**Figura 3**). Hay una considerable variación en las dimensiones de los cristales formados, pero muchos de ellos superan los 100 μm de largo.

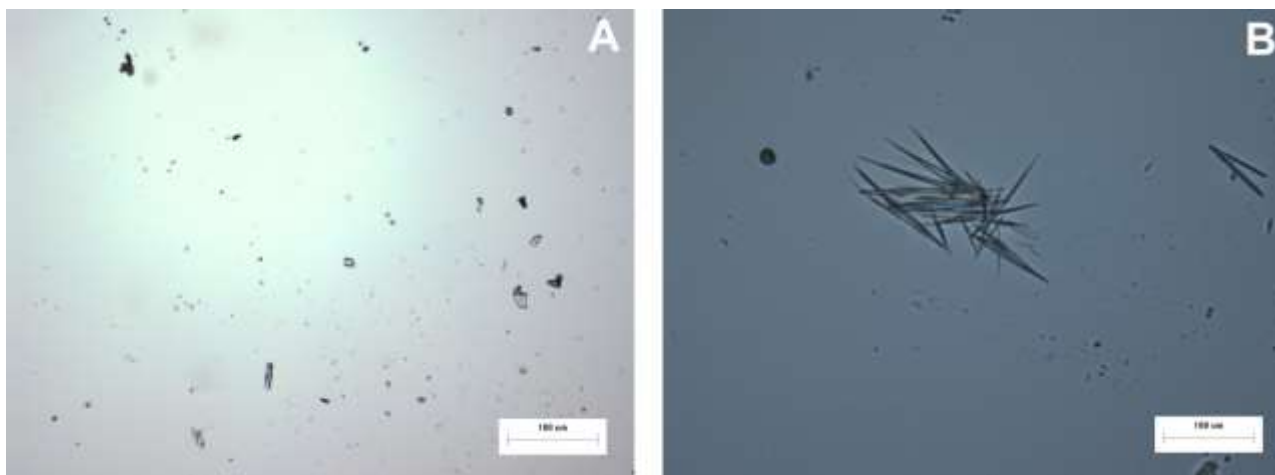


Figura 3. Micrografías de Nobiletina calentada (A) y luego del enfriamiento (B). Aumento 100X.

El principal objetivo de este estudio fue preparar sistemas acuosos físicamente estables que puedan utilizarse como vehículo para la NOB. Las distribuciones de tamaño de partícula medidas por DLS se muestran con respecto a la fracción en volumen de cada una de las muestras ya que resulta más representativo que la distribución en intensidad (**Figura 4**). Al comparar dichas distribuciones se observa que todas las mezclas presentaron una distribución de tamaño de partículas similar a la HPMC sola, y que el pico correspondiente a la NOB no aparece. Esto quiere decir que la presencia de NOB en los sistemas de HPMC pareciera tener muy poca influencia sobre el tamaño de partícula inicial, lo cual era de esperarse ya que se trata de una molécula relativamente pequeña y no polar. Además la desaparición completa del pico correspondiente a NOB indica que toda la población se

encuentra adsorbida o formando algún tipo de complejo con las distintas HPMCs.

Luego de una semana y hasta 14 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), no se observó ninguna evidencia de formación de cristales ya sea por observación macroscópica, microscópica (no se muestran) o DLS (**Figura 5**).

Esta estabilidad física puede ser atribuida a las propiedades de viscosidad y estructura molecular de las HPMCs, dado que de alguna forma evitan que las moléculas de NOB se asocien y formen los cristales descritos anteriormente. Por lo tanto, en primera instancia, se podría pensar en distintas matrices alimentarias en donde las HPMCs serían capaces de estabilizar a NOB a una concentración 6 veces mayor que en agua (100 versus 16,2 µg/mL, respectivamente), confiriéndoles diferentes propiedades funcionales (Murakami *et al.* 2001).

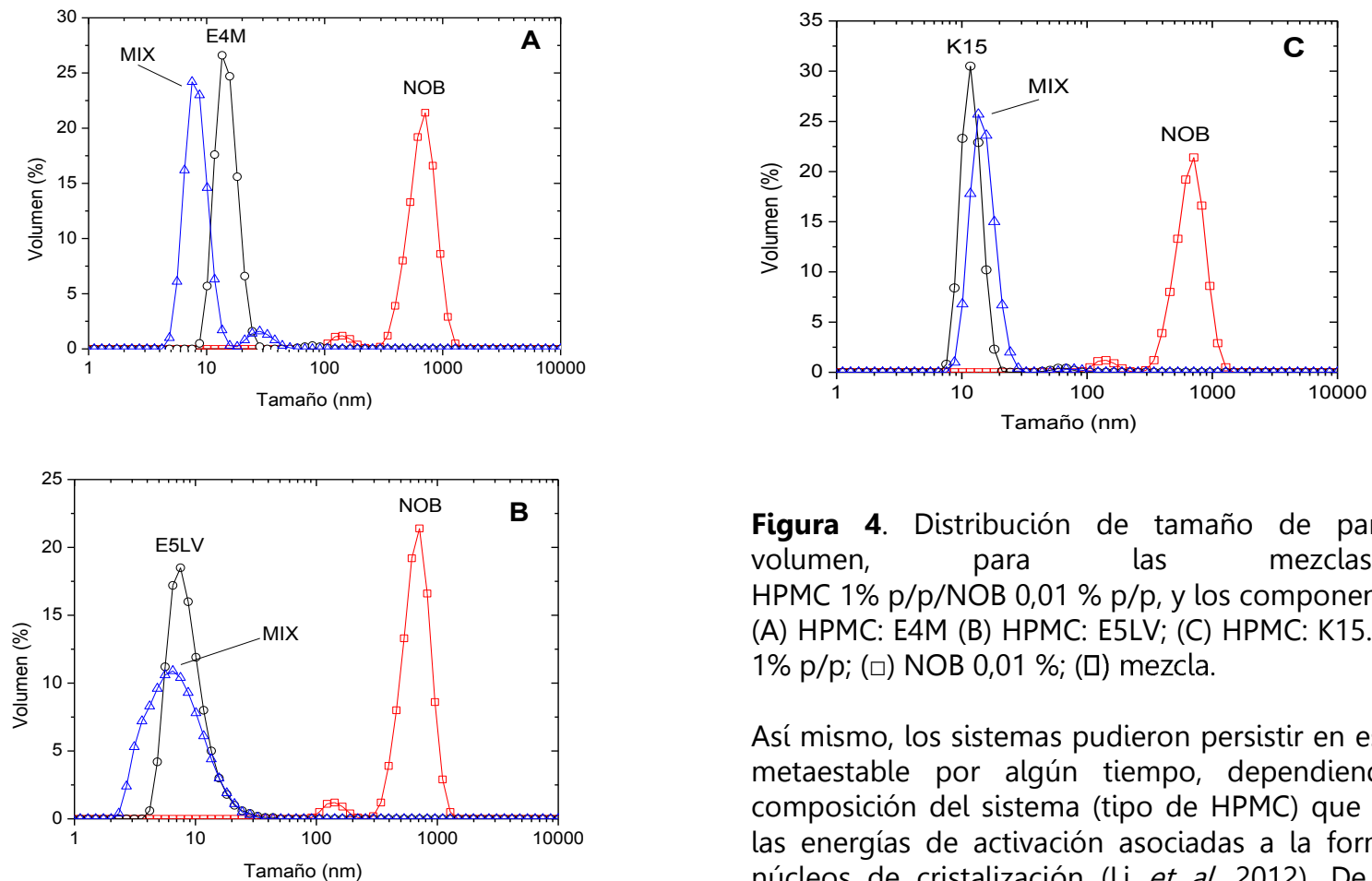


Figura 4. Distribución de tamaño de partícula en volumen, para las mezclas de HPMC 1% p/p/NOB 0,01 % p/p, y los componentes puros. (A) HPMC: E4M (B) HPMC: E5LV; (C) HPMC: K15. (○) HPMC 1% p/p; (□) NOB 0,01 %; (◻) mezcla.

Así mismo, los sistemas pudieron persistir en este estado metaestable por algún tiempo, dependiendo de la composición del sistema (tipo de HPMC) que determina las energías de activación asociadas a la formación de núcleos de cristalización (Li *et al.* 2012). De hecho se probaron los efectos sobre la solubilidad de la NOB de distintas HPMCs con características moleculares diferentes y se observó que la viscosidad proporcionada por cada una de las HPMCs juega un rol fundamental en la desestabilización física de los sistemas. De esta manera, la E5LV que como su nombre lo indica es una HPMC de baja viscosidad (LV: Low Viscosity) resulta ser la que

mayor grado de formación de cristales presentó (**Figura 6A**), seguida por la E4M y por último la K15L.

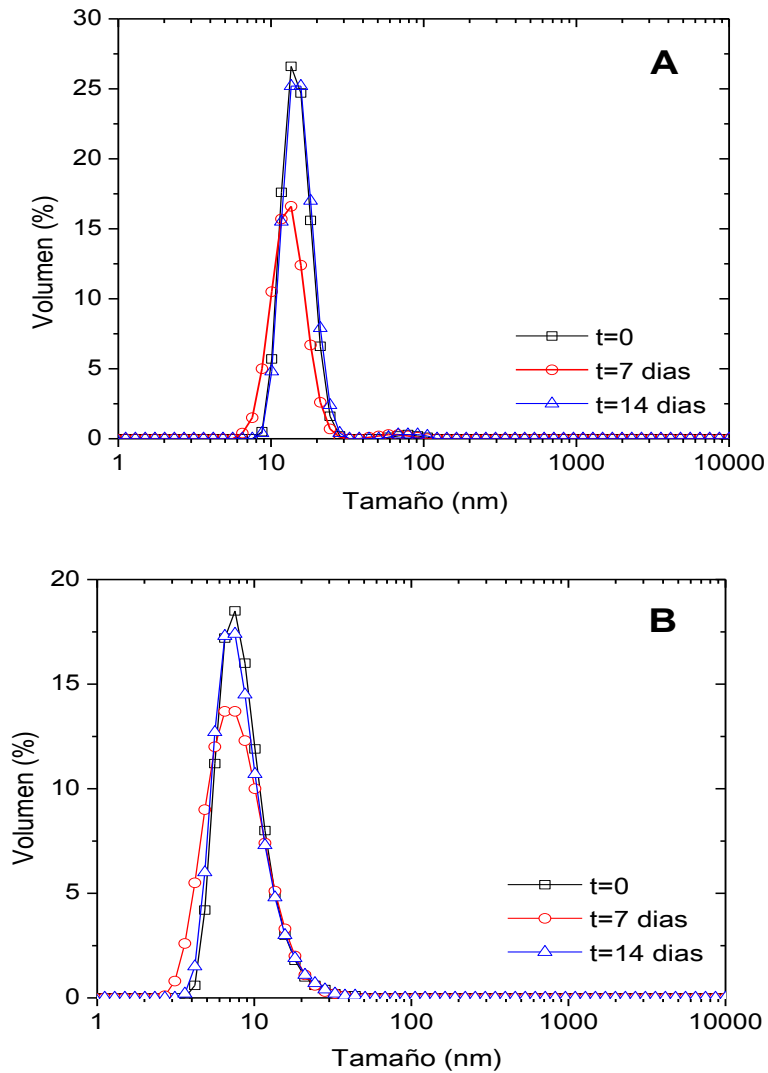


Figura 5. Distribución de tamaño de partícula en volumen, para las mezclas de HPMC 1% p/p/NOB 0,01 % p/p durante el almacenamiento a 25°C. (A) HPMC: E4M (B) HPMC: E5LV; (C) HPMC: K15.

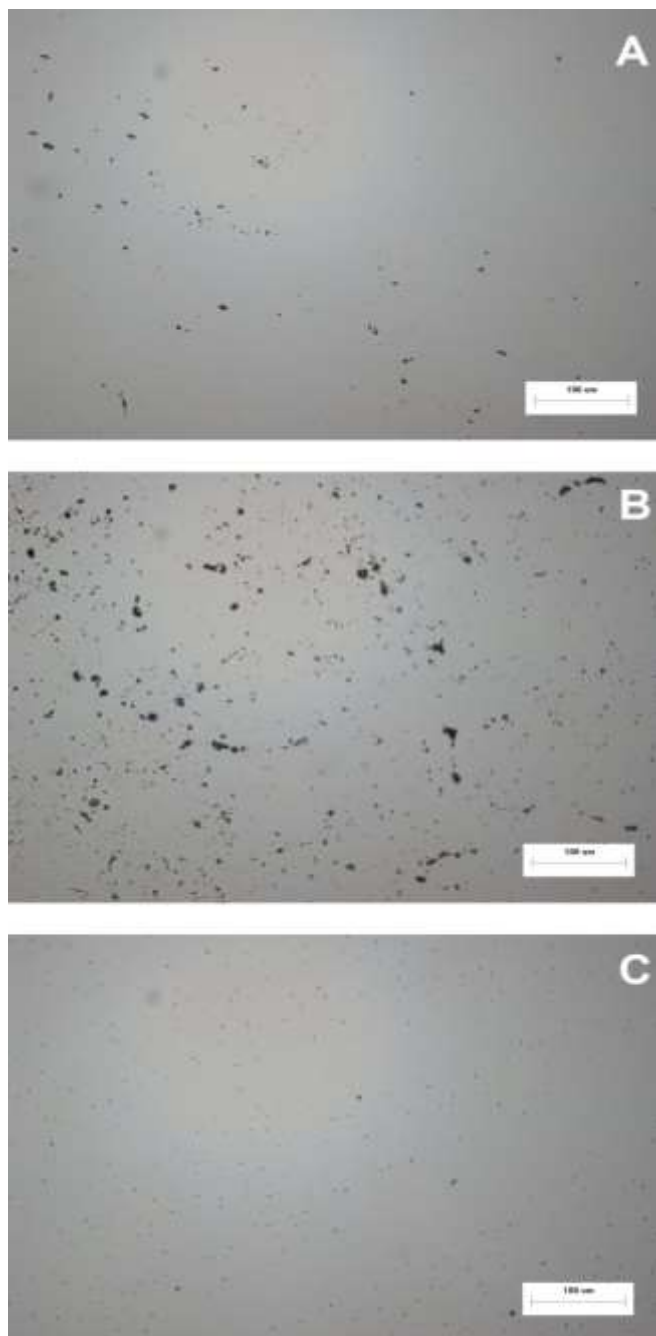


Figura 6. Micrografías de los cristales de Nobilite formados en las mezclas con HPMC, luego de 21 días de almacenamiento a 25°C. (A) HPMC: E4M (B) HPMC: E5LV; (C) HPMC: K15. Aumento 100X.

Como se observa en la **Tabla 1**, la K15 pertenece a otra serie de HPMC (la serie K), que si bien comparte con las otras dos similares grados de sustitución de metilos e hidroxipropilos, posee un peso molecular mucho mayor lo que se traduce en una viscosidad también mucho mayor. Esta alta viscosidad podría ser la causante de la inhibición o retardo de la formación de cristales de NOB (**Figura 6C**). La E4M, que posee una viscosidad intermedia, mostró una moderada aparición de cristales por observación al microscopio (**Figura 6B**). Por último, cabe destacar que estas diferencias en el tamaño y la morfología de los cristales formados en los sistemas más allá de los 21 días, podrían estar dadas por varios factores relacionados con las tasas de nucleación y crecimiento en los cristales de NOB (Lindfors *et al.* 2008). Si la velocidad de nucleación es mayor que la de crecimiento del cristal, entonces se formarán muchos cristales de tamaño pequeño. En cambio, si la velocidad de crecimiento del cristal es mayor con respecto a la velocidad de nucleación, se formarán pocos cristales de gran tamaño. La tasa relativa de estos dos procesos podría estar influenciada por las interacciones entre NOB y las distintas HPMCs; por ejemplo, la cosolubilización de ambos componentes, la unión de NOB a sitios hidrofóbicos de las HPMCs, la adsorción de las HPMCs sobre las superficies de cristales o núcleos ya formados y la inhibición/promoción del crecimiento de los cristales. Sin embargo, es necesaria una mayor investigación para

un mejor entendimiento de la influencia de estos factores sobre la formación y morfología de los cristales de NOB en sistemas de HPMCs.

CONCLUSIONES

Al calentar las dispersiones de Nobiletina se favorece su disolución, proceso que se revierte al descender la temperatura hasta aproximadamente 25°C. Por asociación de este compuesto con las moléculas del polisacárido se busca estabilizar a las soluciones de NOB, aprovechando, entre otras propiedades, la capacidad de los mismos como dispersantes y así evitar la re-cristalización del flavonoide.

Por lo tanto, el calentamiento promovió la disolución de la NOB, y todas las HPMCs fueron capaces de mantener hasta 0,01 % p/p (100 µg/mL) de NOB, es decir una concentración equivalente a 6 veces el máximo de solubilidad en agua. Más aun, las tres HPMCs utilizadas (K15, E50LV, E4M) fueron capaces de mantener en solución a la NOB durante 14 días; más allá de este tiempo se observó en todas las mezclas una desestabilización de la NOB (aparición de cristales de tamaño milimétrico, debido a un proceso de re-cristalización). Los resultados indicaron que se pueden formar sistemas acuosos con derivados de la celulosa que mantienen la NOB en solución, pero que luego de un tiempo esta re-cristaliza, formando un sedimento luego de un almacenamiento mayor a 21 días.

Por último, cabe destacar la importancia de caracterizar el tipo de interacción existente entre NOB y las distintas HPMCs, mediante técnicas que evidencien la formación de enlaces característicos, como por ejemplo FTIR.

BIBLIOGRAFÍA

Camino NA, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR. 2011. Hydroxypropylmethylcellulose at the oil-water interface. Part I. Bulk behaviour and dynamic adsorption as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 25: 1-11.

Camino NA, Pérez OE, Pilosof AMR. 2009. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high-intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 23: 1089-1095.

Camino NA, Sanchez CC, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR. 2012. Hydroxypropylmethylcellulose-b-lactoglobulin mixtures at the oil-water interface. Bulk, interfacial and emulsification behavior as affected by pH. *Food Hydrocolloids*, 27: 464-474.

Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. 2011. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 420: 1-10.

Kunimasa K, Ikekita M, Sato M, Ohta T, Yamori Y, Ikeda M, Kuranuki S, Oikawa T. 2010. Nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, suppresses multiple angiogenesis-related endothelial cell functions and angiogenesis in vivo. *Cancer Science*, 101: 2462-2469.

Li S, Wang H, Guo L, Zhao H, Ho C-T. 2014. Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites. *Journal of Functional Foods*, 6: 2-10.

Li Y, Zheng J, Xiao H, McClements DJ. 2012. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-

soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization *Food Hydrocolloids*, 27: 517-528.

Lindfors L, Forssen S, Westergren J, Olsson U. 2008. Nucleation and crystal growth in supersaturated solutions of a model drug. *Journal of Colloid and Interface Science*, 325: 404-413.

Luque-Alcaraz AG, Lizardi J, Goycoolea FM, Valdez MA, Acosta AL, Iloki-Assanga SB, Higuera-Ciapara I, Argüelles-Monal W. 2012. Characterization and Antiproliferative Activity of Nobiletin-Loaded Chitosan Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*: 1-7.

Murakami A, Kuwahara S, Takahashi Y, Ito C, Furukawa H, Ju-Ichi M, Koshimizu K, Ghigashi H. 2001. In vitro absorption and metabolism of nobiletin, a chemopreventive polymethoxyflavonoid in citrus fruits. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61: 194-197.

Onishi S, Nishi K, Yasunaga S, Muranaka A, Maeyama K, Kadota A, Sugahara T. 2014. Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, exerts anti-allergic effect by suppressing activation of phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Functional Foods*, 6: 606-614.

Onoue S, Uchida A, Takahashi H, Seto Y, Kawabata Y, Ogawa K, Yuminoki K, Hashimoto N, Yamada S. 2011. Development of high-energy amorphous solid dispersion of nanosized nobiletin, a citrus polymethoxylated flavone, with improved oral bioavailability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100: 3793-3801.

Pérez OE, Wargon V, Pilosof AMR. 2006. Gelation and structural characteristics of incompatible whey

proteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures. *Food Hydrocolloids*, 20: 966-974.

Shi M-D, Liao Y-C, Shih Y-W, Tsai L-Y. 2013. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells. *Phytomedicine*, 20: 743-752.

Yi Z, Yu Y, Liang Y, Zeng B. 2008. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT - Food Science and Technology*, 41: 597-603.

INFLUENCIA DE LA GOMA BREÁ EN LOS PARÁMETROS REOLÓGICOS DE MASAS OBTENIDAS DE LA MEZCLA DE HARINA DE TRIGO Y HARINA DE ARVEJAS – 80:20.

López E.P.¹, Jiménez P.L.² & Cuevas, C.M.¹

1: INIQUI - CONICET, Universidad Nacional de Salta, Av. Bolivia 5150, Salta Capital, Salta, Argentina.

2: Laboratorio de alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta.

epl_81@yahoo.com.ar / estelapatricialopez@gmail.com

Resumen: El objetivo fue evaluar la influencia de la goma breá (GB – 0,5 g p/p de mezcla) en los parámetros reológicos de masas obtenidas a partir de la mezcla 80:20 de harina de trigo (HT) y harina de arvejas (HA), y observar cómo éstos se relacionan con las características del pan conseguido. Se determinaron parámetros farinográficos, alveográficos y de viscosidad (RVA); luego se panificó y se comparó con un pan control (100% HT). La adición del hidrocoloide disminuyó la viscosidad máxima en la mezcla e incrementó la estabilidad y el valor de Setback. El hidrocoloide incrementó la absorción de agua; los restantes parámetros resultaron disminuidos respecto al control. La GB tampoco influyó en los parámetros alveográficos, pero la HA provocó masas más extensibles que tenaces, pegajosas y menos manejables. Por ello, los panes resultaron de menor volumen, alveolado compacto pero significativamente más húmedos. La adición de GB demostró influir en la absorción de agua y la humedad de las migas, lo cual significa que los panes adicionados con goma podrían

alcanzar una mayor vida útil. El resto de las modificaciones observadas fueron debidas a la dilución del gluten de trigo, causada por la incorporación de HA.

Palabras clave: Goma breá, harina de trigo; harina de arvejas, pan.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the influence of brea gum (BG - 0.50g w/w of mixture) on the rheological parameters of doughs made from the 80:20 mixture of wheat flour (WF) and pea flour (PF), and observe how these relate to the characteristics of the obtained bread. RVA, alveograph and farinograph parameters were determined; then, breads were developed and compared with a control one (100% WF). The addition of the hydrocolloid decreased the maximum viscosity of the mixture, and increased breakdown and setback. The gum also increased the farinographic water absorption, but the remaining parameters were decreased regarding the control bread. The BG showed no influence on alveographic parameters, but the PF caused sticky and less manageable doughs. Therefore, the loaves were of smaller volume and more compact crumb than the control, but significantly wetter. The addition of BG showed influence on the water absorption of the dough and in the crumb moisture, which could mean that breads with BG could have a longer shelf life. The rest of the changes observed were due to the dilution of wheat gluten, derived from the incorporation of PF.

Keywords: Brea gum, wheat flour; pea flour, bread.

INTRODUCCIÓN

Una mezcla de harina y agua, además de una pequeña cantidad de sal y posiblemente de otros componentes como conservantes, levadura o grasas, constituyen la masa del pan. La reología de la masa juega un papel importante en la calidad final de los productos panificados. En la química de cereales se utilizan una serie de determinaciones que simulan las operaciones necesarias para la elaboración del pan, tales como el amasado, la manipulación de la masa o la fermentación (Gómez Pallares *et al.*, 2007). Algunos de los equipos utilizados con este propósito son el farinógrafo Brabender, que evalúa el comportamiento de la masa durante el amasado y el Alveógrafo, que estudia la manejabilidad. Además, los ensayos de RVA aportan datos acerca del comportamiento del almidón, segundo componente mayoritario del pan, permitiendo observar el comportamiento experimentado por este ante la temperatura y la cizalla. Estos ensayos pueden adaptarse a diferentes condiciones de proceso y son muy útiles para optimizar formulaciones. Por esta razón, en este trabajo se emplearon estas técnicas a fin de evaluar las características de una mezcla de harina de trigo y harina de arvejas, adicionada con goma brea, y así encontrar correlación entre los resultados derivados de éstas con las características del pan obtenido.

Es sabido que la adición de una harina no formadora de gluten disminuye la calidad tecnológica del panificado, pero la incorporación de un hidrocoloide puede subsanar esta falencia. Por ello, hoy en día, el uso de aditivos se ha convertido en una práctica común en la industria de la panificación. El propósito de su uso es mejorar las propiedades de manejo de la masa para aumentar la calidad del pan fresco y así, extender la vida útil del pan almacenado, siendo los hidrocoloides, un grupo de aditivos extensamente utilizados en la industria alimentaria, ya que son capaces de controlar la reología y la textura de los sistemas acuosos estabilizando emulsiones, suspensiones y espumas (Dziezak 1991), o modificando la gelatinización del almidón (Correa 2012, Rosell *et al.* 2007, Rojas *et al.* 1999).

Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la goma brea (GB) en los parámetros reológicos de masas obtenidas a partir de la mezcla 80:20 de harina de trigo (HT) y harina de arvejas (HA), y observar cómo éstos se relacionan con las características del pan obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con harina de trigo comercial 0000 (Humedad: 10 g/100g; Proteína: 11,79 g/100g; Cenizas: 0,71 g/100g,) y harina de arvejas (HA) formulada en el laboratorio a partir de *Pisum sativum* (granulometría: 80 Mesh, Humedad: 10,80 g/100g; Proteína: 21,70 g/100g; Cenizas: 3,45 g/100g; Grasas: 0,15 g/100g). La composición

química se determinó según AOAC (1995) (métodos 925.09, 991.20, 923.03 y 922.06 respectivamente)

La mezcla utilizada fue de HT:HA – 80:20, la que posteriormente se adicionó con un 0,5% p/p de goma brea purificada. La goma brea nativa (en forma de gotas o lágrimas) fue donada por las comunidades autóctonas del Chaco Salteño.

Determinaciones

El perfil viscosimétrico de la harina control (HT), la mezcla (HT:HA-80:20) y la mezcla adicionada con el hidrocoloide (HT:HA-80:20+GB) se evaluó a partir del analizador rápido tipo Rapid Visco Analyser (RVA, RVA-TecMaster, Perten Instruments), de acuerdo al método estándar internacional de la AACC (2000b).

Se trabajó con $3,5 \text{ g} \pm 0,5 \text{ g}$ de harina, al 14% de humedad, y se determinó: Temperatura de inicio de gelatinización o de empaste. ($T^{\circ}\text{ig}$), Tiempo de empaste (min), Pico de máxima viscosidad en C_p (P_{mv}), Viscosidad al final del período de calentamiento o hold en C_p (95°C ; 10 minutos) (H), Viscosidad a 50°C en C_p (C), Estabilidad o breakdown (diferencia de viscosidad expresada en C_p entre el pico de máxima viscosidad y la viscosidad final del período de calentamiento) (P–H) y Asentamiento o setback (diferencia de viscosidad en C_p entre la viscosidad a 50°C y el pico de máxima viscosidad) (C–P). La velocidad de calentamiento/enfriamiento fue de $7,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, y el calentamiento máximo alcanzó los 95°C , manteniéndose esta temperatura durante 10 minutos.

Para la determinación del setback se enfrió la mezcla hasta los 50°C .

Las masas se realizaron a partir de las harinas y mezclas antes citadas y para evaluar las características de éstas durante el mezclado se trabajó con un Farinógrafo (Brabender, Duisburg, Alemania), siguiendo los métodos de la AACC (2000). Los parámetros evaluados fueron: absorción de agua (WA) o porcentaje de agua requerida para alcanzar una consistencia de la masa de 500 UB (Unidades Brabender), tiempo de desarrollo (DT, tiempo requerido para alcanzar la máxima consistencia, expresado en minutos), estabilidad (S, tiempo durante el cual la masa se mantiene a 500 UB, expresado en minutos), grado de ablandamiento o aflojamiento de la masa (DSO, caída de la consistencia de la masa luego de 12 minutos desde la aparición del pico, en UB) y Farinograph quality number (FQN, expresa la forma del farinograma en un número singular, las harinas débiles muestran un FQN bajo) (Wang *et al.* 2002, Miralbés 2004).

Para estudiar el comportamiento de las masas durante la fermentación, se trabajó con un Alveógrafo (Model Alveographe NG, Chopin, Francia)(AACC 54-30A 2000), determinando los siguientes parámetros: P (resistencia de la masa a la deformación), L (extensibilidad de la masa), P/L (relación entre la tenacidad y la extensibilidad de la masa: es una medida de la configuración de la curva) y W (energía de deformación o fuerza panadera) (Gómez Pallares *et al.* 2007, Miralbés 2004, Rosell *et al.* 2001).

Para la panificación se utilizó un horno eléctrico marca ATMA Easy Cook HP813, que permitió estandarizar el

amasado, la fermentación y el horneado de los todos los panes. Cada tipo de pan fue elaborado con levadura seca, sal (1,2 y 1,6 p/p de harina respectivamente), agua (la cantidad de agua correspondió a la WA determinada en el ensayo farinográfico) y GB al 0% para el control y 0,5% p/p de harina para los panes de prueba. En los panes mezcla con y sin la adición de GB, se evaluó: Volumen específico ($VE = \text{cm}^3/\text{g}$), Índice de VE (IVE: el VE del pan control se toma como 100%; el VE de los panes de prueba se calcula como un porcentaje del VE del pan control), Relación ancho/alto de la rodaja central, Estructura de la miga, determinando tamaño promedio de los alveolos, porcentaje del área cubierta por alveolos (o *area fraction*) (por análisis digital de imagen, a través del utilizando el software del programa ImageJ) y Humedad (AOAC, 1995) de la miga de los panes frescos.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó ANOVA; las diferencias entre las medias se analizaron a través de prueba de Tukey, considerándolas significativas cuando $*p < 0,05$. Se realizaron también correlaciones de Pearson entre Porcentaje de Área cubierta por alveolos vs. Tamaño promedio de alveolos y Porcentaje de Área cubierta por alveolos vs. Volumen Específico. Se utilizaron los programas Excel e InfoStat 2012.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** presenta los resultados referidos al perfil viscosimétrico de las harinas y mezclas estudiadas.

Tabla 1: Perfil de viscosidad de la harina de trigo y de las harinas mezcla estudiadas

	Control	HT:HA-80:20	
		Sin GB	Con GB
Pmv (cP)	2658±62c	2371±11b	2131±32a
H (cP)	1680±28b	1467±42a	1366±15a
C (cP)	3062±83b	2722±29a	2668±42a
Breakdown (cP)	978±32b	904±11b	765±22a
Setback (cP)	404±25a	351±26a	537±9b
Tiempo de pico Max. Visc. (min)	6,13±0,03a	6,07±0,11a	5,73±0,17a
Tig (°C)	66,85±0,30b	67,75±0,20b	67,65±1,12b

Medias ± DE (n=3). Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas (*p<0,05)

El pico de máxima viscosidad o viscosidad máxima (Pmv) a menudo se correlaciona con la calidad del producto final (Oluwamukomi y Jolayemi 2012). También proporciona una indicación sobre la carga viscosa que probablemente sea encontrada durante la mezcla (Maziya-Dixon *et al.* 2005; Maziya-Dixon *et al.* 2004). Dos factores interactúan para determinar la viscosidad máxima de una pasta de almidón cocido: el grado de hinchazón del gránulo y la solubilidad. Mayor hinchazón indica mayor viscosidad de pico, mientras que una mayor solubilidad, como resultado de la degradación del

almidón o dextrinización, reduce la viscosidad de la pasta (Shittu *et al.* 2001, Zobel 1984).

Las mezclas con HA evidenciaron un menor pico de viscosidad que la harina control, siendo la mezcla con adición de GB la que presentó el menor valor. Este efecto pudo deberse a que en dicha mezcla, la capacidad de hinchamiento de los gránulos de almidón fue disminuida por el alto número de componentes que compitieron por el agua del sistema (proteínas, fibras e hidrocoloide). Esto puede traer como consecuencia una menor calidad tecnológica del pan obtenido a partir de esta mezcla. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Funami *et al.* (2008).

La viscosidad final es un indicador de la estabilidad del gel de almidón durante la cocción (Zaidhul *et al.* 2006). Cuanto menor sea el valor, más estable es el gel de almidón (Aristizabal y Sánchez 2007). El breakdown es considerado como una medida del grado de desintegración de los gránulos o estabilidad de la pasta (Newport Scientific 1998; Dengate 1984). Los valores más altos de daño se asocian con mayores viscosidades máximas, que a su vez se relacionan con el grado de hinchamiento de los gránulos de almidón durante el calentamiento (Ragaei y Abdel Aal 2006). En la mezcla HT:HA, la estabilidad del gel de almidón fue similar a la de la HT, pero se incrementó (o disminuyó el valor de breakdown) al agregar GB porque los gránulos no presentaron un alto grado de hinchamiento, efecto dado por la menor disponibilidad de agua.

Los valores de Setback fueron significativamente mayores para HT:HA, particularmente para la mezcla con adición de GB, efecto que podría ser explicado por un proceso de

separación de fases, relacionado a un fenómeno de incompatibilidad entre los dos polímeros (almidón y goma), que en realidad no se encuentran ligados (Allonde y Doublier 1991), o explicado de otra forma, ambos polisacáridos presentarían una "exclusión" mutua por su incompatibilidad termodinámica, lo que resultaría en un incremento de la sinéresis del sistema compuesto. Esto se correlacionaría con la disminución del valor de Pmv y la menor cantidad de amilosa difundida.

En conclusión, las mezclas de HT:HA con o sin adición del hidrocoloide presentaron un perfil de viscosidad muy diferente a la harina control, lo que podría indicar que la calidad de los panes se vería desmejorada respecto a los elaborados con HT. La adición de GB mostró efectos significativos, es decir, que la presencia del hidrocoloide tendría un efecto protector del gránulo de almidón por lo que la estabilidad del polímero aumenta, pero la retrogradación se vio incrementada por la incompatibilidad que existiría entre el almidón y la goma. La **Tabla 2** y la **Figura 1** muestran los parámetros relacionados al estudio farinográfico.

Tabla 2: Absorción de agua (WA), ablandamiento (DS_o) y Farinograph Quality Number (FQN) de las masas elaboradas con harinas mezcla, con y sin agregado de GB.

Mezclas	WA (%)	DS _o (BU)	FQN
HT	55,70±0,07a	29,00±0,26a	201,00±1,41d
HT:HA	57,10±0,28b	36,50±0,69c	148,55±2,54b
HT:HA+GB	58,65±0,35c	37,87±0,21c	122,78±1,80a

Medias ± desvío estándar (n=3). Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas (p<0,05).

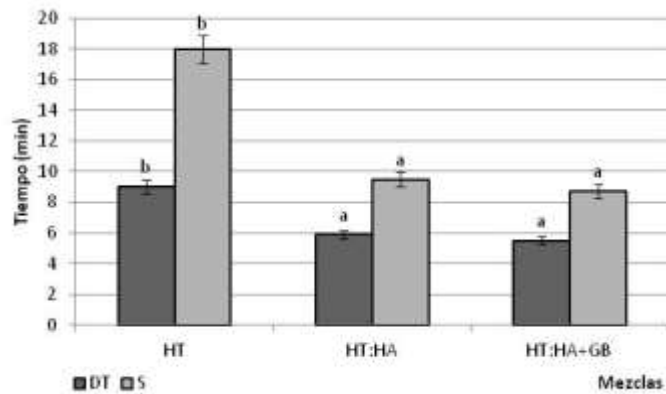


Figura 1: Tiempo de desarrollo (DT) y Estabilidad (S) de las masas elaboradas con harinas mezcla, con y sin agregado de GB.

Medias \pm desvío estándar ($n=3$). Letras diferentes en barras del mismo color denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

La cantidad de agua añadida se considera muy importante para la distribución de los diferentes componentes de la masa, su hidratación y el desarrollo de la red de gluten.

La WA fue significativamente superior al control ($*p < 0,05$) en las harinas mezcla, lo cual no sólo se justifica en la cantidad extra de proteínas derivadas de la HA, sino también en el aporte de fibras que esta harina hace a la mezcla. Los valores de WA para la mezcla HT:HA coinciden con lo publicado por Alasino *et al.* (2008). La adición de GB a la mezcla, incrementó significativamente ($*p < 0,05$) la WA. Al adicionar GB a la mezcla, la absorción de agua se incrementó aún más, dada la capacidad de la goma para retener agua por la presencia de grupos hidroxilo en la estructura del hidrocoloide, que permiten una mayor interacción del agua a través de las uniones

puente hidrógeno. Este hallazgo coincidió con lo reportado por Rosell *et al.* (2001) cuando estudió el efecto de la adición de alginato y HPMC a la formulación del pan y con lo reportado por Friend *et al.* (1993) al añadir goma xántica y HPMC a la masa de tortilla.

El tiempo de desarrollo (DT) (Figura 1) de las masas se interpreta como el tiempo necesario para que la consistencia de la masa alcance las 500 UB. Al adicionar HA a la HT, se observó una significativa ($*p < 0,05$) disminución del tiempo necesario para lograr una masa de 500 UB, efecto que puede explicarse por la menor cantidad de proteínas de reserva del trigo presentes en las mezclas, lo cual provocaría que el gluten se desarrolle precozmente, ya que las proteínas se hidratarían más rápidamente por la mayor presencia de agua en el sistema.

El grado de ablandamiento o caída de la consistencia de la masa (DSO, Tabla 2) fue superior ($*p < 0,05$) para las masas elaboradas con harinas mezcla y fue aún mayor en las masas a las que se adicionó GB al 0,5%. El DSO es un indicador de resistencia la amasado, por lo que se pudo concluir que las masas de harinas mezcla fueron menos tolerantes a la acción mecánica, lo que se explicaría por la interrupción de la estructura de la masa reportada por Güemes-Vera *et al.* (2004) y el debilitamiento del gluten formado. La incorporación del hidrocoloide incrementó aún más la caída de la consistencia, lo que se relacionaría con la disminución en el DT y la S. Similares resultados fueron reportados por Wang *et al.* (2002) al incorporar diferentes fibras a la masa del pan.

Estos resultados coincidieron con la disminución del FQN observada en las masas elaboradas con mezclas de harina, ya que la disminución en este índice muestra un debilitamiento de las masas (Miralbés 2004).

La Tabla 3 y la Figura 2 presentan los datos derivados del análisis alveográfico realizado a las masas de harinas mezcla.

Tabla 3: Tenacidad (P), extensibilidad (L) y fuerza panadera (W) de masas de harinas mezcla y adición de GB.

	P	L
HT	133,00±0,12b	29,00±0,78a
HT:HA	53,00±0,28a	69,00±1,41c
HT:HA+GB	50,00±0,99a	65,00±2,83c

Medias ± desvío estándar (n=2). Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas (*p<0,05).

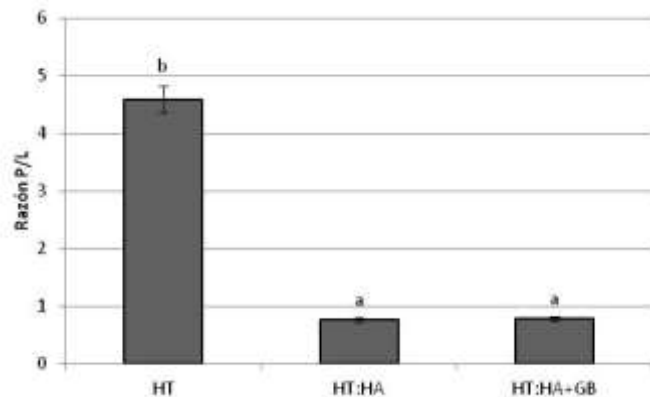


Figura 2: Relación P/L observada en las masas elaboradas con harinas mezcla, con y sin agregado de GB. Medias ± desvío estándar (n=3). Letras diferentes denotan diferencias significativas (*p<0,05).

La tenacidad de la masa o resistencia de la masa a la deformación (P) es una medida de la capacidad de la

masa para retener el gas producido durante la fermentación. P fue significativamente menor (*p<0,05) para la muestra elaborada a partir de HT:HA (con y sin el agregado de GB), lo que se debió al alto nivel de sustitución empleado (20%).

El agregado de GB al 0,5% pareció no tener influencia en la tenacidad de las masas de harinas mezclas, quizás porque la cantidad adicionada fue muy baja y los cambios en la resistencia a la deformación estuvieron más ligados al grado de sustitución por harinas diferentes a la de trigo que al agregado del hidrocoloide.

Por el contrario, la extensibilidad (L) de las masas fue fuertemente incrementada por la presencia de otra harina. Así, la HA promovió un marcado incremento en la extensibilidad de las masas y este comportamiento se tradujo en masas más blandas, lo cual se justificaría por la menor fuerza del gluten formado. Por ello, la relación P/L (Figura 2.) o equilibrio (que es una medida que brinda información sobre la resistencia elástica y el balance de extensibilidad de la masa) (Rosell *et al.* 2001) disminuyó significativamente (*p<0,05) en las masas de harinas mezclas, resultando más extensibles que tenaces, derivando en masas más blandas y pegajosas.

La fuerza panadera (W) o energía que se necesita para deformar la masa hasta que se rompe (Henao Osorio y Aristizabal Galvis 2009) fue disminuida, lo cual indudablemente se atribuiría al grado de sustitución que se empleó.

Los parámetros reológicos de las masas elaboradas a partir de harinas mezcla presentaron una WA mucho mayor a la HT, lo cual se tradujo en masas con menor tiempo de desarrollo y menor estabilidad. Las masas con HA fueron significativamente (*p<0,05) menos tenaces,

aunque presentaron un L mucho mayor a la harina control, derivando en una menor fuerza panadera W.

La **Tabla 4** resume los datos obtenidos en la evaluación de calidad de los panes elaborado con ambas mezclas de harinas.

Tabla 4: Parámetros de calidad del pan control y panes elaborados a partir de las mezclas de HT:HA-80:20 y HT:HA-80:20+GB.

	Pan de HT	Pan HT:HA 80:20	Pan HT:HA 80:20+GB
VE	2,26±0,05b	1,85±0,08a	1,79±0,10a
IVE	100c	82b	79a
RA/A	1,19±0,06a	2,21±0,03b	2,19±0,05b

Medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes en la misma fila denotan diferencias significativas (*p<0,05)

Los panes formulados con mezcla de harinas mostraron una disminución significativa (*p<0,05) en el volumen específico respecto al pan control, lo cual se tradujo en una marcada disminución del IVE. Estos resultados coincidirían con los obtenidos mediante los ensayos farinográficos y alveográficos. Como puede observarse, la adición de GB no fue favorable para lograr volumen, sino que por el contrario, produjo una disminución del VE y el IVE respecto al control HT. La relación ancho/alto, que es una medida de la forma de la rodaja, evidenció que los panes elaborados con harinas mezcla tuvieron menos volumen, ya que las rodajas fueron más anchas que altas. La **Tabla 5** expone los resultados referidos al análisis de la estructura de la miga. La **Figura 4** esquematiza los resultados derivados del análisis de humedad de los tres tipos de migas.

Tabla 5: Análisis de la estructura de la miga de los panes elaborados.

Pan	Tamaño prom. Alvéolos (mm)	% de área cubierta por alvéolos	N° alvéolos /cm ²
HT	3,84±0,03b	30,55±1,99b	7,97±0,42b
HT:HA	1,15±0,07a	18,12±1,40a	16,95±0,10a
HT:HA+GB	1,06±0,06a	17,74±1,80a	15,98±0,21a

Medias±DE (n=3). Letras diferentes en la misma columna denotan diferencias significativas (*p<0,05)

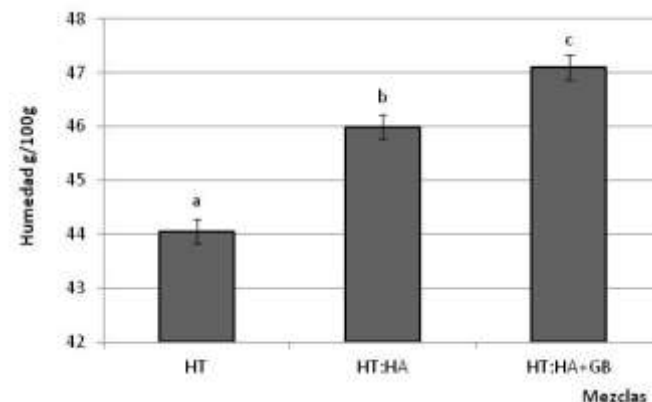


Figura 4: Humedad de las migas de los panes elaborados con harinas mezcla, con y sin agregado de GB. Medias ± desvío estándar (n=3). Letras diferentes denotan diferencias significativas (*p<0,05).

Se observaron diferencias significativas en el tamaño y distribución de los alvéolos: las migas de los panes elaborados con mezclas de harinas presentaron menor tamaño promedio de alvéolos y por ende mayor cantidad de éstos por unidad de área. Esto se tradujo en un menor porcentaje de área cubierta por alvéolos, lo cual se relaciona directamente con el volumen del pan. Se

observó que el porcentaje del área cubierta por alvéolos presentó una alta correlación positiva con el tamaño de los mismos ($r=0,97$ - $*p<0,05$) y con el VE ($r=0,95$ - $*p<0,05$).

Al comparar ambos panes de harinas mezcla entre sí, se observó que las migas del pan HT:HA presentaron mayor número de alvéolos/cm² y mayor porcentaje de área cubierta por alvéolos que las migas del pan adicionado con GB, lo cual se condice con lo hallado en el IVE. Así, se observó que la miga de los panes con HT:HA resultó mucho más compacta y apelmazada, en particular cuando se adicionó el hidocoloide, lo cual se debió a la menor fuerza del gluten formado.

Las migas de los panes elaborados con harinas mezcla fueron significativamente más húmedas ($*p<0,05$) que las del pan control (**Figura 4**) y el agregado de GB incrementó aún más esta diferencia. Este comportamiento se justificaría por la composición de estas migas (de mayor contenido de proteínas y fibras) y en la mayor cantidad de agua empleada para la formulación, dada por la WA farinográfica.

CONCLUSIÓN

La adición de GB demostró influir en algunos parámetros viscosimétricos y farinográficos de las masas, particularmente en el Pmv y la WA, lo cual se evidenció en los panificados obtenidos, dado que resultaron de menor IVE y menor calidad de la miga, pero de significativamente mayor contenido de humedad, lo cual significaría que los panes adicionados con goma podrían alcanzar una mayor vida útil en los ensayos de envejecimiento. El resto de las modificaciones observadas fueron debidas a la dilución del gluten de trigo, causada por la incorporación de HA en un alto nivel de sustitución (20%).

BIBLIOGRAFÍA

- AACC. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists. Method 76-21.01 (10 ed.) The Association, St Paul, MN.
- Alasino MC, Andrich OD, Sabbag NG, de la Torre, MA, Sanchez HD. (2008). Panificación con harina de arvejas (*Pisum sativum*), previamente sometida a inactivación enzimática. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 58: 397-402.
- AOAC. 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of Analysis (17th ed.). Washington, DC.
- Aristizabal J, Sanchez T. 2007. Análisis fisicoquímico del almidón. En: Mejía D, editor, Técnica para producción y análisis de almidones de yuca. Boletín de servicios agrícolas de la FAO número 163. Roma: FAO. Pág. 61-92.
- Correa M. 2012. *sedici.unlp.edu.ar*. [En línea] disponible en:
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/24532/Documento_completo_en_baja_resoluci%C3%B3n.pdf?sequence=2 [Último acceso: 20 Enero 2014].
- Dziezak J. 1991. A focus on gums. Food Technology, 45: 115-132
- Friend CP, Waniska RD, Rooney LW. 1993. Effects of hydrocolloids on processing and qualities of wheat Tortillas. Cereal Chemistry, 70: 252-256.
- Funami T, Nakauma M, Noda S, Ishihara S, Asai I, Inouchi N, Nishinari K. 2008. Effect of some anionic polysaccharides on the gelatinización and retrogradation behaviors of wheat starch: Soybean-soluble

polysaccharide and gum Arabic. *Food Hydrocolloids*, 22: 1528-1580.

Gómez Pallares M, León AE, Rosell C. (2007). Trigo. En León AE y Rosell MC, Editores. De tales harinas, tales panes. Primera edición. Córdoba: Ed. De la Universidad Nacional de Córdoba. Pág 19-62.

Güemes-Vera N, Arciniega-Ruiz Esperza O, Dávila-Ortiz G. 2004. Structural analysis of the *Lupinus Mutabilis* seed, its flour, concentrate, and isolate as well as their behavior when mixed with wheat flour. *LWT – Food Science and Technology*, 37: 283–290.

Maziya-Dixon B, Dixon AGO, Adebawale AA. 2004. Targeting different end uses of cassava: genotypic variations for cyanogenic potentials and pasting properties. A paper presented at ISTRC-AB Symposium, 31 October – 5 November 2004, Whitesands Hotel, Mombasa, Kenya.

Maziya-Dixon B., Sanni LO, Adebawale AA, Onabanjo OO., Dixon AGO. 2005. Effect of variety and drying methods on proximate composition and pasting properties of high quality cassava flour from yellow cassava roots. In: *Proceedings* of the African Crop Science Society Conference, Entebbe, Uganda. 5th – 9th December 2005.

Miralbés C. 2004. Quality control in the milling industry using near infrared transmittance spectroscopy. *Food Chemistry*, 88: 621-628.

Newport Scientific. 1998. Applications manual for the Rapid Visco Analyzer using thermocline for windows. Newport Scientific Pty Ltd., 1/2 Apollo Street, Warriewood NSW 2102, Australia. Pág. 2-26.

Oluwamukomi MO, Jolayemi OS. 2012. Physico-thermal and pasting properties of soy-melon-enriched "gari" semolina from cassava. *Agriculture and Engineering International: CIGR Journal*, 14:105-116.

Osorio S, Aristizabal Henao Galvis J. 2009. Influencia de la variedad de yuca y nivel de sustitución de harinas compuestas sobre el comportamiento reológico en panificación. *Ingeniería e Investigación*, 29: 39-46.

Ragae S, Abdel-Aal EM. 2006. Pasting properties of starch and protein in selected cereals and quality of their food products. *Food Chemistry*, 95: 9-18.

Rojas J, Rosell C, Benedito de Barber C. 1999. Pasting properties of different wheat flour - hydrocolloids systems. *Food Hydrocolloids*, 13: 27-33.

Rosell C, Collar C, Haros M. 2007. Assessment of hydrocolloid effects on thermomechanical properties of wheat using the Mixolab. *Food Hydrocolloids*, 21: 452-462.

Rosell C, Rojas JA, Benedito de Barber C. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15: 75–81.

Shittu TA, Lasekan OO, Sanni LO, Oladosu MO. 2001. The effect of drying methods on the functional and sensory characteristics of pupuru-a fermented cassava product. *ASSET-An International Journal of Agricultural Sciences, Science, Environment and Technology*, 1: 9-16.

Wang J, Rosell CM, Benedito de Barber C. 2002. Effect of the addition of different fibres on wheat dough performance and bread quality. *Food Chemistry*, 79: 221-226.

Zaidul ISM, Hiroaki Y, Sun-Ju K, Naoto H, Takahiro N. 2006. RVA study of mixtures of wheat flour and potato starches with different phosphorus contents. *Food Chemistry*, 102: 1105 -1111.

Zobel HF. 1984. Gelatinization of Starch and Mechanical Properties of Starch Pastes. In *Starch: Chemistry and Technology*, Whistler, R L, BeMiller JN y Paschal EF, Editores. New York: Academic Press. Pág. 300-302.

COMPOSICIÓN PROTEICA DE MAÍZ *OPACO-2* DE POLINIZACIÓN LIBRE

Mansilla P.S.¹⁻², **Nazar M.C.**¹ y **Pérez G.T.**¹⁻²

1: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

pmansilla@agro.unc.edu.ar

Resumen: El objetivo fue determinar la composición proteica de una variedad de polinización libre de maíz *opaco-2* mediante un estudio de progenies. Se seleccionaron doce mazorcas de medios hermanos (2012) de la variedad original (CIMMYT, PO2), y se obtuvieron sus progenies individuales (2013). Se analizaron genotipos no opacos con fines comparativos (Blanco, BL y Pisingallo, PS). A la harina se le extrajo las albúminas (AL), globulinas (GB), zeínas (Z), zeínas 2 (Z2), glutelinas G2, y glutelinas G3 mediante extracción secuencial. El contenido proteico total (PT) y el de cada fracción se determinó por micro-Kjeldahl. PT varió entre 8,34 y 11,58 % en los genotipos opacos parentales (2012), y entre 10,55 y 12,98 % en sus progenies (2013), mostrando variaciones en las fracciones proteicas respecto a PO2. El porcentaje de zeínas (Z+Z2) fue significativamente menor en los genotipos opacos (24,42%) respecto a los no opacos (48,97% PS y 52,83% BL). Z+Z2 correlacionó negativamente con las glutelinas (G2+G3) ($r=-0,55$) y con AL+GB tanto en opacos ($r=-0,69$), como no opacos ($r=-0,91$). El menor contenido de zeínas en relación a las otras

fracciones proteicas obtenido en los genotipos opacos, y las diferencias encontradas entre ellos, posibilitará la selección de individuos con mayor calidad proteica.

Palabras clave: maíz, zeína, opaco.

Abstract: The objective was to determine the protein composition of open pollinated variety maize opaque-2 through a progeny testing. Twelve half-sib ears were selected (2012) of the original variety (CIMMYT, PO2) and their individual progeny (2013) were obtained. Non-opaque genotypes were analyzed for comparison (White, BL and Popcorn, PS). Albumins (AL), globulins (GB), zeins (Z), zeins 2 (Z2), glutelins (G2), and glutelins (G3) were extracted from corn flour by sequential extraction. Protein content (P) of each fraction was determined by micro-Kjeldahl. Total grain protein ranged from 8.34 to 11.58% in parental opaque genotypes (2012), and from 10.55 to 12.98% in their progeny (2013), showing variability in the protein fractions respect to PO2. The percentage of zein (Z+Z2) was significantly lower in the opaque genotypes (24.42%) respect to non-opaque (PS=48.97% and BL=52.83%). Z+Z2 showed a negative correlation with glutelins (G2 + G3) ($r = -0.55$) and AL+GB both opaque ($r = -0.69$) and non-opaque ($r = -0.91$). The lower content of zein in relation to other protein fractions obtained in the opaque genotypes, and the differences between them, enable the selection of genotypes with higher protein quality.

Keywords: maize, zein, opaque.

INTRODUCCIÓN

El maíz es el cultivo de mayor área sembrada y cosechada del mundo. Esta característica hace que este cereal tanto como materia prima, como los productos de su transformación o la tecnología para la producción, sean elementos centrales en las negociaciones entre países y bloques del mundo (Maizar 2011).

Los maíces especiales son aquellos que poseen características diferenciales. Nuestro país lidera varios de estos mercados a nivel mundial, y a nivel local aumentan la competitividad de las industrias que los requieren como materia prima (INTA PRECOP II 2010).

En la provincia de Córdoba, las economías regionales, especialmente las de maíz, se encuentran desplazadas por los procesos económicos de globalización, que trasvasan las culturas con un impacto negativo que agudiza los problemas actuales en cuanto a este cultivo se refiere (Nazar *et al.* 2012). Estos procesos económicos dejaron fuera del sistema a los pequeños productores por falta de competencia, lo que ha generado una disminución de la población rural, con una subsistencia con escasos recursos y calidad de vida (Nazar *et al.* 2012). La pérdida de la agrodiversidad, de conocimientos y tradiciones de la cultura de producción para el autoconsumo, la falta de capacitación sobre una alimentación variada, equilibrada, y de la calidad nutricional de los alimentos que consumen, compromete seriamente su seguridad alimentaria (Nazar *et al.* 2014). Una alimentación deficiente en energía, baja en proteínas de calidad y micronutrientes, dificulta el crecimiento de los niños, los hace vulnerables a enfermedades,

disminuye su capacidad de aprendizaje y reduce su esperanza de vida (Muehlhoff y Boutrif 2010).

Los maíces especiales de polinización libre, se adaptan fácilmente a diversas condiciones edafo-climáticas por sus características genéticas, se manejan en general como cualquier otra variedad de maíz, y no es necesario el gasto de semillas todos los años (Nazar 2005). Sin embargo, resulta necesario evaluar su composición química para seleccionarlos como alimentos de alto valor nutricional que contribuyan a la calidad agroalimentaria.

La proteína de maíz es considerada de bajo valor nutricional cuando se compara con la proteína de origen animal, debido a un desbalance de aminoácidos (Mendoza-Elos *et al.* 2006). Según el esquema de Osborne, las proteínas de maíz están formadas por cinco fracciones: Albúminas y globulinas (5%), prolaminas (44%), glutelinas (28%) y proteínas residuales (17%) (Hoseney 1991). Dentro de las prolaminas, las más abundantes son las zeínas, que son deficientes en lisina y triptófano, y representan entre el 44 y 79% del total de proteínas del endosperma (Lawton y Wilson 2003).

En el maíz existen genes que modifican la cantidad y calidad proteica del endosperma, ya que actúan principalmente sobre la síntesis de zeína. El maíz con alto contenido de lisina y triptófano, lleva el gen mutante recesivo *opaque 2*, que limita la síntesis de zeína, y permite generar una matriz proteica más delgada y con diferente distribución de aminoácidos, que se traduce en la duplicación del contenido de lisina y triptófano (Gibbon y Larkins 2005). La expresión de este gen lo convierte en maíz con valor nutritivo superior al maíz normal (Ortega *et al.* 2001). Varios estudios en nutrición humana

demonstraron que mejora el estado nutricional de grupos vulnerables, cuyo alimento básico es el maíz y que no pueden adquirir alimentos ricos en proteínas para suplementar su dieta. Esto le otorga un gran potencial para reducir la desnutrición proteínica, aminorar el hambre, aumentar los ingresos y mejorar el nivel de vida de la población (Vivek *et al.* 2008). El estudio de genotipos que presenten estas características posibilitará el desarrollo de variedades mejoradas en calidad proteica, y a partir de éstas, la elaboración de alimentos de alto valor nutricional. El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición proteica de una variedad de polinización libre de maíz *opaco-2* mediante un estudio de progenies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Genético

Se utilizó como material de partida una variedad de polinización libre de maíz *opaco-2* (PO2) otorgada por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Se realizó una siembra de adaptación de dicho material en diciembre de 2011 en el Campo Experimental de la Facultad Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba. De la cosecha 2012 (junio), se individualizaron aleatoriamente 12 mazorcas principales de plantas diferentes (medios hermanos), con buenas características sanitarias, de las cuales se destinaron 200 semillas de cada una para su siembra individual a campo, con el propósito de obtener sus progenies. El resto de los granos, se molieron en un molino de cuchillas (Fbr Decalab), para su análisis individual en laboratorio. En diciembre de 2012, se sembraron las semillas de cada

mazorca cosechada en un surco individual, respetando un esquema de surco/progenie, las cuales se inter cruzaron libremente al momento de floración. La siembra se realizó en el mismo Campo Experimental, pero en diferente lote. De la cosecha individual de cada surco/progenie en junio de 2013, se seleccionaron sólo los granos opacos de cada surco en una mesa de luz (Vivek *et al.* 2008), de los cuales se destinaron 200 semillas para la siembra y obtención de sus descendientes bajo el mismo esquema, y el resto se molieron para su análisis individual. Se utilizó como testigo la población original (PO2) de donde se obtuvieron las progenies y harinas de dos genotipos no opacos (maíz blanco, BL y pisingallo, PS).

Determinación de contenido total de proteínas.

Para determinar el contenido total de proteínas de las muestras se utilizó el método de micro-Kjeldahl modificado para ácido bórico (AACC 2000). El porcentaje de proteína fue calculado usando el factor general 6,25.

Extracción secuencial de las fracciones proteicas

Antes de la extracción secuencial, 150 mg de cada muestra de harina fue desgrasada con 80% hexano, 20% éter etílico (v/v) y posteriormente secada para eliminar el solvente residual.

A la harina desgrasada se le realizó extracción secuencial por cuadruplicado. La fracción de albúminas (AL) se extrajo con 1,5 ml de agua y agitación durante 1 hora a

4°C. Posteriormente se centrifugó durante 15 min a 18000 g a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y el precipitado fue extraído nuevamente con 0,5 ml agua, durante 30 min y centrifugado en las mismas condiciones descriptas anteriormente y se juntaron ambos sobrenadantes. La extracción de las globulinas (GL) se realizó siguiendo la misma metodología, pero usando una solución de ClNa 0,5M. Para la extracción de zeínas (Z) se utilizó 70% etanol, 0,5% acetato de sodio. La segunda fracción de zeínas (Z2) se extrajo con 70% etanol, 0,5% acetato de sodio, 0,6% Dithiothreitol (DTT) en las mismas condiciones antes descriptas. Las glutelinas G2 fueron extraídas con buffer borato pH 10, 0,6 % DTT y las glutelinas G3, con buffer borato pH 10, 0,6 % DTT, 0,5 % SDS. Los sobrenadantes fueron almacenados en el freezer hasta su uso. El contenido de proteínas de cada fracción se cuantificó por el método de Kjeldahl.

Electroforesis de los extractos

Se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (Laemmli 1970) de las fracciones obtenidas. Para ello, se precipitaron los extractos con acetona y luego fueron resuspendidos en buffer de muestra con 0,063 M de Tris / HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% de glicerol, con 5% β - Mercaptoetanol y 0,05 % de azul de bromofenol (Ng y Bushuk 1987) y calentadas a 95°C por 5 min. Se utilizó un marcador Bio-Rad SDS-PAGE Standars, Broad Range (200 a 6,5 kDa) para determinar el peso molecular de las bandas polipeptídicas de los extractos.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y comparados mediante el test de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) (Di Rienzo *et al.* 2002). Las relaciones entre variables se analizaron mediante un test de correlación de Pearson, con un nivel de significancia $p < 0,05$. Se utilizó el programa estadístico Infostat (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido total de proteína en los doce genotipos opacos seleccionados aleatoriamente varió entre 8,34 y 11,58 % en el primer año de ensayo (Cosecha 2012) (Tabla 1). Estos valores fueron similares a los obtenidos por Mendoza-Elos *et al.* (2006) , en cuatro genotipos de maíz QPM (Quality Protein Maize) provenientes del CIMMYT, con un rango de 10 a 11 % de proteína, y más bajos que los reportados por Cuevas-Rodríguez *et al.* (2004), en una variedad QPM mexicana de la Estación Experimental Culiacán, con una oscilación de 9,1 a 13,1% de proteína.

Tabla 1: Contenido total de proteínas y porcentaje de zeínas y no zeínas (albúminas + globulinas, y glutelinas) en función de total de proteínas extraídas de doce genotipos de medios hermanos (cosecha 2012) y sus progenies (cosecha 2013) obtenidos de una variedad de polinización libre de maíz *opaco-2*.

N° de Prog	Proteína Total (%)			Zeínas (%)			No Zeínas (%)					
							Alb + Glob (%)			Glutelinas (%)		
	Cosecha 2012	Cosecha 2013	Media de años	Cosecha 2012	Cosecha 2013	Media de años	Cosecha 2012	Cosecha 2013	Media de años	Cosecha 2012	Cosecha 2013	Media de años
P 19	10,32	11,9	11,11c	17,93	28,89	23,41b	49,65	35,9	42,78b	32,43	35,21	33,82b
P 20	9,64	10,55	10,09a	31,47	26,15	28,81c	36,47	40,00	38,24a	32,06	33,85	32,96b
P 22	9,96	10,91	10,44b	14,74	20,33	17,53a	47,52	41,96	44,74c	37,75	37,72	37,74c
P 25	11,29	12,52	11,90d	21,54	24,53	23,03b	42,61	40,98	41,80b	35,86	34,50	35,18b
P 26	9,94	11,4	10,67b	28,58	27,09	27,83c	35,63	38,33	36,98a	35,8	34,59	35,20b
P 28	11,58	12,98	12,28e	23,15	27,7	25,42b	44,43	39,70	42,07b	32,42	32,60	32,51b
P 5	10,93	11,57	11,25c	25,59	25,69	25,64b	38,09	36,89	37,49a	36,32	37,43	36,88c
P 10	10,85	11,21	11,03c	19,94	27,98	23,96b	36,68	33,44	35,06a	43,39	38,59	40,99c
P 13	9,46	10,66	10,06a	18,77	22,64	20,70b	36,94	39,73	38,34a	44,29	37,64	40,97c
P 15	9,28	10,95	10,11a	18,45	22,25	20,35b	45,06	39,47	42,27b	36,5	38,28	37,05c
P 18	8,34	11,19	9,76a	20,01	23,46	21,73b	42,3	39,25	40,78a	37,7	37,3	37,50c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<=

0,05)

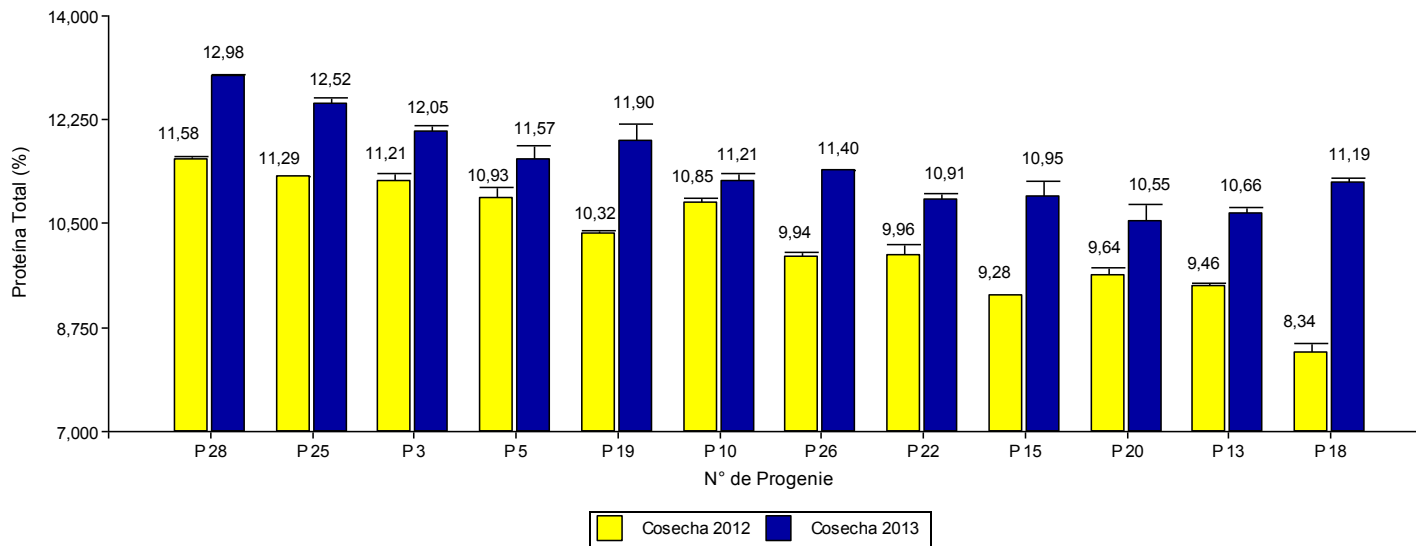
¹PO2: Población Original; ²T1: Testigo maíz pisingallo; ³T2: Testigo maíz blanco

Sin embargo, las doce progenies descendientes (Cosecha 2013) mostraron un incremento en la media de 1,26 % respecto a la de sus progenitores, con un rango que osciló entre 10,55 a 12,98 % (Tabla 1). Estos valores resultaron mayores a los obtenidos por Corcuera *et al.* (2013) en veinte híbridos simples experimentales mejorados para calidad proteica con el gen opaco-2 incorporado, del INTA Castelar, con una variación entre 9,5 y 12,5% en su contenido proteico. Las P 28, P 25 y P 3 mostraron los mayores contenidos de proteína manteniéndose en el mismo ranking en ambos años de ensayo (Figura 1).

Figura 1: Contenido total de proteína de los doce genotipos parentales de opacos seleccionados (cosecha 2012) y de sus progenies (cosecha 2013).

Los genotipos no opacos utilizados como testigos en este estudio mostraron valores de proteína (11,17 % en maíz blanco y 10,33 % en maíz pisingallo, Tabla 1) similares a los reportados por Robutti *et al.* (2000), con valores de 11,1 % en un genotipo dentado blanco y 11,9 % en pisingallo, ambos provenientes del banco de germoplasma de variedades locales argentinas de Pergamino.

Las proteínas verdaderas de maíz se agrupan en dos clases. El grupo de las no zeínas (compuestas por las fracciones de albúminas, globulinas y glutelinas) ricas en lisina y triptófano, y las zeínas, que contienen muy bajas cantidades de estos aminoácidos (Landry *et al.* 2005). Al expresar los datos como un porcentaje del total de proteínas, se observaron



variaciones en los contenidos medios de las fracciones proteicas que componen dichos grupos en las progenies de opaco seleccionadas respecto a la población (PO2) de las que fueron obtenidas las mismas. La P 22 mostró una disminución significativa de 5,19 % en el valor medio de la fracción de zeínas respecto a la población original, aumentando el contenido de las otras fracciones proteicas del grupo de las no zeínas, cuya distribución se observó más significativamente en las albúminas y globulinas (44,74 %) que en la de glutelinas (37,74 %) (Tabla 1). En oposición, se obtuvo un incremento de 13,63 % en la fracción de zeínas de la P 3 respecto a su población de partida, presentando los menores valores de albúminas y globulinas (34,33 %) y glutelinas (29,33 %). Es importante destacar que esta progenie también presentó uno de los mayores contenidos de proteína total en ambos años de ensayo (Tabla 1).

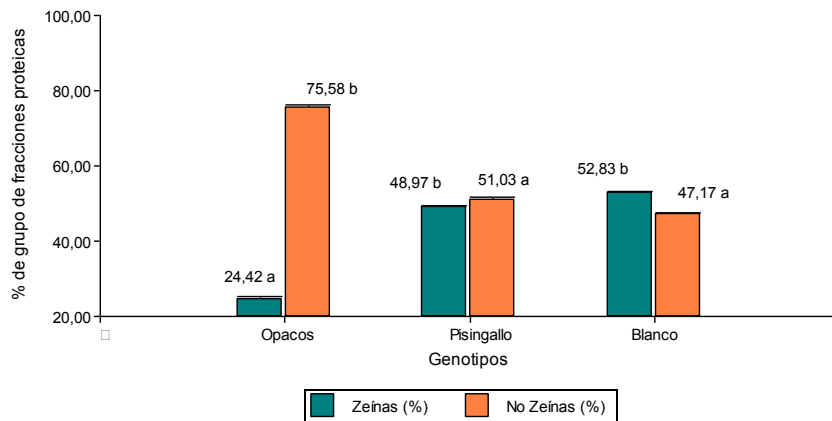


Figura 2: Porcentaje de fracciones proteicas (grupo de zeínas y no zeínas) de los genotipos no opacos (pisingallo y blanco) y genotipos opacos (valor medio de todas las progenies).

El promedio de los porcentajes de las fracciones de zeínas de los genotipos opacos en ambos años de estudio fue de 24,42%, mostrándose significativamente menores a los de maíz pisingallo (48,97%) y maíz blanco (52,83%) utilizados como testigos no opacos (Figura 2). Wang *et al.* (2008) reportaron una variación de 49,76 a 73,61% de la fracción de zeínas en cinco líneas retrocruzadas de un maíz forrajero mexicano en proceso de mejora para contenido de proteína. Por otro lado, Landry *et al.* (2005) obtuvieron 41,5 % de zeínas en un genotipo opaco probado en la Universidad de San Pablo. Estos valores son considerablemente mayores a los obtenidos en este estudio.

Las fracciones correspondientes al grupo de las no zeínas mostraron un promedio de 75,58 % en los genotipos opacos, significativamente mayores a los valores de pisingallo (51,03 %) y blanco (47,17 %) (Figura 2).

Correlaciones

La fracción de zeínas correlacionó negativamente con las glutelinas ($r=-0,55$ $p<0,05$) y con la suma de albúminas y globulinas tanto en los genotipos opacos ($r=-0,69$ $p<0,05$) (Tabla 2) como en no opacos ($r=-0,91$ $p<0,05$) (Tabla 3). Al disminuir la cantidad de zeína, aumenta el contenido de las fracciones de albúminas, globulinas y

glutelinas, que son ricas en lisina (Vivek *et al.* 2008). Landry *et al.* (2004) demostraron que a medida que aumentaba la fracción de albúminas y globulinas del 2 al 22 %, la fracción de zeínas decreció del 87 al 21%, y las glutelinas verdaderas incrementaron del 11 a 57% en varios genotipos de maíz y sus parientes silvestres. Se observó una correlación positiva entre el contenido total de proteínas con la fracción de zeínas en los genotipos opacos ($r=0,37$ $p<0,05$) (Tabla 2) y en los no opacos ($r=0,98$ $p<0,05$) (Tabla 3). Esto podría indicar que la fracción de zeínas se ve altamente modificada ante variaciones en el contenido total de proteínas, distribuyendo el contenido proteico en las fracciones correspondientes al grupo de las no zeínas.

Tabla 2: Tabla de correlaciones de genotipos opacos

	Prot. Total (%)	Alb+Glob (%)	Zeínas (%)	Glutelinas (%)
Prot. Total (%)	1			
Alb+Glob (%)	-0,22	1		
Zeínas (%)	0,37*	-0,69**	1	
Glutelinas (%)	-0,25	-0,23	-0,55**	1

Tabla 3: Tabla de correlaciones de genotipos no opacos

	Prot. Total (%)	Alb+Glob (%)	Zeínas (%)	Glutelinas (%)
Prot. Total (%)	1			
Alb+Glob (%)	-0,96**	1		
Zeínas (%)	0,98**	-0,91*	1	
Glutelinas (%)	-0,3	0,06	-0,47	1

Análisis de electroforesis.

La Figura 3 y Figura 4 muestran el patrón electroforético de la fracción de zeínas de los doce genotipos opacos parentales (2012) y de sus progenies (2013), respectivamente. En ambos años, la fracción de zeínas presentó bandas de peso molecular entre 6,5 y 31 kDa. Landry *et al.* (2004) obtuvieron un rango entre 14 a 22 kDa en extractos de zeínas de endosperma vítreo y harinoso.

Se observaron diferencias en el patrón de bandas entre los genotipos. Aquellos que mostraron bandas de mayor densidad, son los que presentaron mayor contenido proteico de la fracción. Se observó un significativo aumento en la intensidad de la banda correspondiente a las zeínas entre 21 y 31 kDa y a las de 45 kDa en los genotipos no opacos (BL, blanco y PS, pisingallo, Fig. 4) respecto a las progenies de opaco. La P3 presentó un aumento en la intensidad de bandas correspondiente a

las zeínas del mismo peso molecular en comparación a los demás genotipos opacos, en ambos años de estudio (Fig. 3 y Fig. 4). Este genotipo mostró el mayor contenido proteico total y el de la fracción de zeínas en ambas cosechas (Tabla 1). En el año 2012, se observó una disminución en la intensidad de bandas correspondiente a las zeínas entre 31 y 21 kDa en la P22, mostrando un aumento en su progenie (2013). Esta muestra presentó el menor contenido de esta fracción y el mayor contenido de albúminas y globulinas (Tabla 1).

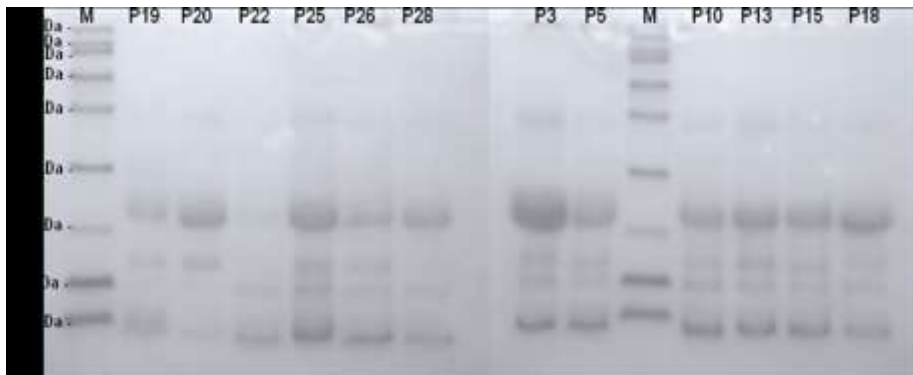


Figura 3. Patrón electroforético de la fracción de zeínas de los doce genotipos opacos parentales (cosecha 2012). Los carriles representan los genotipos (P) y el marcador de peso molecular (M)

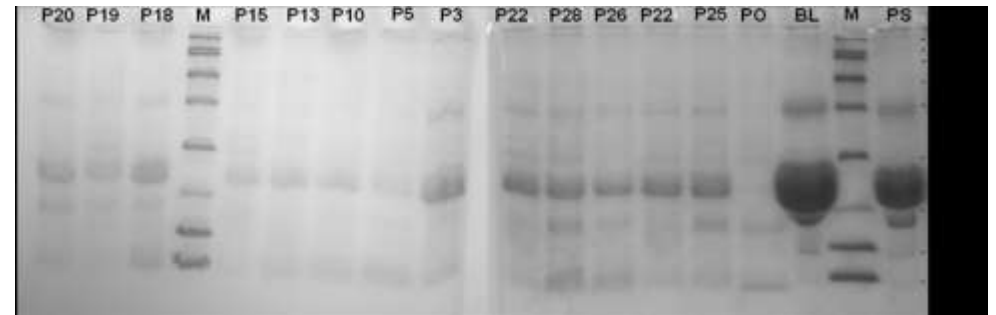


Figura 4. Patrón electroforético de la fracción de zeínas de las doce progenies de genotipos opacos (cosecha 2013). Los carriles representan los genotipos (P), la noblación original (PO), testigos no opacos (BL),

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra la variabilidad existente en la composición proteica de una variedad de polinización libre de maíz *opaco-2*, dada no solo por las diferencias genéticas de sus individuos, sino por la influencia del ambiente sobre éstos, reflejado en las diferencias obtenidas en los genotipos seleccionados como parentales en el primer año de estudio, y el desempeño de sus progenies para el carácter estudiado. El menor contenido de zeínas en relación a las otras fracciones proteicas obtenido en los genotipos opacos respecto a los no opacos utilizados en este estudio, está relacionado con una mayor calidad de la proteína de maíz. Esto permitirá la selección de los mejores genotipos, con la posibilidad de generar variedades mejoradas en calidad proteica, y disponer de alternativas para la producción de alimentos de alto valor nutricional en base a ellas.

BIBLIOGRAFÍA

- American Association of Cereal Chemists. (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists (9th ed.). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Corcuera, V., Salmoral, E., Kandus, M., Ferrero, V., & Salerno, J. (2013). Análisis proximal del grano de los maíces de uso especial. I. Contenido de proteína, almidón y aceite. Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. AATA.
- Cuevas-Rodríguez, E., Milán-Carrillo, J., Mora-Escobedo, R., Cárdenas-Valenzuela, O., & Reyes-Moreno, C. (2004). Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 37(1), 59–67. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643803001348>
- Di Rienzo, J., Guzmán, A., & Casanoves, F. (2002). A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics*, 7(2), 1–14.
- Gibbon, B., & Larkins, B. (2005). Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics*, 21(4), 227–233. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797618>
- Hoseney, C. (1991). *Principios de la ciencia y tecnología de los cereales* (p. 378). Zaragoza, España: Acribia S.A.
- INTA PRECOP II. (2010). Maíz. Cadena de valor agregado. Córdoba: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Retrieved from <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/folletos/FolletoMaizConValorAgregado.pdf>

- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. *Nature* 227:681-685.
- Landry, J., Damerval, C., Azevedo, R., & Delhaye, S. (2005). Effect of the opaque and flourey mutations on the accumulation of dry matter and protein fractions in maize endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(6), 549-556.
- Landry, J., Delhaye, S., & Damerval, C. (2004). Protein Distribution Pattern in Flourey and Vitreous Endosperm of Maize Grain. *Cereal Chemistry*, 81(2), 153-158. Retrieved from <http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2004.81.2.153>
- Lawton, J., & Wilson, C. (2003). Proteins of the kernel. In P. White & L. Johnson (Eds.), *Chemistry and Technology* (2nd ed., pp. 313-354). American Association of Cereal.
- Maizar. (2011). El maíz, primero en el mundo. Retrieved from <http://www.maizar.org.ar/vertex.php?id=392>
- Mendoza-Elos, M., Andrio-Enríquez, E., Juárez-Goiz, J., Mosqueda-Villagómez, C., Latournerie-Moreno, L., Castañón-Nájera, G., ... Moreno-Martínez, E. (2006). Contenido de lisina y triptófano en genotipos de maíz de alta calidad proteica y normal. *Universidad Y Ciencia*, 22(2), 153-161.
- Muehlhoff, E., & Boutrif, E. (2010). Nueva política de huertos escolares. FAO. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/013/i1689s/i1689s00.pdf>
- Nazar, M. (2005). Semillas y Semilleros. *Vivencia de La Escuela Agro Técnica de Tuclame*. Córdoba.
- Nazar, M., Santiago, A., Mansilla, P., Quiroga, N., Biasutti, C., de la Torre, V., & Pérez, G. (2014). Agricultura, Alimentación, Nutrición: estrategias de seguridad alimentaria para el desarrollo local y sustentable en las escuelas rurales y periurbanas cordobesas. Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Nazar, M., Santiago, A., Mansilla, P., Quiroga, N., Cravero-Banegas, M., Perrachione, M., ... Aimar, B. (2012). La extensión rural, para el desarrollo de la agricultura y la seguridad alimentaria. Córdoba: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.
- Ng, P., & Bushuk, W. (1987). Glutenin of Marquish wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 64, 324-327.
- Ortega, C., Cota, A., Vasal, S., Villegas, M., Córdoba, O., Barreras, S., ... Espinoza, C. (2001). H-441C, H-442C y H-469C, híbridos de maíz de calidad proteínica mejorada para el Noroeste y subtropical de México. INIFAP.
- Robutti, J., Borrás, F., Ferrer, M., Percibaldi, M., & Knutson, C. (2000). Evaluation of Quality Factors in Argentine Maize Races. *Cereal Chemistry*, 77(1), 24-26.
- Vivek, B., Krivanek, A., Palacios-Rojas, N., Twumasi-Afryie, S., & Diallo, A. (2008). *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM*. (p. 66). México, D.F.: CIMMYT.
- Wang, L., Xu, C., Qu, M., & Zhang, J. (2008). Kernel amino acid composition and protein content of introgression lines from *Zea mays* ssp. mexicana into cultivated maize. *Journal of Cereal Science*, 48(2), 387-393. Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521007002044>

ESTUDIO Y CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS POST COSECHA EN EL CENTRO DE ABASTECIMIENTO DE VEGETALES DEL MUNICIPIO DE SALGUEIRO/PE – BRASIL

**Mesquita, RVSC¹; Silva, AE¹; Santos, MAF¹; Carlini, NRBS¹;
Umsza-Guez MA², Coelho, EM²**

1: Instituto Federal do Sertão Pernambucano, Campus Salgueiro - Salgueiro, PE, Brasil;

2: Universidade Federal da Bahia - Salvador, BA, Brasil.

roberta_mesquita@hotmail.com

Resumen: El objetivo del trabajo fue disminuir las pérdidas post cosecha de vegetales en el Centro de Abastecimiento – CEASA, en el municipio de Salgueiro/PE, por medio de cursos de capacitación. El estudio fue dividido en 3 etapas: La visita exploratoria - levantamiento de datos de las pérdidas; La visita para la medición – identificación y pesaje de las pérdidas; La formación de los empleados - capacitación de empleados del Centro de Abastecimiento. También fue realizada una campaña apuntando promover la disminución de desperdicio (50% de descuento en los productos que estaban en el final del día). Entre los productos con mayores pérdidas son: naranja 13,5%, cebolla 12,54%, tomate 13,31%, papas 11,29% y mango 11,28%. Los resultados encontrados están de acuerdo con la literatura, 30 a 40% de los productos de la cosecha no llega al consumidor, debido a las prácticas inadecuadas. Toda intervención realizada, así como, la

capacitación tuvieron repercusiones muy positivas para el Centro de Abastecimiento.

Palabras claves: Pérdidas post cosecha, Buenas Prácticas de Manipulación, Vegetales

Abstract: In order to reduce post-harvest vegetables losses in the Supply and Logistics Center of the state of Pernambuco CEASA / PE - Brazil, in the village of Salgueiro, short courses on theoretical and practical training were offered. The study was divided into 3 stages: the exploratory visit - detailed survey data losses; visits for measurement – The losses were observed, identified and later weighed in scales; The employee training - training employees of the Supply Center. Actions were taken also to rearrange yard sales places, a guide for a campaign called "SURPLUS GREEN" which aimed to conduct 50% sales discount for the products that were left at the end of the day, thus to further minimize waste to a minimum. Among the products with higher losses are: orange 13.5%, onion 12.5%, tomato 11.31%, potatoes 11.29%, and mango 11.28%. The results are in agreement with the literature that points out that 30 to 40% of the products of the harvest do not reach the consumer due to inadequate practices. All the intervention done and the training had a very positive impact, bringing expertise to employees and opened new horizons for a neater Supply Center with lower scrap rates.

Keywords: supply structures, waste, training

INTRODUCCIÓN

Brasil, país potencialmente agrícola, posee 388 millones de hectáreas de tierras fértiles para la agricultura y casi 13% de toda el agua dulce disponible en el planeta, por lo que viene revelándose como una potencia para la producción y abastecimiento de alimentos en el mundo (MAPA, 2009).

Paralelo al aspecto de producción, se rebela también que las pérdidas en diversos tipos de alimentos ocurren en todas las etapas de la cadena, y que el índice puede alcanzar valores de 30% o más, dependiendo del tipo de producto, principalmente en relación a su perecibilidad, técnicas de cultivo, tipo de embalaje utilizado, medio de transporte y al nicho de mercado en el cual el producto será comercializado. Las pérdidas son más comunes en países en desarrollo, donde son utilizadas técnicas menos sofisticadas, tanto en la producción como en la cosecha, almacenamiento y comercialización. Las pérdidas en la fase de post cosecha para productos con más durabilidad como granos y cereales están alrededor del 5 al 30%, mientras que para productos hortícolas ese número se encuentra entre el 15 y el 100% (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

De acuerdo con Chitarra y Chitarra (2005) las pérdidas post cosecha pueden ser definidas como aquellas que ocurren posteriormente de la cosecha en virtud de la falta de comercialización o de consumo del producto en tiempo hábil; o sea, resultante de daños al producto, ocurridos posterior a su cosecha, acumulada desde el lugar de producción, sumándose a los daños ocurridos durante el transporte, almacenamiento, procesamiento y/o comercialización del producto vendible. Las pérdidas pueden ser clasificadas en

cuantitativas, cualitativas y nutricionales. Pérdidas cualitativas y nutricionales, valor calórico y aceptación por los consumidores, son mucho más difíciles de evaluar que las pérdidas cuantitativas. Las causas primarias de las pérdidas pueden ser fisiológicas, fitopatológicas y por daños mecánicos.

Pérdidas post cosecha de productos agrícolas pueden ocurrir debido a la presencia de daños (mecánicos, patológicos y fisiológicos) en los productos. Estas pérdidas deben ser eliminadas o, por lo menos, minimizadas, para aumentar la oferta de los productos, además de evitar detrimentos de inversiones financieras y de tiempo gastado en su producción (PARISI *et al.* 2012).

En países en desarrollo, más del 40% de las pérdidas de alimentos ocurren en las etapas de post cosecha y procesamiento. En estos países, medidas de control deben ser adoptadas desde la perspectiva del productor, por medio del uso de técnicas post cosecha adecuadas, programas de concientización, mejora de las instalaciones de almacenamiento y cadena de frío. En países industrializados, más del 40% de las pérdidas ocurren en las etapas de comercio minorista y consumidor; siendo de importancia secundaria las orientaciones dadas al productor (FAO, 2011).

Para Martins (2006) la cuantificación de pérdidas post cosechas tiene dos funciones estratégicas: En la primera, la visión del productor, del minorista y del mayorista es tenida como prioridad, pues solo después de esa cuantificación se puede decidir si la adopción de medidas de prevención será viable para su negocio. En la segunda función estratégica, es cuestionada la exagerada preocupación de la comunidad científica para aumentar la productividad de los cultivos, cuando una parte importante de los alimentos producidos se

pierde en la post cosecha. Otro desafío del sector horti-frutícola es mejorar la eficiencia de los agricultores en el proceso de comercialización de su producción (JUNQUEIRA Y LUENGO 2000, VILELA Y MACEDO 2000), cuando se producen grandes pérdidas después de la cosecha. Una parte importante en el proceso de comercialización son los canales de distribución de frutas y verduras, donde todavía dominan los centros de abastecimiento, o CEASAS, pero con una creciente y fuerte participación de los supermercados como instrumentos para hacer llegar al consumidor final frutas y verduras (ACCARINI *et al.* 2000).

La calidad de frutas y verduras se valoran en base a atributos como la apariencia, el sabor, la textura y el valor nutricional, estos parámetros determinan que tipo de técnicas de almacenamiento y manejo post cosecha deben ser utilizados (CHITARRA, 1998). En este contexto, se vuelve crucial para evaluar el efecto de las prácticas de manejo sobre la productividad, la calidad química, física y la longevidad del producto durante el proceso de comercialización. Según Chitarra y Chitarra (2005) los niveles medios de las pérdidas posteriores a la cosecha de hortalizas en Brasil están en 35%, alcanzando hasta un 40%, mientras que en otros países como los Estados Unidos son sólo el 10%. Estas pérdidas serían suficientes para alimentar el 29,3% de la población (53 millones de habitantes).

Del total de frutos desechados, el 50% es encuadrado entre los inadecuados para la comercialización por daños mecánicos (marcas de la caja en la que estaban almacenados durante el transporte hasta el punto de distribución, cortes, magullas o abrasiones). En la mayoría de los casos de pérdidas posteriores a la cosecha, muchas partes podrían ser reutilizadas para la transformación de la materia prima,

añadiendo valor al producto y reduciendo al mínimo los residuos.

El CEASA es el nombre común de los centros de abastecimiento para promover, desarrollar, regular, organizar y dinamizar la comercialización de los productos vegetales al por mayor y al por menor en una región. El CEASA del municipio de Salgueiro -PE (Brasil) abrió sus puertas en julio de 2009 y tiene como objetivo abastecer a la ciudad y la región del municipio en cuestión, a través de asociaciones entre los comerciantes y los agricultores, proporcionando apoyo logístico y la satisfacción de las demandas locales de esta región de Pernambuco.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar y cuantificar las pérdidas posteriores a la cosecha en el CEASA del municipio de Salgueiro y capacitar a los empleados involucrados en el proceso con el fin de minimizar las pérdidas posteriores a la cosecha y los residuos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para posibilitar el trabajo, fue adoptada como metodología el estudio de caso en conjunto con los estudios teóricos acerca del tema. El estudio de caso, de carácter cualitativo y cuantitativo, fue realizado en el centro de abastecimiento de vegetales (CEASA) del municipio de Salgueiro/Pernambuco (Brasil). Fue considerado el método de identificación de pérdidas de alimentos adoptado por Chitarra y Chitarra (2005), en el cual relata las posibles causas, métodos y soluciones para minimizar el desperdicio de alimentos.

Las actividades fueron divididas en 3 etapas principales: 1- Visitación exploratoria; 2- Visitación para cuantificación; 3-

Capacitación de acuerdo con las demandas conocidas y obtenidas a través de este trabajo de investigación.

Visitación exploratoria

Este estudio fue realizado de agosto a noviembre de 2013, en el CEASA (**Figura 1**) con visitas semanales durante el periodo de agosto 2013 a abril 2014, meses considerados más calurosos en la región, donde fueron observados, cuantificados e identificados los vegetales con daños y las respectivas causas de esos daños. La ciudad de Salgueiro - PE está localizada en la región árida de pernambucano donde ocurren temperaturas que varían de 35° a 40°C en los meses más caluroso y que favorecen la multiplicación de los microorganismos y la velocidad de las reacciones bioquímicas que llevan a los productos a la senescencia precoz y consecuentemente a las pérdidas. Estas visitas fueron realizadas para explorar y conocer el local y los responsables por el trabajo en los establecimientos de la red. A partir de la primera visita fueron identificados los días de carga (los miércoles de 13:00 a 17:00 h) y los días de comercialización de frutas y verduras (jueves de 7:00 a 21:00 h), siendo los días de mayor movimiento de clientes en el local.



Figura 1: CEASA en Salgueiro-Pe- Brasil

Visitación para cuantificación

Las visitas consecutivas realizadas en el día que sucedía la comercialización de verduras y frutas, sirvió para identificar y cuantificar el desperdicio. Por otra parte, se trató de mantener el diálogo con los trabajadores encargados de la carga y la función de desechar. Esta interacción favoreció la identificación de las prácticas adoptadas por los involucrados con el manejo de los productos y cómo afrontan la producción de residuos y el reaprovechamiento. Además de los empleados, estaban involucrados también los gerentes, en el proceso para la factibilidad del trabajo y la disminución de los residuos. Las pérdidas fueron identificadas por la observación y posteriormente fue realizado el pesaje de los vegetales semanalmente con la ayuda de una balanza (marca Toledo, modelo 909) y los resultados de las pérdidas fueron expresados mensualmente. Después de la colecta de datos fue

planeada la tercera etapa del proyecto: capacitación para los empleados del local.

Elaboración de la capacitación

Teniendo en cuenta la identificación de las principales pérdidas y debilidades en relación con el manejo inadecuado de las verduras por parte de los empleados, fue posible montar una formación específica para trabajar con el personal y proporcionar salidas para subsanar sus posibles causas. La capacitación se centró en temas relacionados con la problemática en cuestión. También se observó que no había en ningún lugar señales/carteles que pudieran guiar a los empleados sobre la importancia de la higiene en el lugar, los cuidados que son necesarios para reducir al mínimo la pérdida de vegetales. Con los datos levantados, se elaboró un plan para la estructuración de señalización del local y posturas que deberían adoptarse para el fiel cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manipulación. En conjunto con el equipo CEASA fueron realizadas reuniones para debatir sobre el tema y para alcanzar los puntos más críticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados encontrados revelan que las principales causas de las pérdidas ocurren principalmente por lesiones mecánicas durante el proceso de transporte y descarga que es realizado de manera desordenada y por tratarse de productos

muy sensibles y con gran porcentaje de agua libre el problema es maximizado. Pérdidas considerables fueron observadas en productos destinados a mercados locales, como consecuencia del uso de embalajes inapropiados, acondicionamientos y manipulación grosera, vehículos supercargados y carreteras deficientes (CHITARRA Y CHITARRA, 2005). Dentro de las principales causas están: aplastamiento, pudrición, senescencia y marchitamiento. El aplastamiento, entre los datos evaluados, se presentó en mayor número, el cual ocurrió principalmente durante el transporte, pero también fue observado una manipulación inadecuada, apilamiento en exceso y transporte ineficiente.

Los datos obtenidos en este levantamiento fueron mostrados a los empleados durante la capacitación para facilitar el entendimiento del trabajo realizado en el CEASA. Durante la capacitación fueron señaladas pequeñas medidas correctivas que harán grandes cambios en las prácticas de aquellos empleados, que por su parte, también podrán ser diseminadores de este conocimiento. Los resultados están descritos en la **Tabla 1**, con las principales pérdidas teniendo en cuenta que son comercializados 1000 kg de cada vegetal por mes.

Tabla 1: Principales pérdidas post cosecha encontradas el CEASA

PERIODO	VEGETALES	MEDIA POR MES (KG)
Agosto 2013 a abril 2014	Naranja	135,00
Agosto 2013 a abril 2014	Cebolla	125,40
Agosto 2013 a abril 2014	Tomate	113,11
Agosto 2013 a abril 2014	Papa Inglesa	112,83
Agosto 2013 a abril 2014	Mango	112,82

En relación a los productos observados, los que muestran índices de pérdidas fueron: naranja 13,5%, cebolla 12,54%, tomate 11,31%, papa inglesa 11,29% y mango 11,28%. Entre los vegetales citados el tomate muestra mayor fragilidad, pero fue observado que los demás también sufrieron daños mecánicos severos, aunque mostraban una resistencia mayor. Según Chitarra y Chitarra (2005) los niveles medios de pérdidas post cosecha de verduras en Brasil se encuentra en 35%, llegando a alcanzar hasta 40%, mientras que en otros países como los Estados Unidos no pasan de 10%. El factor climático interfiere negativamente en las pérdidas, además de los descuidos que suceden por falta de conocimiento por parte de los empleados. Las pérdidas encontradas son significativas y algunos puntos deben ser sanados a partir de cambios de rutina y de prácticas adecuadas de manipulación. Con los datos contabilizados, fue ofrecida por el equipo del IFSERTÃO-PE, una capacitación de 20 horas para los empleados del CEASA, en el periodo de 20 de abril al 08 de mayo de 2014 para 20 empleados del local. Este curso fue dictado en la sala de reuniones del propio CEASA todos los miércoles con clases teóricas y prácticas. Entre las temáticas abordadas en la capacitación citase: Importancia, función y cuidados básicos con alimentos, Buenas Prácticas de Manipulación, Concepto de higiene ambiental y personal, Importancia de las condiciones higiénico-sanitarias para manipuladores de alimentos, Estadística del hambre en Brasil (IBGE, 2012), Importancia de los cuidados post cosecha en el transporte, Almacenamiento, manipulación y comercialización. Además de los temas citados fue desarrollado un trabajo con los vendedores en el local, a partir de una estrategia de venta denominada "SOBRA VERDE", donde en las dos últimas horas de funcionamiento del CEASA, había una reducción del 50%

en precios de los vegetales con el objeto de beneficiar a las personas más carentes financieramente y garantizar alimento en la mesa de esas personas, con precios atractivos y así también minimizar las pérdidas al final del día. También, fue tenida en consideración, la gran pérdida de humedad que se tiene en la región, principalmente en épocas más calurosas. Los temas abordados se refieren a la gran importancia que esas deficiencias significan para el CEASA, por tratarse de un local que rutinariamente recibe vegetales que son producidos en toda la región árida Pernambucana. Concomitante a la realización de la capacitación fueron confeccionados banners informativos, visando facilitar la interacción de la enseñanza aprendizaje en la práctica de los empleados.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados presentados, fue observado que las prácticas adoptadas por los empleados del CEASA, llevaban a pérdidas post cosecha, principalmente por descuido y falta de conocimiento. Los factores climáticos regionales también interfieren en el proceso, pero la comercialización rápida facilita el flujo de las mercaderías y la rápida comercialización de los vegetales en el local. La señalización (refuerzo ilustrativo) del local posibilitó una mayor interacción entre los empleados y la información obtenida en la capacitación. De acuerdo con toda la problemática, el recurso de la capacitación se muestra como medio viable para mitigar las pérdidas. La capacitación específica y continua es una manera de minimizar todavía más esas pérdidas en el CEASA municipio de Salgueiro-PE, pues se trató de un trabajo realizado con la comunidad local y que podrá ser extendido para otras acciones realizadas posteriormente. Toda intervención realizada, así como, la capacitación, tuvieron repercusión muy positiva, llevando conocimiento técnico a los empleados y abriendo nuevas perspectivas para un ambiente más ordenado y con menores índices de desperdicios.

BIBLIOGRAFÍA

- Accarini JH, Mazocato MA, Costa OGP, Luengo RFA. 2000. Hortícolas – modernização necessária. *Agroanalysis*, Rio de Janeiro, 20 (1): 41 - 46.
- Chitarra MIF, Chitarra AB. 2005. Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio. 2 ed. Lavras: FAEPE. Pag 293.
- Chitarra MIF. 1998. Fisiologia e qualidade de produtos vegetais. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. Poços de Caldas, MG. Anais... Poços de Caldas, MG: Associação Brasileira de Engenharia Agrícola. 1-58.
- FAO. 2011. Global food losses and food waste. *Internacional Congress Save Food*. Rome.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2004. www.ibge.gov.br / Acesso em outubro de 2012 às 16:30h.
- Junqueira AH, Luengo RFA. 2000. Mercados diferenciados de hortaliças. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 18 (2) 95-99.
- Martins MC, Lourenço SA, Gutierrez ASD, Jacomino AP, Amorim L. 2006. Quantificação de danos pós-colheita em pêssegos no mercado atacadista de São Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 31:005-010.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. *Brasil e Agronegócio Brasília – DF*.
- Parisi MCM, Henrique CM, Prati P. 2012. Perdas pós-colheita: um gargalo na produção de alimentos. *Pesquisa & Tecnologia*, 9 (2).
- Vilela NJ, Macedo MMC. 2000. Fluxo de poder no agronegócio: o caso das hortaliças. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 18 (2) 88 - 94.

IMPACTO DE LA INCORPORACIÓN DEL PÉPTIDO BIOACTIVO CASEINOGLICOMACROPÉPTIDO EN YOGUR

Morales R.^{1,2}, Martínez M.J.^{1,3}, Pílosof A.M.R.^{1,3}.

1: Universidad de Buenos Aires, Argentina.

2: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

3: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

rmorales@di.fcen.uba.ar

Resumen: Los productos lácteos, como el yogur, son alimentos naturalmente funcionales y candidatos preferenciales para vehiculizar sustancias bioactivas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posibilidad de incorporar el péptido bioactivo caseinoglicomacropéptido (CMP) en la elaboración de yogur set. En primera instancia se estudió la acidificación de caseinato de sodio (CASNA) usando glucono δ lactona (GDL) hasta alcanzar un pH de 4,6. Se evaluaron distintas relaciones CASNA/CMP, simulando las condiciones de elaboración de yogur. Las interacciones entre CMP y CASNA se estudiaron mediante la determinación del tamaño de partícula. La textura de los geles se evaluó en un texturómetro. En la segunda etapa se estudió el impacto de la incorporación del CMP y CASNA en las propiedades texturales de yogures. Si bien el CMP interacciona con el CASNA, dicha interacción se ve alterada por la presencia de β -lactoglobulina (proteína mayoritaria del suero) y con el tratamiento térmico. No obstante, resultaría factible la adición de CMP al yogur con el plus que implica la incorporación de este péptido bioactivo

en la formulación, pudiendo además, manipular la textura de los yogures cuando el enriquecimiento se realiza con CASNA.

Palabras Claves: caseinoglicomacropéptido, caseinato de sodio, interacciones, gelificación, yogur.

Abstract: Dairy products such as yoghurt are naturally functional foods and preferred candidates for carrying biologically active substances. The aim of this work was to study the possibility of incorporating the bioactive peptide caseinglycomacropéptide (CMP) in yoghurt. First, the acidification of sodium caseinate (CASNA) was studied using glucono δ -lactone (GDL) up to a pH of 4.6. Different ratios CASNA / CMP were evaluated. Interactions between CMP and CASNA were determined the particle size measurements. The texture of the gels was evaluated. In the second stage, the impact of the incorporation of CMP and CASNA on the textural properties of yoghurt was studied. Although CMP interacts with CASNA, this interaction was affected by the presence of β -lactoglobulin (main whey protein) and with heat treatment. Nevertheless, it would be viable to add CMP to the yoghurt formulation with the great benefit related with to its bioactive properties. In addition, it would be possible to control the texture of the yoghurt when CMP and CASNA are added together.

Keywords: caseinglycomacropéptide, sodium caseinate, interactions, gelation, yoghurt.

INTRODUCCIÓN

La relación entre la dieta y la salud es una de las claves para prevenir las enfermedades y promover el bienestar. De hecho, es sobre esta base que se ha producido un importante crecimiento en el mercado de los alimentos funcionales, que son los alimentos que ejercen un efecto positivo en la salud de las personas más allá de su valor nutritivo. Los productos lácteos tienen un importante rol en este mercado, en particular el yogur, que utiliza bacterias ácido lácticas (BAL), muchas de las cuales poseen propiedades probióticas o que producen metabolitos secundarios asociados con efectos beneficiosos para la salud. El yogur es un gel formado por micelas de caseína asociadas que retienen el suero y los glóbulos de grasa. Se obtiene al fermentar la leche utilizando un cultivo mixto de bacterias acidolácticas simbióticas que consta de *Lactobacillus delbrueckii*, subespecie *bulgaricus*, y *Streptococcus salivarius*, subespecie *termophilus*. Como resultado de esta fermentación se produce ácido láctico (proveniente de la lactosa de la leche) y una serie de compuestos que le imparten sabor y aroma característicos.

La producción de leche fluida durante el primer cuatrimestre del año 2013 en Argentina fue de 831.697 miles de litros (MAGyP). Las regiones lecheras en Argentina son lideradas por Córdoba (37%), seguida por Santa Fe (32%) y Buenos Aires (25%). Las restantes provincias productoras aportan en su conjunto el 6% del total nacional (MAGyP 2013). Estas regiones lecheras reciben su denominación según la especialización, quedando conformadas dos grandes cuencas lecheras: la "cuenca de abasto", la cual produce

mayoritariamente leche fresca para consumo, y la "cuenca de la industria" especializada en la elaboración de productos industriales. Los tres productos lácteos más importantes que elaboró la industria lechera en el último año fueron, en orden de importancia, el yogur con el 34,1%, los quesos 32,5% seguido por la leche en polvo 13,6%. Con respecto al yogur, su consumo se ha incrementado notablemente durante los últimos años. En el año 2012 se registró un consumo de 12,3 Kg/habitante por año, aproximadamente dos veces mayor que el registrado para el año 2003, algo que convierte al país en el mayor consumidor de la región.

El yogur es un alimento funcional, ya que posee acciones beneficiosas para el organismo, como contribuir a equilibrar la flora bacteriana intestinal, potenciar las defensas contra infecciones y otras enfermedades. Recientemente, la adición de bacterias probióticas e ingredientes prebióticos han contribuido a aumentar su categorización como alimento saludable, haciendo a este producto uno de los principales representantes de las categorías de alimentos funcionales. Debido a su natural funcionalidad es un candidato preferencial para vehicular sustancias bioactivas. Varios estudios le han conferido efectos probióticos a productos fermentados mediante la incorporación de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* (ATCC® 4356™), *L. casei* (ATCC® 393™) y *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC® BAA52™). Lo importante a destacar de estos es que, al contrario de las especies de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, son habitantes naturales del intestino y promueven la absorción de nutrientes y secretan compuestos, entre ellos, antimicrobianos que promueven la inhibición de bacterias causantes de infecciones. También es reconocido como alimento saludable dado su alto contenido de proteínas y una

mayor biodisponibilidad de calcio que en la leche, ya que el pH ácido ioniza el calcio facilitando su absorción en el intestino y reduciendo el efecto inhibitorio del ácido fólico dietario sobre el calcio .

La incorporación de un péptido bioactivo como el caseinoglicomacropéptido (CMP), sería una buena estrategia para ampliar la funcionalidad a este alimento. El CMP es un péptido que se obtiene a partir de la ruptura enzimática de la κ -caseína durante la elaboración del queso. Ha tenido un creciente interés en los últimos años debido a sus numerosas propiedades bioactivas, entre ellas se puede resaltar la habilidad del CMP para modular las respuestas del sistema inmune, promover el crecimiento de bifidobacterias, suprimir las secreciones gástricas, inhibir la unión de las toxinas del cólera a los oligosacáridos receptores en las paredes celulares y proteger a las células de la infección por el virus influenza . Otra particularidad del CMP es que tiene poca cantidad de aminoácido metionina, lo que lo hace un ingrediente útil para pacientes con problemas hepáticos. Además, el hecho de que el CMP no tiene fenilalanina en su composición aminoacídica, lo hace adecuado para la nutrición para pacientes con fenilcetonuria. Su alto contenido de ácido siálico también otorga bioactividad, ya que éste contribuye al funcionamiento de las membranas celulares y los receptores de membrana y al normal desarrollo del cerebro. Debido a su carga negativa el CMP puede quelar minerales, aumentando su biodisponibilidad (Traving y Schauer 1998). Kelleher et al. (2003) informaron sobre la capacidad de unión del CMP al zinc, encontrando que monos alimentados con una fórmula infantil suplementada con CMP aumentaron la absorción de zinc. Todas estas actividades biológicas demuestran que el CMP posee una amplia gama de posibilidades para su

utilización en diversos tipos de alimentos, reduciendo el riesgo de enfermedades crónicas y brindando protección al organismo de posibles infecciones. Sin embargo, para poder ser aplicado es muy importante conocer las propiedades funcionales de este péptido ya que su incorporación no debería afectar las propiedades de gelificación del yogur. En los últimos años se ha estudiado la interacción entre CMP con otros ingredientes a fin de utilizarlo en la elaboración de alimentos funcionales , por ejemplo su interacción con proteínas de suero de leche , gelatina y polisacáridos , y el impacto de estas interacciones en propiedades interfacial, gelificantes y espumantes.

El objetivo de este trabajo fue en primer lugar estudiar el efecto de la incorporación de CMP en la gelificación ácida de sistemas modelos de CASNA mediante la evaluación de las interacciones y el análisis textural de los geles obtenidos. Luego, evaluar el impacto de la incorporación del CMP en las propiedades texturales de yogures set.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El caseinoglicomacropéptido (CMP), BioPURE-GMP[®] fue provisto por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA). Su composición en base seca fue: proteína 79,0% siendo el CMP 86,3% del total de proteínas, grasas 0,6%, cenizas 6,3% y humedad 6,4%. El grado de glicosilación es alrededor del 50%. El valor de pH del CMP luego de su disolución en agua Milli-Q fue de 6,7. El caseinato de sodio (CASNA) en polvo, fue provisto por Fonterra (Nueva Zelanda), cuya composición en base seca fue: proteínas 96,2%, cenizas

3,6% y humedad 4,6%. El valor de pH del CASNA luego de su disolución en agua Milli-Q fue de 6,8. Para el estudio a nivel molecular se trabajó con concentraciones finales de CASNA y CASNA/CMP de 1%. En el estudio de gelificación la concentración de CASNA varió entre 6-12%. Los sistemas mixtos CASNA/CMP se prepararon mezclando el volumen apropiado de cada solución de proteína para alcanzar la concentración final requerida. Se estudiaron las mezclas de CASNA/CMP en las siguientes relaciones: 1/1 y 3/1.

Gelificación ácida mediante la adición de GDL

La GDL en polvo se añadió (previa dilución en agua Milli-Q) a los respectivos sistemas, con agitación por 5 minutos a una temperatura de 10 °C. Posterior a su disolución la acidificación tuvo lugar a una temperatura de 43 °C, con el objetivo de simular las condiciones de fermentación durante la elaboración de yogur ya que dicha temperatura es la óptima de crecimiento de las bacterias ácido lácticas. La cantidad de GDL adicionada, determinada en ensayos previos sobre cada uno de los sistemas, fue suficiente para inducir una disminución del pH a 4,6 (con el objetivo de simular el punto final de la elaboración de yogur) en un tiempo de 1-1,3 h.

Determinación de tamaño de partícula

Las mediciones de tamaño de partícula fueron realizadas en un equipo de dispersión dinámica de luz (DLS) láser, Zetasizer Nano-Zs de Malvern Instruments (Malvern, Inglaterra) provisto de un láser He-Ne (633 nm) y un correlator digital, modelo ZEN3600. Las mediciones fueron realizadas a un ángulo de dispersión de 173°. El rango de medición del equipo es 0,6 –

6000 nm. En este equipo se obtuvieron las distribuciones de tamaño de partículas de CMP, CASNA y la mezcla CASNA/CMP a 43 °C sin acidificar y también durante la acidificación en presencia de GDL. Se utilizan dos tipos de análisis para obtener la información de tamaño de partícula, el algoritmo de Cumulantes y el de Contin. El primero proporciona un valor de diámetro hidrodinámico (d(H)) promedio de todas las partículas, mientras que el segundo analiza la distribución de tamaño mostrando todas las poblaciones presentes. Es útil citar el valor del d(H) promedio con fines comparativos, pero claramente insuficiente para dar una descripción completa de los resultados de un sistema polidisperso. El ensayo se realizó por duplicado en dos muestras individuales.

Elaboración de yogures

Se elaboraron yogures set a partir de leche en polvo descremada (LD) (Sancor), reconstituida al 9% de sólidos no grasos totales (SNG). Se aumentó el contenido de SNG hasta un 12 % en base a distintos ingredientes lácteos, según se indica en la Tabla 1. A cada una de las formulaciones se le adiciono un 10% de azúcar.

Las diferentes formulaciones se prepararon disolviendo todos los sólidos en agua a 50 °C. Posteriormente se elevó la temperatura hasta 80 °C y se mantuvo durante 20 min, con el objetivo de lograr la pasteurización. Luego, fueron rápidamente enfriadas a 43 °C e inoculadas con el starter (Fargo™ 404, mezcla de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) previamente activado. Inmediatamente, se realizó un fraccionamiento de cada una de las formulaciones en envases individuales. La fermentación se detuvo cuando se alcanzó un pH de 4,6. Los yogures se

enfriaron rápidamente en un baño de hielo y fueron almacenados a 5 °C para su posterior análisis.

Tabla 1: Porcentaje de sólidos lácteos adicionales (3%) para cada formulación.

FORMULACIÓN	LD (%)	CMP (%)
1	3	-
2	2,25	0,75
3	1,5	1,5

FORMULACIÓN	CASNA (%)	CMP (%)
4	3	-
5	2,25	0,75
6	1,5	1,5

Propiedades texturales

Los geles de CASNA y de las mezclas CASNA/CMP se prepararon acidificando las soluciones con GDL a una temperatura de 43 °C y fueron evaluados mediante un análisis de perfil de textura (TPA) a 25 °C por medio de un texturómetro Microsystems TA-XT2i usando una sonda cilíndrica (P/36R 36 mm de diámetro). Los geles de forma cilíndrica fueron desmoldados de los tubos (13 mm de diámetro x 11 mm de altura) y se comprimieron a un 30% de la altura inicial a una velocidad de compresión de 0,5 mm / s. Para el análisis de los yogures se realizó un test Back Extrusión (BE) en el mismo equipo, utilizando una celda Back Extrusión

con anillo de 35 mm. La distancia de penetración fue de 30 mm. Todos estos ensayos fueron realizados por duplicado, 24 horas después de su elaboración.

Análisis estadístico

Para la comparación de medias de los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Interacción entre CASNA y CMP a nivel molecular

La **Figura 1A** muestra la distribución de tamaño de partícula por intensidad para la solución de CASNA y CMP al 1% p/p y las mezclas de ambos a una concentración final de 1% p/p, a pH natural (6,8) y temperatura de 43 °C. Se observa que el CMP presentó un pico con un valor máximo de alrededor de 2,4 nm de diámetro que coincide con el diámetro reportado para el monómero de dicho péptido y otro pico a valores mayores de 10 nm, el cual es despreciable cuantitativamente ya que no se observa en la distribución en volumen (**Figura 1B**). Para la solución de CASNA se observó un comportamiento monomodal en la distribución en intensidad, con una población entre 100 nm y 1000 nm, con un valor máximo de pico de 250 nm, lo que sugiere que la mayoría de la proteína se encuentra asociada formando grandes partículas. Esta población también fue encontrada por otros autores como la población mayoritaria en soluciones de caseinato de sodio. Por último para las mezclas se observó un comportamiento bimodal aunque con diferente

predominancia de tamaños. Para la mezcla CASNA/CMP 3/1 se observó un pico de menor tamaño con valores máximos de alrededor de 50 nm y otro en tamaños mayores (con un valor máximo cercano a 250 nm) que predomina en la distribución en volumen, mostrando un comportamiento más semejante a la distribución del CASNA puro aunque la población de menor tamaño fue más importante en cantidad en el caso de la mezcla. Mientras que para la mezcla CASNA/CMP 1/1 se observó un pico de menor tamaño (cuyo valor máximo fue 22 nm) y otro en tamaños mayores (con un valor máximo de 250 nm), siendo el predominante el de menor tamaño como se deduce de la distribución en volumen (**Figura 1B**). Dicha población presenta tamaños de partícula intermedios entre las dos proteínas, indicando que la presencia de CMP indujo cambios en el estado de agregación del CASNA, en particular inhibiendo parcialmente su agregación.

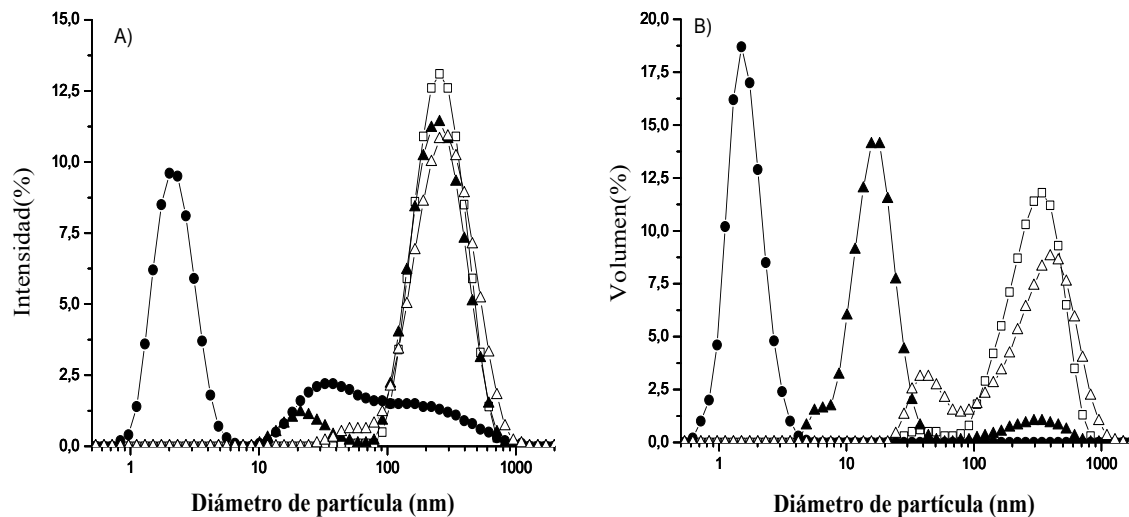


Figura 1: Distribución de tamaño de partícula por intensidad (A) y volumen (B) de CMP (●), CASNA (□), CASNA/CMP (3/1) (▲), CASNA/CMP (1/1) (■). Temperatura 43°C.

En la **Figura 2** se muestra el efecto de la disminución del pH sobre el $d(H)$ promedio de las partículas de cada una de las muestras a 43 °C.

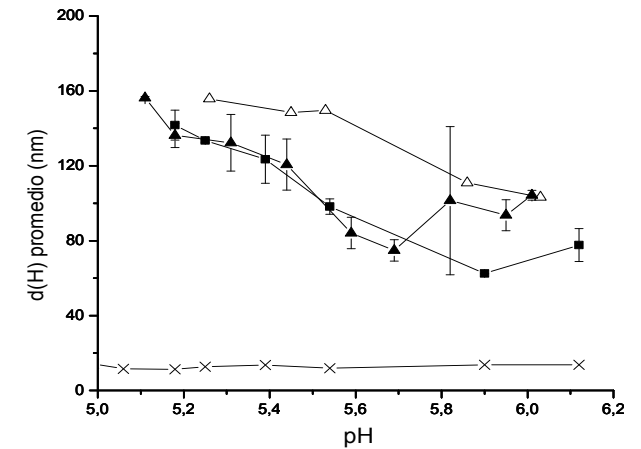


Figura 2: Cambio del $d(H)$ promedio en función del pH para soluciones de CMP (×), CASNA (Δ), CASNA/CMP (3/1) (▲), CASNA/CMP (1/1) (■). Temperatura 43 °C.

La disminución del pH originada por la hidrólisis de la GDL provocó un aumento en el $d(H)$ promedio de las muestras de CASNA debido a la disminución de la carga de la proteína a medida que se

acerca al pI (4,6), sin embargo no indujo cambios en el $d(H)$ de CMP solo, como se ha reportado previamente. En presencia de CMP se observa un menor aumento en el tamaño de las partículas de CASNA a $pHs > pI$. Adicionalmente, se estudió el efecto de la temperatura sobre la distribución de tamaños para estas mismas muestras (realizando un calentamiento hasta $43\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 minutos y enfriando hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$), pero no se observaron cambios (resultados no mostrados). Esto confirma que sería el efecto del pH , y no de la temperatura, lo que provocaría cambios en el tamaño de partícula de CASNA. Estos resultados indican que el CMP interacciona con el CASNA inhibiendo parcialmente su asociación a $pHs > pI$.

Efecto de incorporación de CMP sobre la textura de los geles de CASNA

La **Figura 3** muestra la fuerza de los geles (12% proteína total) obtenidos por acidificación con GDL. El gel CASNA/CMP 3/1 presentó valores significativamente superiores de fuerza comparado al gel de CASNA puro. Mientras que el gel CASNA/CMP 1/1 presentó valores de fuerza similares al CASNA puro. Esto evidencia que el agregado de bajas concentraciones de CMP fortalece significativamente el gel de CASNA.

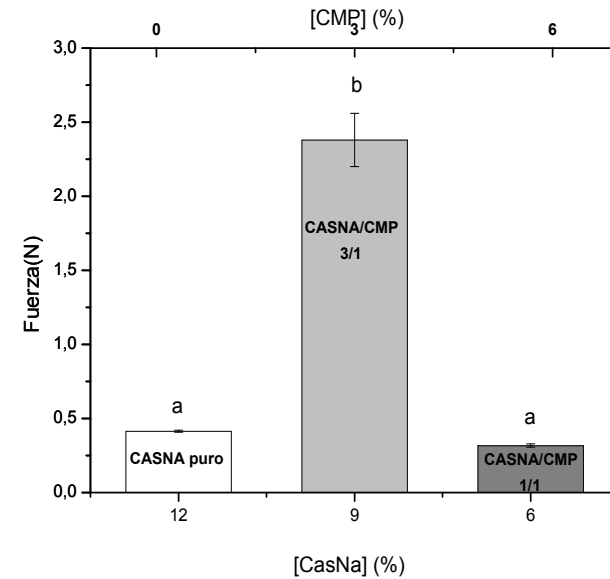


Figura 3: Parámetro fuerza obtenido del análisis de perfil de textura para geles de CASNA 12% y mezclas (12% proteína total) CASNA/CMP 3/1 y 1/1.

Además de presentar los mejores resultados en términos de fuerza, el gel CASNA/CMP 3/1 mostró también la estructura más homogénea visualmente, como se puede observar en las fotos de la **Figura 4**.



Figura 4: Fotografías de los geles obtenidos, por acidificación con GDL, de solución de CASNA (% p/p): (a) 12 y para las mezclas (12% proteína total) CASNA/CMP: (b) 3/1; (c) 1/1.

En el yogur, el sistema es más complejo ya que existen además de las caseínas, otras proteínas, como las del suero. Dichas proteínas podrían interactuar con el CMP modificando su interacción con las caseínas. De hecho, en un estudio previo se observó que la interacción entre CMP y β -lactoglobulina (proteína mayoritaria del suero) modifica las propiedades funcionales (gelificación, interfaciales, espumado). Adicionalmente en la elaboración del yogur, la leche se somete a un tratamiento térmico previo, con el objetivo de realizar la pasteurización y dicho calentamiento también podría afectar la interacción entre el CMP y las caseínas. Con el objetivo de evaluar dichos efectos se realizó una gelificación ácida con GDL, de soluciones de CASNA y CASNA/CMP en presencia de β -lactoglobulina (β -lac) y sometiendo los sistemas a un tratamiento térmico (20 min, 80 °C) previo a la acidificación. En base al estudio previo de gelificación de CASNA con el agregado de CMP en diferentes relaciones, se decidió estudiar la relación 3/1 ya que fue la

que presentó mejores resultados sobre la fuerza y apariencia del gel.

A partir de este estudio, se pudo observar que tanto la presencia de β -lac (**Figura 5 a**) como el tratamiento térmico (**Figura 5b**), produjo una reducción en la fuerza del gel CASNA/CMP 3/1 pero no modificó la fuerza del gel de CASNA. Por último, al comparar el CASNA y CASNA/CMP 3/1 con los dos efectos combinados (presencia de β -lac + tratamiento térmico), condiciones similares a los que se encuentra sometido la leche en la elaboración de yogur, se puede observar que al sustituir parte de CASNA por CMP disminuye significativamente la fuerza de gel (**Figura 5, c**).

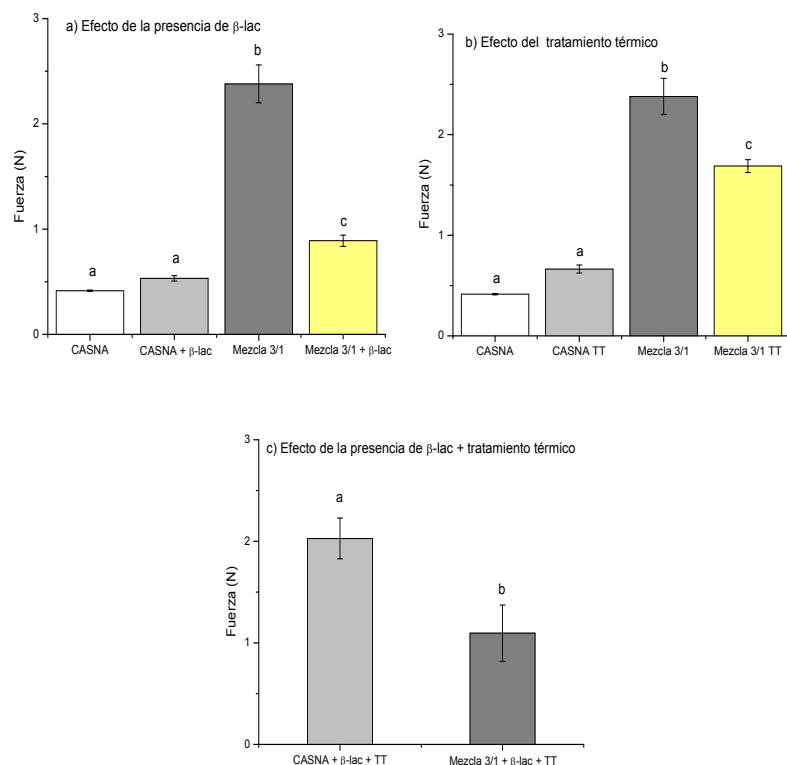


Figura 5: Parámetro fuerza obtenido del análisis de perfil de textura para geles de CASNA y mezclas CASNA/CMP 3/1. a) efecto de la presencia de β -lac, b) efecto del tratamiento térmico, c) efecto combinado de la presencia de β -lac + tratamiento térmico.

Efecto de la incorporación de CMP y CASNA en la textura de yogures

En la **Figura 6** y la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos por el análisis de Back Extrusión (BE) de las

diferentes formulaciones de yogures. La incorporación de CMP en la formulaciones 2 y 3 cuyo enriquecimiento fue en base a leche descremada, no produjo diferencias significativas en la fuerza con respecto al yogur control (formulación 1). Esto sería beneficioso ya que la presencia de CMP en el yogur no afectaría sus propiedades texturales.

Por otra parte, cuando la incorporación del CMP se realizó en presencia de CASNA (formulaciones 5 y 6) la fuerza del yogur fue significativamente inferior respecto a su control enriquecido sólo con CASNA (formulación 4). Estos resultados guardan relación con los obtenidos en el análisis de textura de los geles en los sistemas modelos, donde se observó una disminución en la fuerza de los geles al sustituir CASNA por CMP (**Figura 5c**). No obstante, la formulaciones 5 y 6 presentaron valores de fuerza significativamente superiores al yogur control enriquecido con LD (formulación 1).

Tabla 2: Fuerza (N) de las diferentes formulaciones de yogures, obtenidas por BE.

	FORMULACIÓN	FUERZA (N)
LD	1	2,51 ± 0,41 ^a
	2	2,28 ± 0,25 ^a
	3	2,18 ± 0,22 ^a
CASNA	4	7,54 ± 0,50 ^b
	5	5,70 ± 0,12 ^c
	6	3,90 ± 0,06 ^d

Letras diferentes indican diferencias significativas a $P < 0,05$.

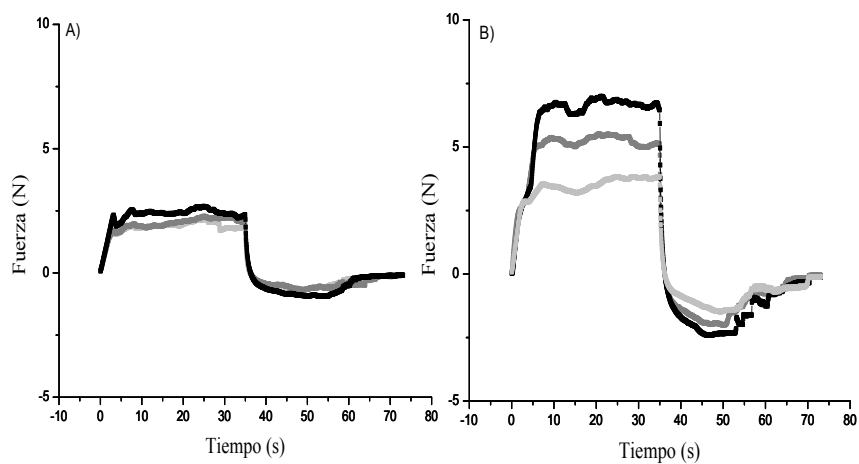


Figura 6: Caracterización textural de las diferentes formulaciones de yogures A) enriquecidos con LD: 1 (■), 2 (■), 3(■); B) enriquecidos con CASNA: 4 (■), 5 (■), 6 (■).

CONCLUSIONES

Hoy en día, los consumidores buscan alimentos que satisfagan un sinnúmero de necesidades: quieren conveniencia, beneficios para la salud y un alto contenido nutritivo, todo a un precio conveniente. El yogur ofrece todo esto y más, con opciones para un gran panorama de consumidores (que van desde los más pequeños hasta los adultos mayores).

Siendo el CMP un derivado del suero de queso, subproducto tan abundante en la industria quesera, resulta de gran importancia la posibilidad de incorporarlo a un producto de consumo masivo en nuestro país como es el yogur.

Si bien el CMP interacciona con el CASNA, dicha interacción se ve alterada por la presencia de β -lactoglobulina (proteína mayoritaria del suero) y con el tratamiento térmico, condiciones presentes en la elaboración de yogur. No obstante, se puede concluir que resultaría factible la adición de CMP al yogur con el plus que implica la incorporación de este péptido bioactivo en la formulación. Por otro lado, se podría manipular la textura de los yogures, ya que si el enriquecimiento de los SNG se realiza con LD, el agregado de CMP hasta un 1,5%, no modifica la textura, mientras que si el enriquecimiento se realiza con CMP + CASNA se produce un aumento en la fuerza del yogur.

Por todo esto, los resultados de este trabajo permiten diseñar un yogur con propiedades bioactivas adicionales por la presencia de CMP, con un gran potencial de ser transferido a escala industrial.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado con fondos de la Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

EFFECTO DE LAS VARIABLES DE PROCESO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE LA FIBRA DIETARIA DE PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L.)

Nieto Calvache J.E.^{1,2}, de Escalada Pla M.^{1,2}, Gerschenson L.N.^{1,2}

1: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Industrias, Argentina

2: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina
lia@di.fcen.uba.ar

Resumen: La papaya es el fruto de la planta tropical *Carica papaya* L. cultivada principalmente en la región centroamericana y perteneciente a la familia de las Caricáceas. En Argentina, la región productiva se localiza en las provincias de Misiones, Corrientes, Formosa, Jujuy y Salta. Residuos provenientes de la industrialización de frutihortícolas resultan insumos apropiados para la obtención de fracciones enriquecidas en polisacáridos de pared celular los cuales constituyen la fibra dietaria (FD). En este estudio, se evaluó el efecto de los factores de procesamiento, temperatura y tiempo de extracción, relación etanol/muestra y temperatura de secado, sobre las propiedades de hidratación, de absorción de aceite (OHC) y el volumen específico de la FD obtenida. Se encontró que el aumento de la temperatura de secado tiene un efecto negativo sobre las propiedades de hidratación mientras que el incremento de la relación etanol/muestra presenta un efecto positivo sobre la capacidad de retención de agua (WHC), OHC y el volumen específico. Finalmente, el

WHC es afectado, además, negativamente por el aumento del tiempo de extracción y el volumen específico, por el incremento de la temperatura de extracción. El efecto multivariable observado y la influencia de interacciones complejas en algunas propiedades, pone de manifiesto la necesidad de completar el diseño para tener una visión más amplia del efecto de las variables de proceso sobre las propiedades estudiadas.

Palabras clave: Fibra dietaria, propiedades de hidratación, microondas

Abstract: Papaya is the fruit of a tropical plant *Carica papaya* L. grown primarily in the region of Central America and belongs to the botanic family Caricaceae. In Argentina, papaya-producing regions are located in the provinces of Misiones, Corrientes, Formosa, Jujuy and Salta. The waste from the industrialization of fruits and vegetables is a suitable input for obtaining fractions enriched in cell wall polysaccharides, which constitute the dietary fibre. In this study, it was evaluated the effect of the processing factors, temperature and time of extraction, ethanol / sample ratio and drying temperature, on the properties of hydration, oil absorption (OHC) and specific volume of the fibre obtained. It was found that the increase in drying temperature has a negative effect on the properties of hydration while a positive effect on water holding capacity (WHC), OHC and specific volume is shown by the increase of ethanol / sample ratio. Finally, the WHC is negatively affected by higher extraction times and specific volume, by the increase in extraction temperature.

Keywords: Dietary fibre, Hydration properties, microwave

INTRODUCCIÓN

La papaya, es el fruto de la planta tropical *Carica papaya* L. y es considerado el fruto comestible más importante de la familia de las caricáceas (Wurochekke *et al.* 2013). Es un fruto rico en antioxidantes, azúcares, minerales como el calcio, magnesio, fósforo y sodio y vitaminas como la A, B, C y D, siendo atractivo para el procesamiento (Pérez-Cotapos 2006). La papaya o mamón es un fruto obtenido principalmente en regiones tropicales y subtropicales y luego comercializado en diferentes partes del mundo (Rivera *et al.* 2010). A nivel mundial, se producen 11,6 millones de toneladas anuales, en alrededor de 406.190 hectáreas, localizándose un 48,8% en Asia (especialmente India), un 39,2% en América Latina y Central (en especial, Brasil) y un 11,6% en África (Molina *et al.* 2014). En Argentina, la producción a escala comercial se concentra en algunas zonas del norte (Salta, Formosa y Misiones) y en algunas pequeñas plantaciones hogareñas como en la provincia de Santa Fe (Kist y Manica 1995). La producción promedio en Argentina es de 10.800 toneladas y en los últimos años se han importado 200 toneladas anuales principalmente de Brasil con lo cual se obtiene una oferta total de 11.000 toneladas anuales. Se destina gran parte de esta cantidad a la industria y una menor cantidad, al comercio local (Molina *et al.* 2014).

En el proceso de transformación de alimentos vegetales se generan cantidades importantes de subproductos los cuales pueden representar un problema de disposición final. Por otra parte, frutos que no alcanzan las características requeridas tanto para la industria como para el comercio, generalmente

se disponen como residuos. Estos residuos están compuestos por polisacáridos, proteínas y lípidos y su transformación a productos de valor agregado, permitiría recuperar valiosa biomasa y nutrientes (Laufenberg *et al.* 2003).

Dentro del procesamiento y/o estabilización de alimentos y subproductos, el secado es uno de los procesos que consume más tiempo y energía en la industria. Es por ello que los nuevos desarrollos en investigación están dirigidos a disminuir tanto el tiempo de secado como el consumo de energía, manteniendo la calidad del producto final. Algunos métodos de secado en estudio incluyen técnicas mixtas como, por ejemplo, el uso combinado de secado por microondas y de secado solar, para reducir el tiempo de proceso (Secmeler 2003).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de distintas variables del proceso de obtención, en las propiedades de fracciones ricas en fibra dietaria obtenidas de pulpa de papaya. Las variables estudiadas fueron: tiempo (t), temperatura (T) y relación etanol/muestra (E/M) para la etapa de extracción y la temperatura de secado (Ts) de las fracciones extraídas. Se analizó su efecto sobre la capacidad de retención de agua (WHC), capacidad de hinchamiento (SC), porcentaje de agua retenida (RW), capacidad de absorción de aceite (OHC) y volumen específico de las fracciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de fracciones enriquecidas en fibra dietaria

Las fracciones enriquecidas en fibra dietaria, se obtuvieron mediante el tratamiento de pulpa de papaya, cultivada en la provincia de Formosa (Argentina) y comprada en un mercado

local de la ciudad de Buenos Aires. Se separó la cáscara y las semillas de la pulpa y, seguidamente, se realizó la extracción de los polisacáridos de la pared celular por medio de la exposición de la pulpa a diferentes relaciones etanol/muestra y tiempos y temperaturas de extracción, según el diseño experimental descrito en la Tabla 1. Se utilizó un homogeneizador mecánico (Omni Mixer, USA) durante el tratamiento extractivo. Una etapa posterior de filtrado fue necesaria para eliminar el etanol. El residuo obtenido fue colocado en bandejas plásticas de polipropileno de 150 cm² con una altura de lecho de 2 cm.

Las fracciones enriquecidas en fibra, se sometieron a deshidratación utilizando un equipo de microondas Ethos Plus (Milestone, Italia), trabajando a potencia máxima de 450 W y a diferentes temperaturas de muestra según el diseño experimental (Tabla 1).

Se utilizó un programa de tratamiento basado en una rampa de 1 min para alcanzar la temperatura deseada, seguida de calentamiento a temperatura constante. Se programó el equipo para hacer intervalos de secado de 2 minutos y medio, más un minuto de ventilación, registrándose así periódicamente, la pérdida de peso, hasta obtener peso constante. Se consideró alcanzada la constancia, cuando la diferencia de peso en el último intervalo fue menor del 10%. Se hizo, adicionalmente, un control de la actividad acuosa (a_w) con el objetivo de asegurar que las muestras alcanzasen valores finales de a_w menores de 0,6, de tal manera de asegurar la estabilidad microbiológica de las mismas (Muggeridge and Clay, 2001).

Las fracciones obtenidas fueron molidas en un molino de cuchillas de uso doméstico (Braun, Argentina); posteriormente las mismas se tamizaron con una malla ASTM 40 con apertura

de poro de 420 micrones. Las muestras de cada sistema, menores a este tamaño, se envasaron al vacío en bolsas Cryovac™ (Sealed Air Corporation; copolímero de cloruro de polivinilo y cloruro de polivinilideno) y se almacenaron en freezer (-18 °C) hasta su caracterización.

Evaluaciones preliminares de la composición química, mostraron que las fracciones aisladas se encontraban constituidas por lo menos por 50% de hidratos de carbono (celulósicos y no celulósicos) y 4 % de proteína, correspondiendo entonces a fracciones enriquecidas en polisacáridos de pared celular. La metodología para determinar el contenido de proteínas y de carbohidratos se encuentra descrita en de Escalada Pla *et al.* (2010)

Las fracciones se caracterizaron según las técnicas descritas a continuación. Todas las determinaciones de las propiedades estudiadas se realizaron por triplicado.

Propiedades de hidratación y de absorción de aceite

Existe una terminología unificada a nivel internacional para citar las propiedades de hidratación y de absorción de aceite, que se basa en la expresión de sus nombres en inglés y son dichas siglas las que se utilizan en este trabajo.

Capacidad de hinchamiento (Swelling capacity, SC)

Una cantidad de muestra seca de cada sistema con peso $\approx 0,1000$ g, se colocó en una probeta graduada. Se agregaron 5 ml de agua y se dejó hidratar durante 18 horas a una temperatura constante de 25°C. Al cabo de este tiempo, se midió el volumen total alcanzado por la fibra hidratada (Rhagavendra *et al.* 2004). El SC, se calculó según la siguiente expresión:

$$S = \frac{V_h}{m_s} \quad (1)$$

Donde V_h es el volumen ocupado por la muestra hidratada y m_s es el peso de la muestra seca.

Capacidad de retención de agua (Water holding capacity, WHC)

Una muestra seca de cada sistema de peso $\approx 0,1000$ g, se colocó en un tubo de vidrio con marcación volumétrica y de fondo cónico. Se agregaron 5 ml de agua y se dejó hidratar durante 18 horas a una temperatura constante de 25°C. Se dejó decantar, se separó el sobrenadante y la muestra fue transferida a un filtro de vidrio fritado (G4 IVA), previamente pesado, dejándola escurrir a presión atmosférica. Se registró el peso del residuo hidratado y se liofilizó para obtener, finalmente, el peso del residuo seco.

$$WHC (g/g) = \frac{m_h - m_s}{m_s} \quad (2)$$

Donde: m_h es el peso del residuo hidratado y m_s es el peso del residuo seco

Porcentaje de agua retenida (Retained water, RW)

Para esta determinación, se pesaron $\approx 0,065$ g de muestra de fibra en un tubo eppendorf. Se hidrató con 2 ml de agua deionizada a 25°C durante 18 horas. Luego se centrifugó durante 30 min a 4800 rpm. Se separó el sobrenadante. Se pesó el residuo hidratado (R+W) y se sometió a liofilización.

Luego, se pesó el pellet seco (R). Se calculó el RW porcentual como:

$$RW (\%) = \frac{W}{At} \quad (3)$$

Donde RW es el porcentaje de agua retenida, W son los gramos de agua retenida por el pellet y At es el agua total agregada.

Capacidad de absorción de aceite (Oil holding capacity, OHC)

La capacidad de absorción de aceite se evaluó mezclando en un tubo eppendorf, una muestra de $\approx 0,2000$ g de peso con 1 ml de aceite de girasol. Se mantuvo el contacto durante 18 horas a 25°C. Se centrifugó 5 minutos a 3600 rpm. Se descartó el sobrenadante y se pesó el pellet.

La capacidad de absorción de aceite se calculó como los gramos de aceite retenido por gramo de muestra.

Volumen específico

Para esta determinación se utilizaron probetas graduadas de 5 ml de capacidad. Las mismas se llenaron con una cantidad de muestra exactamente pesada y se midió el volumen ocupado en la probeta luego de impactar el fondo de la misma contra la mesada hasta obtener constancia del nivel de polvo. Este parámetro se calculó como:

$$\rho (g/cm^3) = \frac{m}{V} \quad (4)$$

Donde ρ representa la densidad, m representa los gramos de muestra y V representa el volumen ocupado por dicha muestra.

El volumen específico se determinó como la función inversa de la densidad:

$$V (cm^3/g) = \frac{1}{\rho} \quad (5)$$

Diseño experimental y tratamiento estadístico

El estudio se realizó de acuerdo a un diseño ortogonal incompleto que considera los efectos de cuatro factores (tiempo de extracción, temperatura de extracción, relación etanol/muestra y temperatura de secado), con dos niveles por factor (Tabla 1). Se incorporaron puntos centrales que se llevaron a cabo por cuadruplicado, adicionando así otro nivel a cada factor. Se estableció como aceptable un ajuste con un R^2 mayor de 70%. Se analizó la influencia de los cuatro factores mediante diagramas de Pareto estandarizado, para verificar la significancia de los mismos sobre cada una de las respuestas estudiadas.

El diseño experimental y su correspondiente análisis estadístico así como todo el tratamiento estadístico de datos,

se llevaron a cabo utilizando el programa STATGRAPHICS Centurion XV (V. 15.2.06, 2007).

Tabla 1. Diseño experimental utilizado.

Sistema	Tiempo de extracción (min)	Temperatura de extracción (°C)	Relación etanol/muestra (ml/g)	Temperatura de secado (°C)
1	45	80	5/1	30
2	45	80	2/1	70
3	45	20	5/1	70
4	45	20	2/1	30
5	15	80	5/1	70
6	15	80	2/1	30
7	15	20	5/1	30
8	15	20	2/1	70
0	30	50	3,5/1	50
0	30	50	3,5/1	50
0	30	50	3,5/1	50
0	30	50	3,5/1	50

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de hinchamiento (SC) es el volumen ocupado por una muestra de fibra de peso conocido después de ser hidratada con agua durante un tiempo determinado. En la Figura 1 se observa el diagrama de Pareto estandarizado para SC. El diagrama de Pareto estandarizado, se obtuvo dividiendo cada efecto por su error estándar y transformándolo así en un

estadístico-t. La única variable de proceso que influye significativamente es la temperatura de secado, la cual tiene un efecto negativo, es decir que SC disminuye con el aumento de temperatura (nivel de significancia de 0,05). El R^2 de ajuste del modelo para SC fue 76,24 indicando que el modelo explica un 76,24% de la variabilidad de SC. Esta propiedad resulta de importancia para evaluar la utilidad de las fibras como agente de relleno o hinchamiento en los alimentos de alta actividad de agua así como en la evaluación de los efectos en la dieta ya que influirá en la funcionalidad de la fibra durante el tránsito intestinal (Gómez *et al.* 2010).

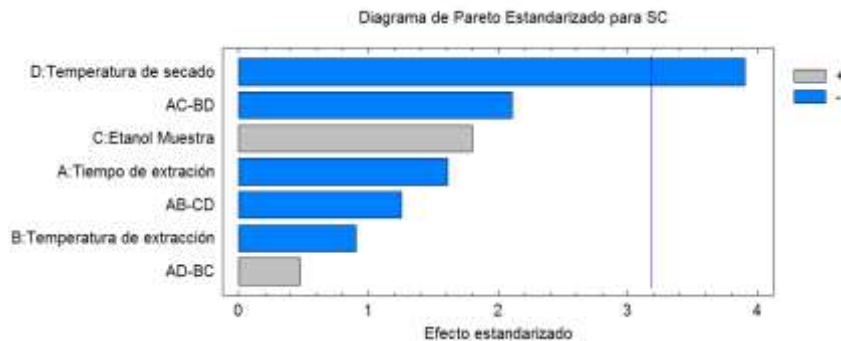


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizado para SC. Nivel de significancia 0,05.

La capacidad de retención de agua (WHC) se define como el agua sorbida por la muestra sin la aplicación de fuerzas externas, excepto la gravedad y la presión atmosférica (Rahgavendra *et al.* 2004). En la Figura 2, el diagrama de Pareto muestra que la temperatura de secado, el tiempo de extracción y la interacción de los cuatro factores AC-BD, tienen un efecto negativo sobre WHC, mientras que la relación etanol/muestra tiene un efecto positivo. El R^2 para esta

propiedad fue de 93,54 (Tabla 2), lo que indica que el modelo explica un 93,54% de la variabilidad de WHC. Esta propiedad toma en cuenta el agua fuertemente y débilmente asociada a la matriz y, por lo tanto, se encuentra relacionada con el aumento del peso de las heces ya que se ha informado que el agua fuertemente unida no tiene ningún efecto sobre la masa de las deposiciones, mientras que el agua levemente asociada incrementa rápidamente el peso de las mismas (Cadden, 1987)

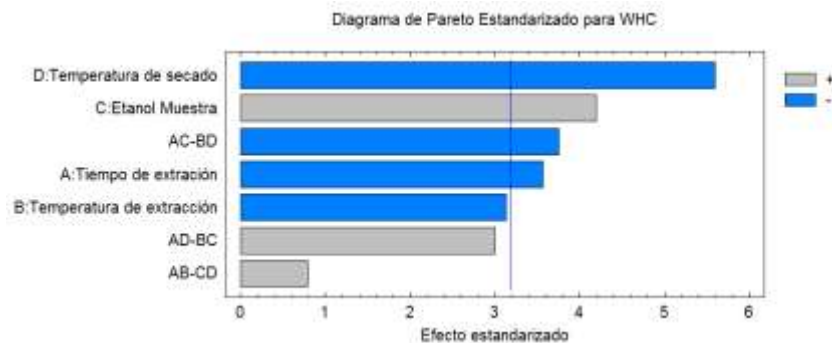


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para WHC. Nivel de significancia 0,05.

El porcentaje de agua retenida (RW) comprende la cantidad de agua absorbida (g) por las fracciones de fibra, respecto a 100 g de agua añadida y es evaluada con posterioridad a un tiempo de estabilización y a un proceso de centrifugación. Esta propiedad se ve afectada significativamente y de forma negativa por la temperatura de secado (Figura 3). El R^2 de ajuste para RW (Tabla 2) fue de 73,55 mostrando que el modelo así ajustado explica 73,55% de la variabilidad de RW. El porcentaje de agua retenida es un parámetro de gran importancia en la formulación de productos que incluyan

procesos de transporte, así como en los procesos de digestión.

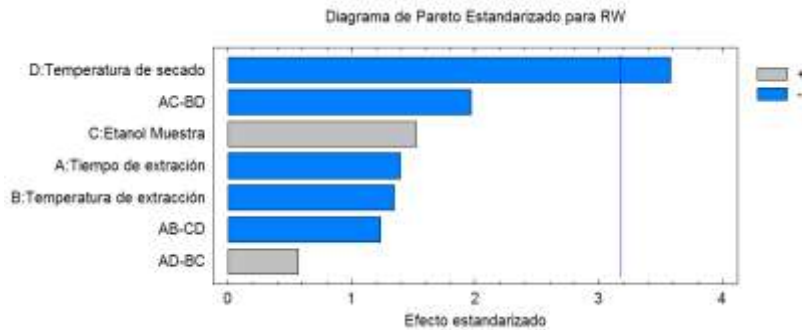


Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizado para RW. Nivel de significancia 0,05.

La capacidad de absorción de aceite (OHC) expresa la capacidad que tiene un material para retener aceite y puede ser importante en aplicaciones alimentarias como, por ejemplo, en la prevención de pérdidas de grasa en la cocción (Anderson y Berry 2001), en la industrialización por fritado y también en relación a aspectos fisiológicos dado que la capacidad de absorber o unirse a los ácidos biliares y aumentar su excreción se asocia con la reducción del colesterol plasmático (Schneeman 1999). Esta propiedad es afectada significativamente y de forma positiva por la relación etanol/muestra (Figura 4). El R^2 del ajuste fue 72,42 (Tabla 2), indicando que el modelo así ajustado explica un 72,42% de la variabilidad de OHC.

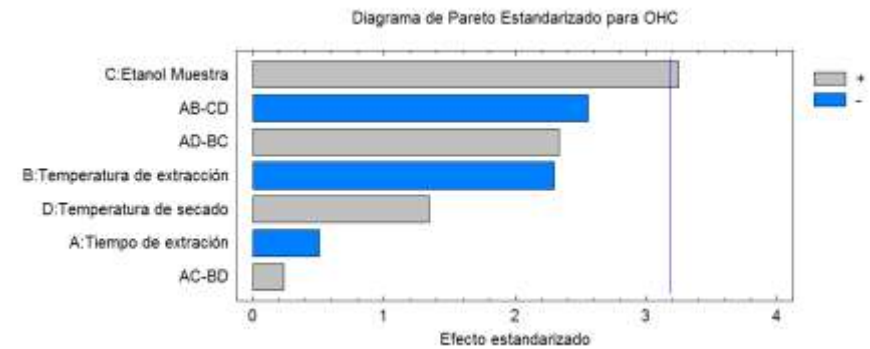


Figura 4. Diagrama de Pareto estandarizado para OHC. Nivel de significancia 0,05.

El volumen específico es la medida inversa de la densidad aparente (ρ). Esta última depende del contenido de agua, las características químicas y físicas del sólido y la proporción del volumen de aire en el sólido. De acuerdo con Koç *et al.* (2008), estas características se ven afectadas por los tratamientos de secado y por los fenómenos de colapso de la matriz. Las variables de proceso que afectan positiva y significativamente esta propiedad en las fracciones de fibra dietaria, son la relación etanol/muestra y la interacción AD-BC entre los cuatro factores; por otra parte, la temperatura de extracción tuvo un efecto significativo negativo (Figura 5). El R^2 del ajuste de esta propiedad fue de 70,33 indicando que el modelo así ajustado explica un 70,33% de la variabilidad del volumen específico.

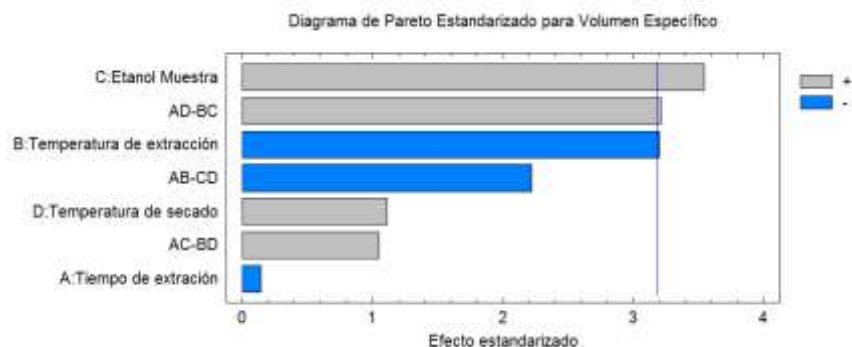


Figura 5. Diagrama de Pareto estandarizado para Volumen Específico. Nivel de significancia 0,05.

Tabla 2. Resumen del efecto de los 4 factores experimentales sobre las propiedades analizadas y su análisis estadístico.

	Tiempo extracción (A)	Temperatura extracción (B)	Etanol/muestra (C)	Temperatura secado (D)	AD-BC	AC-BD	R ²
SC				Negativo			76,24
WHC	Negativo		Positivo	Negativo		Negativo	93,50
RW				Negativo			73,55
OHC			Positivo				72,42
Volumen específico		Negativo	Positivo		Positivo		70,33

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de cuatro variables de proceso sobre las propiedades de hidratación, de absorción de aceite y el volumen específico de fracciones ricas en fibra dietaria aisladas de pulpa de papaya. Se encontró que la temperatura de secado afectó significativamente y de forma negativa, las propiedades de hidratación afectando la funcionalidad tecnológica y fisiológica de las fracciones. Por otra parte, la WHC fue afectada también por el tiempo de extracción de forma negativa y por la relación etanol/muestra de forma positiva, mientras que OHC sólo fue afectado significativamente y positivamente por la relación etanol/muestra. Finalmente, el volumen específico se vio afectado negativamente por la temperatura de extracción y positivamente por la relación etanol/muestra. El efecto multivariable observado para las propiedades WHC y volumen específico así como la influencia de interacciones complejas en algunas propiedades, pone de manifiesto la necesidad de completar el diseño para tener una visión más amplia del efecto de las variables de proceso sobre las propiedades estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson ET, Berry BW. 2001. Identification of nonmeat ingredients for increasing fat holding capacity during heating of ground beef. *Journal of Food Quality*, 24: 291–299.
- Cadden AM. 1987. Comparative effects of particle size reduction on physical structure and water binding properties of several plant fibers. *Journal Food Science*, 52(6):1595-1599.
- De Escalada Pla M.F, Uribe M, Fissore E., Gerschenson L, Rojas AM. 2010. Influence of the isolation procedure on the characteristics of fiber-rich products obtained from quince wastes. *Journal of Food Engineering*, 96: 239-248.
- Gómez E, Jiménez A, Rupérez P. 2010. Dietary fibre and physicochemical properties of several edible seaweeds from the northwestern Spanish coast. *Food Research International*, 43: 2289–2294.
- Kist H y Manica I. 1995. Densidades de plantio, crescimento e produção do mamoeiro formosa (*Carica papaya* L.) em Porto Lucena, RS. *Pesquisa agropecuaria brasileira*, 30(5): 657-666.
- Koç B, Eren I, Ertekin FK. 2008. Modelling bulk density, porosity and shrinkage of quince during drying: The effect of drying method. *Journal of Food Engineering*, 85: 340-349.
- Laufenberg G, Kunz B, Nystroem M. 2003. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. *Bioresearch Technology*, 87: 167–198.
- Molina NA, Acuña L, MArmelicz L. 2014. Costo de producción y rentabilidad del mamón en la provincia de Misiones. Publicación EEA Bella Vista – serie técnica N° 48. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/costo-de-produccion-y->

rentabilidad-del-mamon-en-la-provincia-de-misiones/

(Último acceso 2 de octubre de 2014).

Muggeridge M, Clay M. 2001. Quality specifications for herbs and spices. In: Peter KV (eds) *Handbook of Herbs and Spices*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited, pag.13-21.

Pérez-Cotapos RL. 2006. Manual de alimentación sana. México DF: Pax México. Pag 58-59.

Raghavendra SN, Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Tharanathan RN. 2004. Dietary fibre from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. *European Food Research Technology*, 218: 563-567.

Rivera Pastrana DM, Yahia EM, Gonzales Aguilar GA. 2010. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L) and their contents under low temperature storage. *Journal of the science of food and agriculture*, 90: 2358-2365.

Schneeman BO. 1999. Fiber, inulin and oligofructose: Similarities and differences. *Journal of Nutrition*, 129(7): 1424S-1427S.

Secmeler O. 2003. Comparison of microwave drying and microwave mixed-bed drying of red peppers. M.Sc Thesis, Dept. of Food Engineering, Middle East Technical University, Turkey.

Wurochekke1 AU, Eze1 HT, Declan B. 2013. Comparative Study on the Nutritional Content of *Carica Papaya* at Different Ripening Stages. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 14(2): 80-83.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT (089, 726, 550BA); PIP (531, 507); ANPCyT (PICT 2005-38239, 2013-2088).

CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE PULPA Y CÁSCARA DE PAPAYA (*CARICA PAPAYA* L.)

Nieto Calvache J.E.^{1,2}, de Escalada Pla M.^{1,2}, Gerschenson L.N.^{1,2}

1: Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Industrias, Argentina

2: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, Argentina

lia@di.fcen.uba.ar

Resumen: Diversos estudios han reportado un efecto benéfico de los compuestos antioxidantes sobre la salud humana. En gran parte, estos beneficios se han atribuido a la presencia de polifenoles, carotenoides y ácido ascórbico, los cuales serían responsables de dicha acción. La ingesta de alimentos ricos en compuestos antioxidantes se ha asociado con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer y procesos degenerativos. En esta investigación se realizó un estudio cuantitativo de la capacidad antioxidante de muestras de pulpa y cáscara de papaya (*Carica papaya* L.) y de su contenido de compuestos fenólicos, carotenoides y ácido ascórbico. Los resultados mostraron que la capacidad antioxidante de la pulpa fue un orden mayor que en la cáscara. De igual forma, el contenido de ácido ascórbico fue significativamente mayor en la pulpa que en la cáscara. Sin embargo, el contenido de compuestos fenólicos y carotenoides fue significativamente mayor en la cáscara que en la pulpa.

Palabras clave: Polifenoles, carotenoides, ácido ascórbico, capacidad antioxidante.

Abstract: Several studies have reported a beneficial effect of antioxidant compounds on human health. In part, these benefits have been attributed to the presence of polyphenols, carotenoids and ascorbic acid, which would be responsible for the antioxidant effect. The intake of food rich in antioxidant compounds has been related with a low incidence of cardiovascular disease, cancer and degenerative processes. The aim of the present work was to determine the antioxidant capacity of pulp and peel of papaya (*Carica papaya* L.), as well as the content of phenolic compounds, carotenoids and ascorbic acid. The results showed that the antioxidant capacity of the pulp was one order greater than the one in the peel. Additionally, the ascorbic acid content was significantly higher in pulp. However, both the content of phenolic compounds and carotenoids were significantly higher in the peel.

Keywords: polyphenols, carotenoids, ascorbic acid, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

La ingesta de compuestos antioxidantes, a través de alimentos naturalmente ricos en ellos como frutas y vegetales (Yahia 2010), ha sido correlacionada con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, cáncer, envejecimiento y procesos degenerativos (Kaliora y Dedoussis 2007). Algunos de estos beneficios en parte se han atribuido a los compuestos antioxidantes que están presentes en estos alimentos, los cuales pueden actuar ayudando a reducir el estrés oxidativo producido por radicales libres, los cuales producen daño celular (Dasil-Diaz *et al.* 2008). La determinación de la capacidad antioxidante se ha utilizado como una herramienta útil para medir la calidad de alimentos en relación a la salud (Gökmen *et al.* 2009). Las propiedades biológicas de los antioxidantes dependen de su capacidad para reaccionar con radicales libres y desarrollar acción reductora, mientras su biodisponibilidad depende de su liberación de la matriz alimentaria durante la digestión o fermentación colónica (Pastoriza *et al.* 2011). Algunos de los compuestos antioxidantes más importantes presentes en frutas y vegetales son los polifenoles, carotenoides y vitamina C (Yahia 2010). Los antioxidantes pueden ser encontrados en diferentes formas en la microestructura de los alimentos: (1) libres de interacciones químicas o físicas, (2) físicamente atrapados en la matriz alimentaria, (3) químicamente unidos a otras macromoléculas o (4) en forma insoluble (Gökmen *et al.* 2009). Algunos antioxidantes encontrados en forma libre (vitaminas C y E, carotenoides, polifenoles de bajo peso molecular y otros), son solubilizados y parcial o totalmente absorbidos en el intestino delgado (Manach *et al.* 2005). En

sistemas alimentarios complejos, estos se pueden encontrar incorporados en la matriz y/o unidos con diferentes macromoléculas tales como carbohidratos, proteínas, lípidos (Çelik *et al.* 2013).

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta (Manach *et al.* 2004). Los datos en la literatura acerca del contenido y composición de los polifenoles en los alimentos es parcial e insuficiente para determinar la ingesta dietaria (Saura-Calixto *et al.* 2007). Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de las plantas, los cuales tienen en común estructuras con anillos aromáticos y grupos hidroxilo que le proveen la habilidad de neutralizar especies reactivas, ayudando al organismo a protegerse del estrés oxidativo (Wojdylo *et al.* 2009).

Los carotenoides constituyen una familia de pigmentos que comprenden más de 700 especies diferentes. Estructuralmente hablando los carotenoides son los únicos tetraterpenos naturales derivados de la unión de 8 unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono. En general los carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas, derivados de los anteriores por incorporación de funciones oxigenadas. Los carotenoides pueden presentar una estructura acíclica como licopeno, o poseer distintas estructuras cíclicas de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos, como el β -caroteno (Minguez Mosquera *et al.* 2005). Modificaciones en uno o ambos extremos de la estructura o la introducción de funciones de oxígeno producen diferentes especies (Biehler *et al.* 2010). Son compuestos lipofílicos que juegan un rol importante en la salud humana y la nutrición; son reconocidos por su potencial antioxidante, debido a su habilidad de atrapar oxígeno singulete y eliminar el radical peroxilo (Al-

Duais 2009). Se ha propuesto una correlación entre una alta ingesta de carotenoides derivados de alimentos vegetales y una baja incidencia de varios tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón (Wright *et al.* 2003) y cáncer de próstata (Giovannucci *et al.* 2002).

La vitamina C (ácido ascórbico) es una vitamina hidrosoluble presente en los alimentos. Frutas y verduras frescas presentan el mayor contenido de ácido ascórbico, aunque varía entre las especies y variedades. El ácido ascórbico es asociado con la salud por la mayoría de los consumidores de modo que es un índice de calidad del producto atractivo para ellos (Pérez *et al.* 1997). Por otra parte, se ha encontrado que la vitamina C puede actuar sinérgicamente con otras vitaminas y jugar un importante rol en la regeneración de la vitamina E (Gayosso-García Sancho *et al.* 2011).

La papaya o mamón es un fruto cultivado principalmente en regiones tropicales y subtropicales y luego comercializado en diferentes partes del mundo (Rivera *et al.* 2010). La oferta promedio total en Argentina es de 11.000 toneladas anuales, siendo industrializada gran parte de la producción y una menor proporción es dedicada a la distribución en el comercio local (Molina *et al.* 2014). Gayosso-García Sancho *et al.* (2011) informaron la composición polifenólica del fruto de papaya variedad Maradol, en la cual identificaron los ácidos ferúlico, cafeico y p-cumárico. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de fracciones de cáscara y pulpa de papaya y cuantificar los contenidos de ácido ascórbico, polifenoles totales y carotenoides de las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua desionizada (Milli-Q™). Los reactivos utilizados fueron de grado analítico marca Merck o Anedra (Argentina) y los compuestos usados como patrones fueron de marca SIGMA (USA).

Los frutos de papaya (*Carica papaya* L.) se compraron en un mercado local de la Ciudad de Buenos Aires. Se separó el fruto en tres fracciones: cáscara, pulpa y semillas. Las semillas se descartaron y la cáscara y la pulpa se congelaron y, posteriormente, fueron deshidratadas por liofilización. El material seco obtenido se molió en un molino de cuchillas de uso doméstico (Braun, Argentina); posteriormente se tamizó con una malla ASTM 40 con apertura de poro de 420 micrones, estudiando las partículas menores a este tamaño. Finalmente, el material se envasó al vacío en bolsas de Cryovac™ (Sealed Air Corporation; copolímero de cloruro de polivinilo y cloruro de polivinilideno) y se almacenó en freezer (-18 °C) hasta su análisis.

Todas las determinaciones se realizaron, al menos, por duplicado.

Capacidad antioxidante

La medición de la capacidad antioxidante de las muestras de cáscara y pulpa liofilizadas se realizó a través del método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Este ensayo permite medir la capacidad de los compuestos presentes en una muestra, para actuar como captadores de radicales libres. Se utilizó una modificación de la técnica informada por Brand-

Williams *et al.* (1995), registrándose el cambio de absorbancia a 515 nm hasta alcanzar constancia en el tiempo. Se utilizó el ácido ascórbico como patrón de comparación.

Determinación de polifenoles, carotenoides, ácido ascórbico

Los procedimientos para la determinación de polifenoles totales, carotenoides y vitamina C, se llevaron a cabo al resguardo de la luz.

Polifenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Bunzel *et al.* 2000; Singleton y Rossi, 1965) después de hidrólisis de la muestra para liberar grupos fenólicos vinculados. Para ello, una cantidad de 0,5500 g de muestra se mezclaron con 30 mL de NaOH 2M y el sistema se mantuvo durante 24 horas a 25°C, bajo vacío y protegido de la luz. Finalizada la hidrólisis alcalina, se agregaron 5,7 mL de HCl (pH < 2). El sobrenadante obtenido de la hidrólisis alcalina previamente descrita, fue separado por centrifugación y utilizado para evaluar el contenido de fenoles totales el cual fue informado como ácido gálico equivalente (AGE) de acuerdo con Shui y Leong (2006).

Carotenoides totales

La extracción y determinación de carotenoides se realizó por medio de una adaptación del método propuesto por Biehler *et al.* (2010). Brevemente, 0,3335 g del material liofilizado se mezcló con 0,1665 g de carbonato de calcio, 2,5 mL de

metanol y 1 mL de hidróxido de potasio metanólico 30% (p/v) en un tubo de vidrio para centrifuga. Se agitó la mezcla con ayuda de un vortex y se mantuvo en hielo durante 15 minutos; a continuación, se centrifugó la mezcla 10 minutos a 2500xg a 20°C. Se separó el sobrenadante y se realizaron dos extracciones sobre el residuo con 4 mL de una mezcla hexano:acetona (1:1 v:v); posteriormente, se combinaron los tres extractos orgánicos. En una ampolla de decantación, se agregaron 12 mL de una solución saturada de cloruro de sodio y los extractos combinados y se agitó. La fase hexano sobrenadante se separó y la fase acuosa se re-extrajo con 4 mL de hexano. Se combinaron las fases y se registró el peso del hexano. Dos mililitros del extracto hexano se evaporaron hasta sequedad en un Rotavap (R-124, Buchi, Switzerland) bajo vacío y a 30°C. Se re-disolvió el residuo en 3,5 mL de acetona y se midió la absorbancia a 450 nm.

Se realizó un análisis espectrofotométrico basado en la propuesta de (Rao y Rao 2007).

Estos autores propusieron tomar en cuenta en el análisis únicamente los carotenos mayoritarios en la dieta y cuerpo humano, o sea beta-caroteno, alfa-caroteno, licopeno, luteína y criptoxantina. Y utilizar el valor de 135310 para el coeficiente de absorción molar promedio ϵ_{λ} ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a longitud de onda promedio, según parámetros propuestos por Biehler *et al.* (2010). Así, el cálculo de la concentración (c) de carotenoides promedio se realizó por medio de la ecuación de Lambert Beer:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Donde A_{450} es la absorbancia máxima promedio a 450 nm, d es el paso de la cubeta ($d=1\text{cm}$) y 135310 es el coeficiente de absorción molar promedio ϵ_{λ} ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a longitud de onda promedio. Utilizando la masa molar promedio (g/mol), los resultados se expresaron en miligramos por 100 gramos de material fresco (mg/100 g).

Ácido ascórbico

La extracción del ácido ascórbico se realizó por una adaptación del método propuesto por Rojas y Gerschenson (1991). Brevemente, una muestra de 0,1000 g del material liofilizado se colocó en un vaso de precipitados con 6 mL de una solución 6% (p/v) de ácido metafosfórico; la mezcla se mantuvo con agitación magnética durante 1,5 horas a 5°C para lograr la extracción total del ácido ascórbico. La suspensión fue finalmente centrifugada a 2500xg y 6°C durante 30 min. Se tomó una alícuota de 100 μL del sobrenadante y la concentración de ácido ascórbico se determinó usando el método espectrofotométrico del 2,6-diclorofenolindofenol. Los resultados se expresaron como gramos de ácido ascórbico por 100 g de la muestra fresca.

RESULTADOS

Capacidad antioxidante

El análisis de la capacidad antioxidante mostró que la actividad antirradicalaria de la pulpa (109,6 mg ascórbico/100 g), evaluada por el método del radical libre DPPH, fue cerca de

un orden de magnitud mayor ($p<0,05$) que en la cáscara (10,3 mg ascórbico/100 g). Este resultado nos indica que 100 g de pulpa y cáscara ejercen un efecto equivalente al efecto antirradicalario que el que ejercen 109,6 mg y 10,3 mg de ácido ascórbico, respectivamente. Gayosso-García Sancho *et al.* (2011), encontraron una alta correlación entre la capacidad antioxidante de la pulpa de papaya, medida por el método del DPPH y el contenido de ácido ascórbico ($R^2= 0,9951$), el contenido de carotenoides ($R^2= 0,9883$) y la presencia de compuestos fenólicos ($R^2= 0,9648$). Saura-Calixto y García-Alonso (2006), afirman que, respecto a los micronutrientes, las vitaminas C y E, los polifenoles y los carotenoides son reconocidos como los principales antioxidantes de la dieta.

Tabla1. Capacidad antioxidante (método del DPPH) y contenido de polifenoles totales, carotenoides y ácido ascórbico de pulpa y cáscara de papaya.

Análisis Químico	Pulpa liofilizada	Cáscara liofilizada
Capacidad antioxidante DPPH (mg/100 g) ¹	109,6 \pm 0,3	10,3 \pm 0,3
Polifenoles totales (g/100 g) ²	0,48 \pm 0,01	1,18 \pm 0,05
Carotenoides (mg/100 g) ³	1,42 \pm 0,02	2,49 \pm 0,02
Ácido Ascórbico (mg/100 g) ³	42,9 \pm 0,6	6,1 \pm 0,4

¹ mg ácido ascórbico equivalente/100 g muestra seca

² g/100 g de la muestra seca

³ mg/100 g de la muestra fresca original.

Contenido de polifenoles, carotenoides, ácido ascórbico

Debido a que las muestras presentaron una interesante capacidad antioxidante, se realizaron análisis de los compuestos habitualmente reportados en bibliografía como responsables de dicha capacidad y presentes en los tejidos vegetales.

La Tabla 1, muestra que el contenido de polifenoles totales encontrados en la cáscara de papaya (1,18 g/100 g) fue el doble ($p < 0,05$) de los encontrados en la pulpa (0,48 g/100 g). Estos resultados son acordes con los encontrados por investigadores como Saura-Calixto *et al.* (2007), quienes han reportado un promedio de polifenoles totales de 0,538 g/100 g evaluados en la parte comestible de diferentes frutos de la dieta española. Otros autores como Hervert-Hernández *et al.* (2011), reportaron un promedio de polifenoles de 0,742 g/100 g en la parte comestible de frutos consumidos en la dieta rural mejicana.

El contenido de carotenoides presentes en pulpa (1,42 mg/100 g) fue ligera pero significativamente ($p < 0,05$) menor que el encontrado en la cáscara de papaya (2,49 mg/100 g), como se observa en la Tabla 1. Estos resultados estuvieron en el orden de los encontrados en diferentes frutos como el melón cantalupo (2,98 mg/100 g porción comestible fresca) y el durazno (1,36 mg/100 g porción comestible fresca), reportados por Biehler *et al.* (2010), utilizando el mismo método de extracción. Gayosso-García Sancho *et al.* (2011) reportaron valores entre (0,92 – 3,27) mg/100g de porción comestible en papayas cultivadas en Méjico, siendo mayor el contenido de carotenoides cuando el grado de maduración fue mayor. Esto nos indica que los resultados obtenidos en

este trabajo se encuentran en concordancia con los datos encontrados por otros autores.

El contenido de ascórbico presente en la pulpa fue significativamente mayor (42,9 mg/100 g) que el encontrado en la cáscara de papaya (6,1 mg/100 g). Los resultados de contenido de ácido ascórbico obtenidos en la pulpa coinciden con los informados por Wall (2006), quien reportó un rango de 36,3 a 67,8 mg/100 g en la parte comestible fresca de papayas cultivadas en Hawaii. El contenido de ácido ascórbico de la pulpa y cáscara de papaya es comparable con el encontrado en 100 mL de jugo de limón tahiti (41,4 mg/100 mL) y en 100 g de la cáscara del mismo (6,84 mg/100 g cáscara fresca) de acuerdo a Barros *et al.* (2012). Tariq (2007) informó que una ingesta diaria regular de 250-500 mg de ácido ascórbico ayuda a reducir el daño oxidativo por remoción de los radicales libres del organismo.

CONCLUSIONES

Se realizó un análisis de capacidad antioxidante por el método del radical libre DPPH, en muestras de pulpa y cáscara de papaya liofilizadas. Los resultados mostraron que la pulpa tiene una capacidad antioxidante de un orden mayor que la cáscara en las condiciones ensayadas. Se observó que tanto el contenido de polifenoles totales como el de carotenoides fue superior en la cáscara mientras que el contenido de ácido ascórbico en la pulpa fue significativamente mayor (~7 veces) que en la cáscara. Estos resultados nos permiten inferir que la capacidad antioxidante evaluada a través del método de DPPH, está relacionada no sólo con el contenido total de los compuestos antioxidantes presentes en el tejido sino además con la naturaleza química de los mismos, por su diversa capacidad para reaccionar con los radicales libres.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Duais M. 2009. Contents of vitamin C, carotenoids, tocopherols, and tocotrienols in the subtropical plant species *Cyphostemma digitatum* as affected by processing. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 57: 5420-5427.
- Barros HRDM, Ferreira TAPDC, Genovese MI. 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food chemistry*, 134(4): 1892-1898.
- Çelik EE, Gökmen V, Fogliano V. 2013. Soluble antioxidant compounds regenerate the antioxidants bound to insoluble parts of foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(43): 10329-10334.
- Biehler E, Mayer F, Hoffmann L, Krause E, Bohn T. 2010. Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. *Journal of food science*, 75(1): C55-C61.
- Bunzel M, Ralph J, Marita J, Steinhart H. 2000. Identification of 4-O-5'-coupled diferulic acid from insoluble cereal fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3166-3169.
- Dosil-Díaz O, Ruano-Ravina A, Gestal-Otero JJ, Barros-Dios J M. 2008. Consumption of fruit and vegetables and risk of lung cancer: A case-control study in Galicia, Spain. *Nutrition*, 24(5): 407-413.
- Gayosso-García Sancho LE, Yahia EM, González-Aguilar GA. 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*, 44(5): 1284-1291.

- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. 2002. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 94:391–8.
- Gökmen V, Serpen A, Fogliano V. 2009. Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, 20: 278-288.
- Hervert-Hernandez D, Garcia OP, Rosado JL, Goñi I. 2011. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. *Food Research International*, 44: 1182-1189.
- Kaliora AC, Dedoussis GV. 2007. Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD. *Pharmacology*, 56: 99-109.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81: 230-242.
- Mínguez-Mosquera MI, Pérez Gálvez A, Hornero Méndez D. 2005. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturale. Disponible en: digital.csic.es/bitstream/10261/5754/1/IG_AGROCSIC_4.pdf (Último acceso 06 de noviembre de 2014).
- Molina NA, Acuña L, Marmelicz L. 2014. Costo de producción y rentabilidad del mamón en la provincia de Misiones. Publicación EEA Bella Vista – serie técnica N° 48. Disponible en: <http://inta.gov.ar/documentos/costo-de-produccion-y-rentabilidad-del-mamon-en-la-provincia-de-misiones/> (Último acceso 2 de octubre de 2014).
- Pastoriza S, Delgado-Andrade C, Haro A, Rufián-Henares JA. 2011. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chemistry*, 129: 1926-1932.
- Pérez AG, Olías R, Espada J, Olías JM, Sanz C. 1997. Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9): 3545-3549.
- Rao AV, Rao LG. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55:207–16.
- Rivera Pastrana DM, Yahia EM, Gonzales Aguilar GA. 2010. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L) and their contents under low temperature storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 2358-2365.
- Rojas AM, Gerschenson LN. 1991. Determinación de vitamina C en productos frutihortícolas. *Anuales de la Asociación Química Argentina*, 79(2): 97-106.
- Saura-Calixto F, García-Alonso A, Goñi I, Bravo L. 2006. Antioxidant capacity of the spanish mediterranean diet. *Food Chemistry*, 94: 442-447.
- Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501.
- Shui G, Leong LP. 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97: 277-284.

Singleton VL, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–153.

Tariq SA. 2007. Role of ascorbic acid in scavenging free radicals and lead toxicity from biosystems. *Molecular Biotechnology*, 37:62-65.

Yahia ME. 2010. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. En: de la Rosa LA, Álvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA, editores, *Fruit and vegetable phytochemicals*. USA: Wiley-Blackwell. pag 3-51.

Wall MM. 2006. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 434-445.

Wojdylo A, Oszmianski J, Lawoski P. 2009. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal Agricultural of Food Chemistry*, 56: 6520-6530.

Wright ME, Mayne ST, Swanson CA, Sinha R, Alavanja MC. 2003. Dietary carotenoids, vegetables, and lung cancer risk in women: the Missouri women's health study (United States). *Cancer Causes Control*, 14:85-96.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por la Universidad de Buenos Aires UBACYT (089, 726, 550BA); PIP (531, 507); ANPCyT (PICT 2005-38239, 2013-2088).

EXTRACCIÓN DE ACEITE DE GIRASOL: EFECTO DEL CONTENIDO DE HUMEDAD EN LA CALIDAD DEL ACEITE Y ESTRUCTURA DE LOS COLLETS.

Pérez E.E.¹, Bäumlér E.E.¹, Crapiste G.H.¹, Carelli A.A.¹

1: CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
eperez@plapiqui.edu.ar

Resumen: Los objetivos de este trabajo fueron analizar cambios en la estructura de *collets* de girasol variando el contenido de humedad de los mismos y estudiar el efecto en la calidad del aceite obtenido y distribución de componentes minoritarios. El incremento de la humedad causó una disminución en el rendimiento de aceite. El contenido de ceras estuvo entre 896 y 1118 ppm, registrándose menor contenido para la muestra de mayor humedad. Los principales componentes fueron ésteres entre 44 y 60 átomos de carbono, no se encontraron variaciones en la distribución de los ésteres. El contenido total de tocoferoles estuvo entre 788 y 972 ppm, siendo detectados α -tocoferol, β -tocoferol y β -tocotrienol, el α -tocoferol representó más del 93% y el mayor contenido se obtuvo en la muestra de 12% de humedad. Los fosfolípidos aumentaron de 12,2 a 15,4 mg/g con el incremento del contenido de humedad, no se observaron diferencias en el perfil. Las microfotografías mostraron diferencias morfológicas en la superficie de los *collets* según las condiciones de humedad. Como conclusión podemos afirmar que el contenido de humedad de las muestras afectó tanto la morfología de los *collets* como el rendimiento de la extracción de aceite y su contenido de compuestos minoritarios.

Palabras clave: aceite de girasol, extracción con solvente, componentes minoritarios, humedad.

Abstract: The aims of this work were to analyze changes in the structure of sunflower *collets* varying the moisture content thereof and study the effect on the quality of sunflower oil obtained by determining its wax, phospholipids and tocopherol content and composition. The increasing moisture content caused a decrement in oil yield. The total waxes contents were between 896 and 1118 ppm, and they were composed mainly of esters of between 44 and 60 carbon atoms, whose distribution did not changed according to the moisture content considered. The total tocopherol content was between 788 and 972 ppm, in all the experiments, α - and β -tocopherols and β -tocotrienol were detected, being the level of α -tocopherol higher than 93% and easier to extract at 12% d.b. of moisture content. Furthermore, the phospholipid content in the oil increased from 12.2 to 15.4 mg/g with moisture content, but maintaining its composition. Micrographs showed morphological differences in the surface of the *collets* according to moisture conditions. In brief, the moisture content of the *collets* affects both morphology *collets* as the oil yield and also the content of minor compounds.

Keywords: sunflower oil, solvent extraction, minor compounds, moisture.

INTRODUCCIÓN

Tres tipos de procesos son utilizados a nivel industrial para la extracción de aceite: prensado, extracción por solvente y una combinación de ambos. El tipo de proceso seleccionado depende principalmente de la materia prima, la cantidad de aceite residual deseada, la cantidad de proteínas desnaturalizadas permitida, el capital de inversión, y las leyes ambientales locales sobre la emisión de compuestos volátiles orgánicos. El girasol, al ser una oleaginosa con alto contenido de aceite, se procesa en dos etapas: prensado, donde se reduce el contenido graso a un 20% aproximadamente, y en un segundo paso, la extracción con solvente (hexano) que disminuye el porcentaje de aceite a menos del 2%.

La eficiencia en el proceso de extracción requiere ajustar varios factores: el pretratamiento de las muestras, lo que incluye, secado, reducción de tamaño o hidrólisis; homogeneización del material sólido en presencia de solvente, separación de la fase solvente de la sólida, remoción de los contaminantes no lipídicos, eliminación del solvente y secado del extracto obtenido.

El pretratamiento dado a las semillas/grano incluye calor y el ajuste de la humedad para facilitar la rotura de las estructuras y así facilitar el ingreso de solvente. El contenido de humedad determina la estructura de la superficie y la actividad del material sólido, por ejemplo en semillas muy secas el aceite tiene más afinidad por la matriz sólida. El contenido de humedad recomendada en oleaginosas laminadas se encuentra entre el 9-11%. El hexano y el agua son inmiscibles y altos contenidos de humedad interfieren en la penetración

del solvente. Por el contrario, niveles bajos de humedad reducen los esfuerzos estructurales de los laminados y conducen a la mayor producción de finos.

Se han encontrado estudios del efecto de la humedad y la temperatura: en laminados de germen de maíz y soja, en el expeller de girasol, en la extracción supercrítica de laminados de canola y soja. En la mayoría de los casos el análisis del efecto de la humedad estuvo centrado en el rendimiento de aceite. Chu y Lin (1993) determinaron que el contenido total de tocoferoles en el aceite crudo de soja disminuyó con el incremento del contenido de humedad.

En este trabajo se planteó actualizar información con técnicas modernas y analizar la influencia de la humedad de la materia prima sobre el rendimiento de aceite, el contenido de componentes minoritarios (tocoferoles, fosfolípidos y ceras), así como los cambios en la estructura antes y después de la extracción a diferentes niveles de humedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima y acondicionamiento de las muestras

Las determinaciones experimentales se hicieron utilizando material expandido de girasol, conocidos como "*collets*", los que fueron provistos por una empresa local. Los *collets* fueron almacenados en envases de polietileno con tapas a rosca a 4°C hasta su uso en los ensayos de extracción.

Los *collets* fueron caracterizados según su contenido de humedad (Método 1.121), aceite (Método 1.122), proteínas (N x 6,25) por el método de Macro Kjeldahl y fibras estructurales: fibra detergente neutra (FDN); fibra detergente ácida (FDA) y lignina.

Las muestras fueron acondicionadas a los niveles de humedad seleccionados secándolas en estufa a 40-45°C o rociándolas con agua destilada. La cantidad de agua a añadir se calculó previamente mediante un balance de masa. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por al menos 48 h en recipientes plásticos herméticos para permitir una distribución uniforme de la humedad. Previo a los ensayos, se retiraron las muestras del refrigerador y se dejaron expuestas al ambiente por aproximadamente 2 h hasta que alcancen la temperatura del mismo. El contenido de humedad alcanzada fue determinado a 105°C en una balanza analítica infrarroja OHAUS (Model MB 45). A su vez, se determinó la actividad de agua de cada muestra empleando un termohigrómetro Testo 650 (Testo AG, Germany).

Determinaciones

Ensayos de extracción por solvente

El aceite se extrajo en un sistema batch termostatzado con baño de agua a 50°C y agitado magnéticamente. Se sometieron a extracción, aproximadamente $22,0 \pm 1,5$ g de *collets* de girasol con n-hexano (90%, b.p. 68-72°C) como solvente. La relación de solvente empleada fue 1:10 sólido-solvente (p/v). La selección de esta relación se basa en estudios previos del grupo. A partir de este valor, se obtiene una relación aproximadamente lineal en la distribución del aceite entre la fase sólida y líquida. La muestra y el solvente fueron calentados a 50°C antes de ponerse en contacto. La agitación se mantuvo constante y a una velocidad tal de asegurar la suspensión homogénea de las partícula. Luego de 2 h, las muestras fueron retiradas del baño y se sometieron a filtración de modo de separar el sólido de la miscela. Se recuperó el

aceite de la miscela en un evaporador rotatorio y el hexano residual se eliminó bajo corriente de nitrógeno hasta peso constante del aceite obtenido. Todas las extracciones se realizaron por triplicado.

Componentes Minoritarios

Análisis de Tocoferoles: los tocoferoles se cuantificaron mediante su análisis según el método AOCS Ce8-89. Se empleó un equipo HPLC Waters 600E HPLC (Waters Associates, Milford, MA, USA), con muestreador automático y desgasificador por vacío, equipado con un detector de fluorescencia Waters 470 cuyas longitudes de excitación y emisión estuvieron establecidas en 290 nm y 330 nm, respectivamente. La columna Nucleosil Si-100A (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m tamaño de partícula, Phenomenex, USA) fue eluída con n-hexano: isopropanol (99,5:0,5, v/v, HPLC solvente, J.T. Baker, Phillipsburg, EE.UU.) a un flujo de $1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La cuantificación de los diferentes isómeros de tocoferoles se realizó con el método de estándar externo, utilizando α -tocoferol como referencia (Sigma T#3251, 95% pureza). El contenido de tocoferoles se expresó como $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de aceite.

Análisis de Fosfolípidos: los fosfolípidos presentes en el aceite se concentraron empleando cartuchos de extracción de fase sólida diol (SPE) de 0,500 gramos (J.T. Backer Inc., Phillipsburg, NJ, USA). Se cuantificaron por el método del estándar externo mediante cromatografía líquida empleando detector UV, un equipo Waters 600E HPLC (Waters Associates, Milford, MA, USA) y una columna Lichrosorb SI-60 (250 x 4 mm, 5 μ m tamaño de partícula, Merck, Darmstadt, Germany).

Análisis de Ceras: El contenido de ceras se determinó por fraccionamiento del aceite, al que se le ha añadido como

patrón interno laurato de araquidilo (C32), mediante columna con doble capa absorbente de gel de sílica hidratado y gel de sílica impregnado en nitrato de plata. Las fracciones eluidas recuperadas fueron analizadas con un cromatógrafo Perkin Elmer AutoSystem XL provisto de detector de ionización de llama (FID), inyector "on-column", columna HP-5 de 30 m x 0,32 mm (0,25 μ m) (Agilent Technologies, Lexington, MA, USA) procesador de datos TotalCrom Workstation Versión 6.3.1 (Perkin Elmer, MA, USA). Las condiciones de operación fueron: gas carrier hidrógeno a 3 mL/min; temperatura del horno de la columna: 80°C (1 min) – 20°C/min – 240°C – 5°C/min – 325°C (6 min) – 20°C/min – 340°C (40 min); programación de temperatura del inyector: 80°C – 20°C/min – 320°C (mantenida toda la corrida); volumen de inyección 3 μ L; FID a 350°C.

Microscopía: los *collets* fueron seccionados en cortes longitudinales. Para conservar las estructuras al practicar el corte, los mismos se sumergieron en nitrógeno líquido y luego se procedió a cortarlos con una hoja de bisturí bajo la lupa. Las muestras fueron fijadas a un cubre objeto con esmalte traslúcido. Luego, se metalizaron con una capa delgada de oro en un "sputter coater" (Pelco 91000), a fin de permitir un flujo de carga electrónico producido por un evaporador catódico. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido LEO EVO 40XVP, (Cambridge 2004) operando a 7.0 kV, con una magnificación de 2000x y 3000x.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue llevado a cabo por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) usando el software Infostat. La comparación de medias se realizó mediante el test de Fisher's LSD con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición proximal de los *collets* de girasol fue la siguiente: humedad inicial, $5,25 \pm 0,76$; aceite, $21,88 \pm 0,32$; proteína, $33,57 \pm 0,30$; FDN $31,20 \pm 0,54$; FDA, $21,65 \pm 0,17$ y lignina $4,94 \pm 0,13$, todos los resultados están expresados en porcentaje en base seca (b.s.).

El contenido de humedad de los *collets* después del acondicionamiento se muestra en la **Tabla 1**. Las muestras se denominarán de aquí en adelante y en orden creciente de humedad como H₁, H₂ y H₃. El incremento de humedad causó un aumento del rendimiento de aceite (expresado en base seca, b.s.) altamente significativo ($p=0.003$), ello se puede corroborar en las microfotografías de la **Fig. 1**. En las **Fig 1-A, C y E**

se aprecia como la película de aceite expuesta sobre la superficie de los *collets* se discontinúa al aumentar el contenido de humedad. Por su parte, las **Fig. 1-B, D y F** muestran la superficie de los *collets* luego de ser sometidas a la extracción por solvente, donde se observa el agotamiento de las mismas y mayor apertura de las estructuras con el aumento de la humedad.

Tabla 1: Composición promedio del aceite de girasol a diferentes contenidos de humedad.

Componentes	H ₁	H ₂	H ₃
Humedad (% b.s.)	$5,50 \pm 0,37$	$12,40 \pm 1,42$	$18,92 \pm 2,72$
Aceite (% b.s.)	$20,83 \pm 0,08^a$	$21,35 \pm 0,15^b$	$21,23 \pm 0,13^b$
Tocoferoles (ppm)	925 ± 71^{ab}	1037 ± 48^b	843 ± 55^a
Fosfolípidos (mg/g)	$10,35 \pm 0,45^a$	$10,02 \pm 1,61^a$	$12,99 \pm 1,41^b$
Ceras Totales (ppm)	1079 ± 72^b	1118 ± 65^b	896 ± 129^a

*Cada valor es el promedio \pm la desviación estándar. Dos valores en la misma fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) por el método de Fisher's LSD.

Los *collets* correspondientes a la muestra H3 sometidos a extracción presentaron agregados sobre la superficie que pueden ser atribuidos a cúmulos de ceras o proteínas. En la **Fig. 2-A y B** se muestra la superficie a dos magnificaciones en donde se pueden apreciar dichos agregados. Esto estaría de acuerdo con reportes sobre la dependencia de la humedad en la organización de proteínas nativas, especialmente globulinas, en tortas de girasol sometidas a tratamiento térmico y en condiciones de baja humedad (menores al 30%) (Rouilly *et al.* 2003).

El contenido de tocoferoles totales se presenta en la **Tabla 1**. Se detectaron α -tocoferol, β -tocoferol y β -tocotrienol en todas las muestras, con niveles de α -tocoferol mayores al 93%. Los tocoferoles están intrínsecamente asociados a la estructura de los cuerpos lipídicos. Ellos son moléculas anfipáticas, con su cola hidrofílica asociada a la membrana lipídica y los grupos de cabeza polar sobre la superficie de la membrana. Esta disposición dificulta más la extracción de tocoferoles que del aceite. Se ha reportado que esta lipofilidad de la molécula determina la cinética de su transporte y retención dentro de las membranas. Como es posible observar en la **Tabla 1**, el contenido de tocoferoles en la muestra H₂ fue más alto que para la H₁ y H₃. Si bien el aumento de humedad facilita la disrupción de la estructura de la matriz sólida, altos contenidos de la misma promueve la degradación de la vitamina E (α -tocoferol). Algunos estudio han mostrado que la pérdida de tocoferoles y tocotrienoles dependen de la actividad de agua; cuando la actividad

aumenta, la degradación se acelera. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los obtenidos por Eitenmiller y Lee (2005) en soja.

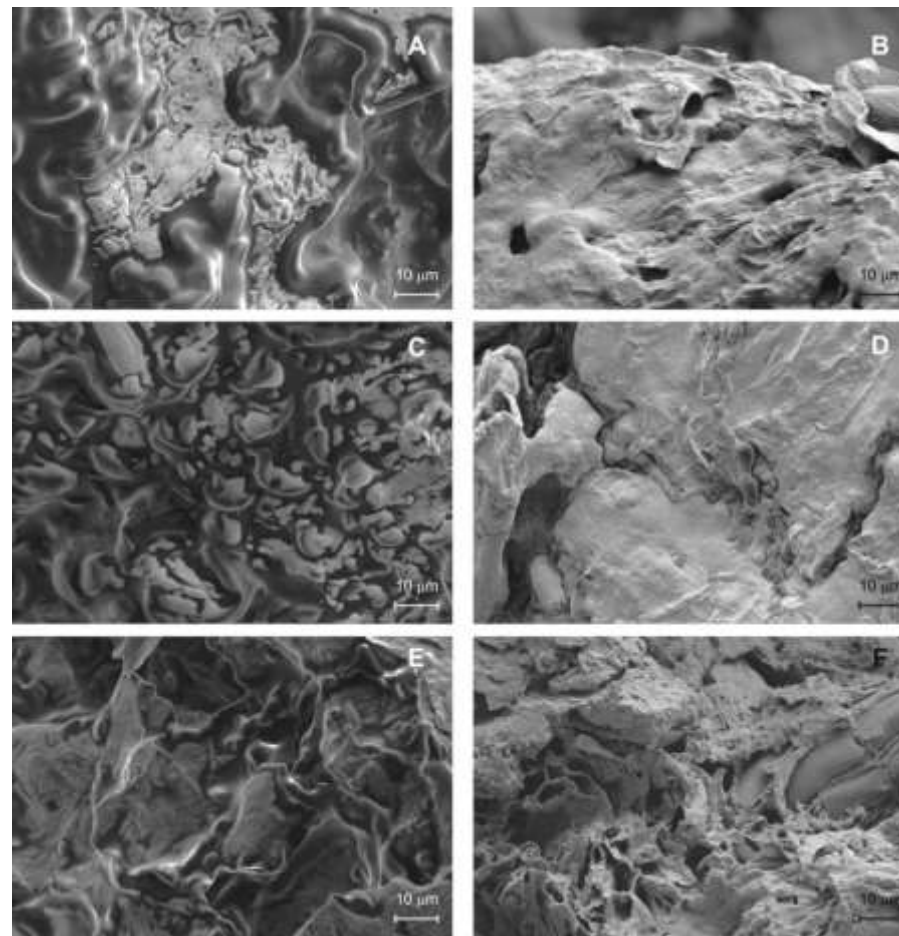


Figura 1: Microfotografías SEM (3000x) de las muestras correspondientes a H₁ (A, B), H₂ (C, D), H₃ (E, F) antes y después de la extracción por solvente, respectivamente.

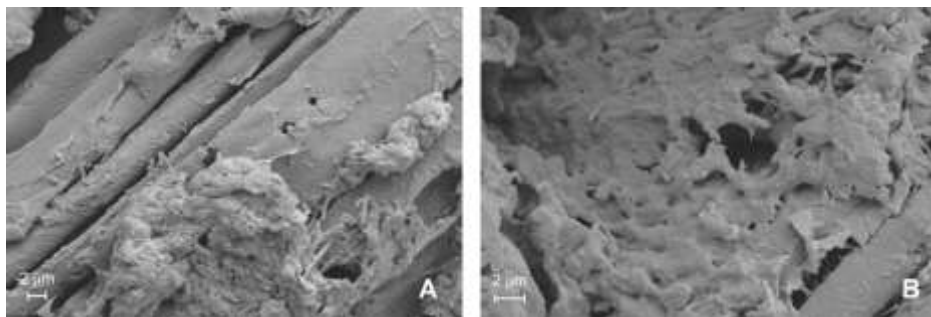


Figura 2: Microfotografías SEM de las muestras H₃ después de la extracción con solvente: magnificación A) 6000x y B) 10000x.

El acondicionamiento de las muestras antes de la extracción condujo a diferencias significativas en el contenido de fosfátidos totales ($p=0.0231$) (**Tabla 1**). Las ceras estuvieron compuestas principalmente por ésteres de 44 a 60 átomos de carbono, siendo el rango entre 896 y 1118 ppm (**Tabla 1**). El valor más bajo se registró en la muestra H₃ ($p=0.032$). Las ceras con átomos de carbono menores a 40 (C40) son consideradas como solubles en el aceite, las comprendidas entre C40 y C42 parcialmente soluble y mayores a C44 como la fracción cristalizable. En nuestro caso la fracción cristalizable no se vio afectada significativamente por el contenido de humedad ($p= 0,1903$).

Varios parámetros afectan a la extracción con solvente del aceite de girasol, en el presente trabajo se analizó el efecto del contenido de humedad en el rendimiento de extracción y calidad del aceite obtenido. Los efectos de la humedad de

los *collets* sobre el rendimiento de aceite se muestran claramente. Con el fin de maximizar el rendimiento de aceite se podría recomendar utilizar humedades cercanas a 12% (b.s.), sin embargo un aumento superior del contenido de humedad provoca un aumento del contenido de fosfolípidos.

Estos resultados prueban que la humedad relativa de los *collets* tiene un efecto importante tanto en la morfología de los *collets* como el rendimiento de la extracción de aceite y su contenido de compuestos minoritarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Carelli AA, Bäumlér EB, Ceci LN. 2012. Improved method for the determination of wax esters in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114(11):1312-1319.
- Carelli AA, Bredan MIV, Crapiste GH. 1997. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74(5):511-514.
- Chu YH, Lin JY. 1993. Factors affecting the content of tocopherol in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(12):1263-1268.
- Cortés M, Osorio A, García E. 2007. Manzana deshidratada fortificada con vitamina E utilizando la Ingeniería de Matrices. *Vitae (Medellín)* 14(2):17-26.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2011. *InfoStat versión 2011*: Grupo InfoStat.
- Dunford NT, Temelli F. 1997. Extraction conditions and moisture content of canola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts. *Journal of Food Science* 62(1):155-159.
- Eitenmiller RR, Lee J. 2005. *Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis*: CRC Press. pag 526
- Firestone D, editor. 2009. *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. 6 th ed. Champaign, Illinois, USA: AOCS Press.
- Fisk ID, White DA, Carvalho A, Gray DA. 2006. Tocopherol—an intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83(4):341-344.
- Gupta MK. 2002. Chapter 5: Sunflower oil. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*:128.
- Jacobsen LA, Backer LF. 1986. Recovery of sunflower oil with a small screw expeller. *Energy in Agriculture* 5(3):199-209.
- Johnson LA. 2002. Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. *Food Science and Technology - New York - Marcel Dekker*:223-274.
- Johnson LA. 2008. Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. *Food lipids chemistry, nutrition and biotechnology*, 3rd edn CRC Press, Boca Raton. p 205-244.
- Karlovic D, Sovilj M, Turkulov J. 1992. Kinetics of oil extraction from corn germ. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(5):471-476.
- Lawson OS, Oyewumi A, Ologunagba FO, Ojomo AO. 2010. Evaluation of the parameters affecting the solvent extraction of soybean oil. *Journal of Engineering and Applied Sciences* 5(10).
- Paquot C, Hautfenne A, editors. 1992. *Oleaginous seeds and fruits*. 7 th ed. Oxford, UK: Blackwell, Oxford Pergamon Press.
- Pérez EE, Carelli AA, Crapiste GH. 2011. Temperature-dependent diffusion coefficient of oil from different sunflower seeds during extraction with hexane. *Journal of Food Engineering* 105(1):180-185.
- Rouilly A, Orliac O, Silvestre F, Rigal L. 2003. Thermal denaturation of sunflower globulins in low moisture conditions. *Thermochimica acta*, 398(1), 195-201.
- Sattler SE, Gilliland LU, Magallanes-Lundback M., Pollard M., DellaPenna D. 2004. Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *The Plant Cell Online* 16(6):1419-1432.
- Snyder J, Friedrich J, Christianson D. 1984. Effect of moisture and particle size on the extractability of oils from seeds with supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 61(12):1851-1856.

Stahl E, Quirin KW, Gerard D. 1988. Applications of Dense Gases to Extraction and Refining. Dense Gases for Extraction and Refining: Springer. p 72-217.

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74(10):3583-3597.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur, Argentina

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE PEROXIDASA EN CRUCÍFERAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO INDUSTRIAL DE VEGETALES PRECOCIDOS CONGELADOS

Pérez JF¹, Santos MV^{1,2}, Califano A¹, Zaritzky N^{1,2}

1: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos CIDCA (UNLP-CONICET), Argentina.

2: Depto. de Ingeniería Química- Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Resumen: Los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*) y el brócoli (*Brassica oleracea itálica*) poseen componentes nutritivos importantes necesarios en la dieta diaria (ej. vitamina C, di-indolilmetano, glucorafanina). Por esta razón existe una tendencia a aumentar su consumo como vegetales pre-cocidos congelados, generando así una alternativa práctica. La Peroxidasa (POD) es una enzima presente en estos vegetales y se la utiliza como indicadora del tratamiento térmico considerando que para asegurar la calidad en la conservación de estos vegetales la actividad enzimática debe ser mínima luego del tratamiento. El sector industrial requiere la definición de parámetros cinéticos que aseguren la calidad final del vegetal congelado, específicamente constantes cinéticas de inactivación

térmica enzimática y energías de activación. Se realizaron experimentos de laboratorio midiendo la actividad enzimática de POD en brócoli y repollitos de Bruselas a distintas temperaturas y tiempos de calentamiento. Se detectó un comportamiento bifásico de primer orden en ambos vegetales encontrándose en el caso de repollitos de Bruselas que las constantes cinéticas de la fracción resistente tienen valores entre $3,85 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ (Desvío estándar (DS)= $3,64 \times 10^{-4}$) y $7,47 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ (DS= $2,43 \times 10^{-4}$) en el rango entre 75-90 °C. Para ese mismo rango de temperaturas las constantes de la fracción lábil estuvieron entre $3,11 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ (DS= $2,04 \times 10^{-3}$) y $7,87 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ (DS= $1,79 \times 10^{-3}$). Los resultados obtenidos son importantes ya que permiten optimizar el proceso de pre-cocción para su posterior congelación.

Palabras clave: Inactivación enzimática, vegetales crucíferos, alimentos pre-cocidos congelados.

Abstract: The Brussels sprouts (*Brassica oleracea gemmifera*) and broccoli (*Brassica oleracea italics*) have important nutritional components needed in the daily diet (e.g. vitamin C, di-indolyl-methane, glucoraphanin). For this reason there is a tendency to increase their consumption as frozen pre-cooked vegetables, generating a practical alternative. Peroxidase (POD) is an enzyme present in these vegetables and usually used as an indicator of the thermal treatment. The industrial sector requires the definition of kinetic parameters that can help to assure the final quality of frozen vegetables, specifically thermal kinetic constants

of enzyme inactivation and activation energies. Laboratory experiments were performed by measuring the enzymatic activity of POD in broccoli and Brussels sprouts at different temperatures and heating times. A biphasic first-order behavior was detected in both vegetables. In the case of Brussels sprouts the kinetic constants of the heat resistant fraction were $3.85 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Standard deviation (SD) = 3.64×10^{-4}) and $7.47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (SD = 2.43×10^{-4}) in the temperature range 75-90 °C. For the same temperature range the kinetic constants of the heat-labile fraction were $3.11 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SD = 2.04×10^{-3}) and $7.87 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (SD = 1.792×10^{-3}). These results allow the optimization of the pre-cooking stage followed by a subsequent freezing.

Keywords: Enzyme inactivation, cruciferous vegetables, pre-cooked frozen foods.

INTRODUCCIÓN

Los repollitos de Bruselas (*Brassica oleracea gemmifera*) y el brócoli (*Brassica oleracea italica*) son vegetales crucíferos estacionales que contienen un alto contenido de vitamina C y fibra alimentaria. Las crucíferas también contienen múltiples nutrientes con potentes propiedades anti-cancerígenas, como di-indolilmetano el cual es un modulador de la respuesta del sistema inmunitario innato con actividad anti-viral, anti-bacteriana y anti-cancerígena. A su vez estos vegetales contienen el compuesto glucorafanina, que puede ser convertido en el compuesto anti-cancerígeno sulforafano (Campas 2009). El alto contenido de nutrientes benéficos para la salud que ayudan a la prevención de enfermedades provoca el incremento en la frecuencia de consumo de estos vegetales en la dieta diaria. Los alimentos congelados son un sector muy importante del mercado creciendo a un ritmo del 10% anual en Latinoamérica, por lo tanto es importante impulsar este sector en el contexto nacional. Actualmente, la tendencia es utilizar alimentos saludables cuyos tiempos de preparación sean mínimos. Algunos de los productos que se están popularizando en los supermercados son los alimentos congelados listos para el consumo los cuales ofrecen preparar rápidamente los alimentos. Por estas razones para cumplir con la demanda continua de vegetales (crucíferas), su comercialización se realiza en forma pre-cocida congelada. Debido a que aún a temperaturas por debajo de 0°C existe actividad enzimática

(AE) (Viña *et al.* 2007) en los vegetales que provoca alteraciones no deseables, es necesario inactivar las enzimas previo a la congelación. Asimismo es fundamental establecer cuál es la principal enzima que provoca el deterioro en la especie vegetal y la correspondiente cinética de inactivación (Williams *et al.* 1986). La congelación al estar acompañada de un pre tratamiento térmico que crea una relación de compromiso entre algunas características como son la textura, contenido de nutrientes y sabor, los cuales se modifican con respecto al producto fresco pero aseguran obtener un producto alimenticio en óptimas condiciones para ser consumidos. Por esta razón, se hace necesario estudiar el pre tratamiento térmico asegurando que el vegetal no tendrá pérdidas nutricionales significativas. Las oxidasas, peroxidasas (POD), lipoxigenasas y catalasas son enzimas presentes en vegetales, siendo comúnmente la peroxidasa la más utilizada para monitorear la inactivación dada su gran resistencia térmica. Sin embargo la completa inactivación de peroxidasa puede implicar un excesivo tratamiento térmico y se ha demostrado que la calidad del producto congelado es mayor si existe cierta actividad residual de peroxidasa en el vegetal luego del calentamiento (Bottcher 1975). Para un tratamiento térmico óptimo se recomienda una concentración residual de POD de 7,5-11% en repollitos de Bruselas (Williams *et al.* 1986). Hasta el presente no se ha demostrado la correlación directa entre la pérdida de calidad con la presencia de dicha enzima. La enzima POD pertenece al grupo oxido-reductasas (Müftügil 1985), las cuales son responsables de la oxidación de muchos compuestos. La POD actúa en presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno libre (Lagrimini 1993).

Esta enzima se encuentra en la mayoría de los vegetales y frutas (Burnette 1977), y dada su gran estabilidad térmica se la emplea frecuentemente como parámetro indicador de la finalización del proceso de inactivación enzimática (IE). Se ha reportado en literatura que en brócoli esta enzima presenta una curva de inactivación bifásica (Morales *et al.* 2002), lo que demuestra la presencia de fracciones de isoenzimas termolábiles y termoresistentes de un mismo compuesto enzimático.

En el caso de repollitos de Bruselas la presencia de datos cinéticos relacionados con la inactivación de POD es escasa en literatura. La determinación de la AE de la POD se fundamenta en elaborar un sustrato reductor que cuente con una alta velocidad de catálisis, entre los compuestos que se puede usar se destaca el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), fenol, guayacol, pirogalol, catecol, 4-metilcatecol, 4-hidroxianisol, p-cresol, p-clorofenol o 4-aminoantipirina. Inicialmente la AE de la POD se expresó en unidades basadas en la velocidad de oxidación de pirogalol; este método fue introducido por Willstalter y Stoll en 1918, sin embargo estudios posteriores demostraron que no era adecuado (Maehly y Chance 1954). Una amplia variedad de donantes de hidrógeno han sido utilizados en sistemas de ensayo de peroxidasa incluyendo compuestos potencialmente cancerígenos como o-dianisidina. Ponting y Joslyn (1948) usaron guayacol como sustrato para determinar actividad de POD. Masure y Campbell (1944) idearon un ensayo para la estimación de la POD en los vegetales utilizando guayacol como sustrato. Esta prueba ha sido ampliamente utilizada en la industria y procesamiento durante más de 30 años asegurando un adecuado grado de IE por lo tanto el Servicio de

Comercialización Agrícola de Estados Unidos (USDA) lo implantó como un método de control para establecer el grado de AE en los vegetales congelados.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar en los vegetales repollitos de Bruselas y Brócoli: a) las constantes cinéticas de reacción de las isoenzimas peroxidasa (POD) termolábil y termoresistente cuantificando la fracción inicial de cada enzima, b) determinar la energía de activación de la reacción en ambas isoenzimas. Estos resultados permitirán ser acoplados a los modelos numéricos de transferencia de energía para simular numéricamente la etapa de pre-cocción de los vegetales que luego se sometan a congelación

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Vegetales

Las muestras de los vegetales frescos con menos de dos días de recolección se adquirieron con productores locales de la zona rural de la ciudad de La Plata, provincia de Buenos Aires-Argentina. Las muestras de vegetales se analizaron teniendo en cuenta la época de cosecha de cada vegetal; el repollito de Bruselas comienza su época de consumo en otoño-invierno y el brócoli se cultiva y cosecha a lo largo de todo el año, siendo el pico de cosecha en la temporada invierno. Las muestras vegetales fueron llevadas al CIDCA (La Plata, Argentina) donde fueron seleccionadas, limpiadas y almacenadas con un máximo de 1 día en cámara a 4 ° C antes de su análisis.

Análisis Proximal

El análisis de la composición bioquímica proximal de los vegetales consistió en la determinación del contenido de humedad, proteína total, lípidos, carbohidratos y cenizas. El contenido de humedad se determinó mediante el método indirecto de secado de la muestra en estufa a 70°C y presión reducida de 100 mmHg hasta alcanzar un peso seco constante (AOAC 1990). El contenido de proteína cruda se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC 1990), utilizando un factor de conversión adecuado para estos vegetales (6,25). Los lípidos se determinaron utilizando el método Soxhlet empleando éter etílico (AOAC 1990). El contenido de cenizas se obtuvo mediante la calcinación de las muestras en mufla a 550°C durante 8 horas (AOAC 1990). El contenido de carbohidratos se asume como la diferencia entre el total (100%) y los demás componentes principales calculados.

Reactivos químicos y Buffer

Para el análisis de la AE de la POD se preparó un sustrato utilizando peróxido de hidrogeno (30% m/v), guayacol (99 % m/v) y buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5. El sistema buffer se tomó en referencia de Chen y Whitaker (1986). La extracción de la enzima previa al análisis de la AE se realizó con buffer de fosfato de potasio 0,2 M a pH 6,5. Estos buffer de fosfatos fueron preparados usando fosfato monopotásico y dipotásico.

Preparación del extracto enzimático

El extracto enzimático se preparó pesando 1,5 g de la muestra vegetal en balanza analítica, modelo AB204 (Mettler Toledo, Suiza) con 0,1 mg de precisión, luego fue desintegrada y homogeneizada (Equipo La Moulinette, modelo Dp800, Moulinex, Colombia). Luego se mezcló con 100 mL de buffer de fosfato 0,1 M pH 6,5 a 4 °C y se llevó a un Stomacher Labblender modelo 400 (Seward Medical Ltda., Inglaterra) durante 5 minutos; pasado el tiempo se filtró usando un lienzo. El filtrado fue centrifugado por 30 minutos a 4 °C y una velocidad de 18000 X g usando una centrífuga Beckman Avanti modelo J-25 (Beckman Instruments Inc., U.S.A) con un rotor JA-2550. El precipitado fue descartado filtrando con papel filtro cuantitativo. El filtrado que correspondía al extracto enzimático se colocó en tubos eppendorf de pequeño volumen (0,2 mL) los cuales se refrigeraron a 0°C. Las muestras preparadas para la evaluación de la actividad enzimática se criopreservaron inicialmente a -196°C y posteriormente se mantuvieron en cámara de -80°C hasta su análisis, estos no superaron las 48 horas almacenados en todos los casos.

Experimento de Inactivación

Los extractos contenidos en los tubos eppendorf se sumergieron en un baño termostático para el ensayo de inactivación térmica. Las temperaturas de ensayo fueron 75, 80 y 90°C, y los tiempos de extracción variaron entre 0 y 400 segundos con extracciones cada 10-20 segundos. A una temperatura fija del baño se retiraron las muestras a

distintos tiempos de calentamiento. Inmediatamente se enfriaron en un baño a 0°C para frenar el proceso térmico.

La utilización de tubos de bajo volumen (0,2 mL) y espesor de pared (<0,55 mm) permitió lograr un calentamiento rápido y uniforme. Las velocidades de calentamiento y enfriamiento se monitorearon mediante una termocupla tipo T dentro de los eppendorfs, en el baño termostático y en el baño de enfriamiento. Estas termocuplas se conectaron a un adquisidor que registraba la temperatura cada 2 s. En todos los casos las muestras tardaron menos de 30s en alcanzar la temperatura del fluido externo.

Determinación de la AE

Luego de ser inactivado el extracto, se analizó la AE según Morales *et al.* (2002) con modificaciones; tomando 0,120 mL del extracto el cual fue mezclado con 3,5 mL del sustrato. El sustrato se formuló con 0,1 mL de peróxido de hidrogeno (30% m/v), 0,1 mL de guayacol (99 % m/v) completando el volumen a 100 mL con buffer de fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5. La actividad enzimática para los extractos enzimáticos inactivados se midió por duplicado en un espectrofotómetro Hitachi modelo U-1900 (Hitachi High-Technologies Corporation, Japón), también se midió la AE para los extractos frescos que no fueron sometidos a ningún tratamiento térmico. Las determinaciones se realizaron por sextuplicado; en todos los casos se usó como longitud de onda 470nm, monitoreando el cambio de la absorbancia durante 400 segundos. Debe tenerse en cuenta que una Unidad de Actividad Enzimática (U) es igual al cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (minuto).

La AE en % se obtiene al referir la actividad respecto a la actividad del vegetal fresco (U_0) x100.

Modelo Bifásico

Se tomó el modelo de Ling y Lund (1978) para analizar las cinéticas de inactivación enzimáticas de las dos fracciones de isoenzimas diferentes presentes en la POD (fracciones lábil y resistente); donde cada fracción sigue una cinética de reacción de primer orden. Este comportamiento se expresa matemáticamente como:

$$\% AE = \frac{Co_R \cdot e^{-k_R t} + Co_L \cdot e^{-k_L t}}{Co_R + Co_L} (1)$$

En la Ec.1 t es el tiempo de calentamiento a temperatura constante, Co_L y Co_R son las concentraciones iniciales de la isoenzima termolábil y termoresistente, y k_L y k_R son constantes de reacción de inactivación térmica. Según el método de Ling y Lund (1978) se realizaron dos simplificaciones; la primera consiste en que a tiempos largos de calentamiento toda la fracción lábil es inactivada (menos de un 1% de la isoenzima lábil queda activa). Por lo tanto de la Ec. 1 el término $e^{-k_L t}$ tiende a cero, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\% AE = \frac{Co_R}{Co_R + Co_L} e^{-k_R t} (2)$$

En la Ec. 2 se define la fracción porcentual de la isoenzima resistente α_R como:

$$\alpha_R = \frac{Co_R}{Co_R + Co_L} (3)$$

Por otro lado a cortos tiempos de calentamiento, la fracción resistente inactivada se consideró despreciable por lo tanto

en la Ec. 1 el término $e^{-k_R t}$ tiende a 1, obteniendo la expresión:

$$\% AE = \frac{Co_R + Co_L \cdot e^{-k_L t}}{Co_R + Co_L} = \alpha_R + \alpha_L \cdot e^{-k_L t} \quad (4)$$

Donde α_L es la fracción porcentual de la isoenzima lábil.

Energía de Activación

La energía de activación de las isoenzimas se calculó teniendo en cuenta las constantes de inactivación (k_R y k_L) determinada para cada una de las fracciones. Se asumió un comportamiento tipo Arrhenius:

$$k_R = ko_R \cdot e^{\frac{-E_{aR}}{R \cdot T}} \quad (5)$$

$$k_L = ko_L \cdot e^{\frac{-E_{aL}}{R \cdot T}} \quad (6)$$

Para obtener los datos de las energías de activación se regresionaron las Ecs. 2 y 4 considerando una k de referencia, que en este caso fue a 80°C

$$\ln(\% AE) = \ln(\alpha_R) - t \cdot k_{80^\circ C} \cdot e^{\frac{E_{aR}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353} \right)} \quad (7)$$

$$\ln(\% AE - \alpha_R) = \ln(\alpha_L) - t \cdot k_{80^\circ C} \cdot e^{\frac{E_{aL}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{353} \right)} \quad (8)$$

Análisis estadístico

Las constantes de reacción a cada temperatura se obtuvieron realizando una regresión en Origin 8.0 las Ecs. 1 y 2, utilizando las AE y los tiempos de inactivación. Las energías de activación se determinaron usando SYSTAT 12 en base a las Ecs. 7 y 8 utilizando los datos de AE a todos los tiempos y temperaturas de trabajo según las recomendaciones de Arabshahi y Lund (1984) con el objeto

de obtener un intervalo de confianza y error estándar adecuados. Todos los parámetros obtenidos mediante regresión no lineal se representan por su valor medio junto con desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Proximal

Los resultados del análisis de la composición bioquímica proximal de los vegetales crucíferos se muestran en la Tabla 1. Estos se compararon con valores obtenidos por la USDA (2014) obteniendo que los resultados conseguidos experimentalmente son similares en los dos casos.

Tabla 1. Resultados composición proximal con intervalos al 95% de confianza

COMPONENTE	BROCOLI	REPOLLITOS DE BRUSELA
Humedad	87,54% ± 0,015	83,54% ± 0,051
Proteína	3,16 % ± 0,014	3,20% ± 0,064
Lípidos	1,27 % ± 0,050	0,36 % ± 0,024
Cenizas	0,94 % ± 0,023	1,19 % ± 0,020
Carbohidratos	7,09%	11,76%

Actividad enzimática inicial

En la Tabla 2 se muestra la AE inicial de la POD para las dos crucíferas en diferentes unidades, para estos valores se tuvo en cuenta el contenido de proteína en el volumen del extracto ensayado (0,12 mL) es para el brócoli de 0,061 mg/mL $\pm 4,5 \times 10^{-4}$ y para el repollito de Bruselas 0,058 mg/mL $\pm 9,2 \times 10^{-4}$, para estos se tuvo como referencia el resultado de proteína de la Tabla 1.

Tabla 2. Resultados de las actividades iniciales de las dos crucíferas con intervalos al 95% de confianza

AE	BRÓCOLI	REPOLLITO DE BRUSELAS
Uo/mg materia seca presente en el extracto	0,359 $\pm 0,002$	0,457 $\pm 0,0007$
Uo/mL extracto enzima	0,714 $\pm 0,005$	1,130 $\pm 0,002$
Uo/mg proteína presente en el extracto	1,415 $\pm 0,009$	2,351 $\pm 0,004$

Uo =Unidad de Actividad Enzimática inicial; representa el cambio de la absorbancia por unidad de tiempo (minuto) en el vegetal crudo a t=0 (sin tratamiento térmico)

Cinéticas de inactivación térmica

Estudios de la cinética de inactivación térmica en crucíferas reportados en la literatura (Wang y Luh 1983, Powers *et al.* 1984, Günes y Bayındırh 1993) han mostrado que la POD en el rango de 70 a 100 °C presenta curvas bifásicas de inactivación, las cuales se deben a la presencia de isoenzimas con distinta estabilidad térmica. En el caso de repollitos de Bruselas y Brócoli los resultados obtenidos en el presente trabajo presentaron comportamientos bifásicos en los rangos de temperatura ensayados (75 a 90 °C).

En la Figura 1 se muestran las curvas de inactivación enzimática obtenidas para los dos vegetales.

Parámetros cinéticos y energías de activación

Los resultados muestran que el porcentaje de actividad enzimática (%AE) disminuye al aumentar la temperatura y el tiempo de tratamiento. Los parámetros cinéticos se determinaron para los dos vegetales, definiendo las constantes de reacción (k_R y k_L) para la fracción térmicamente resistente y la fracción lábil. En la Tabla 3 se pueden observar los valores de las constantes de inactivación enzimática a diferentes temperaturas para ambos vegetales.

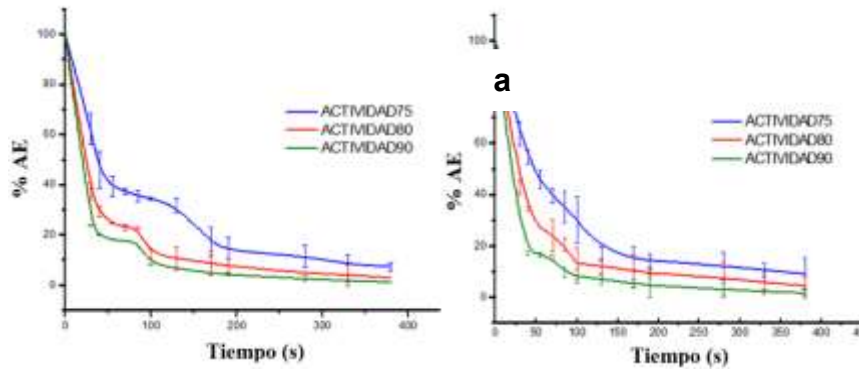


Figura 1. Curvas de inactivación enzimática para a) el repollito de Bruselas y b) brócoli a 75, 80 y 90°C

Tabla 3. Constantes cinéticas de inactivación enzimática de POD en repollitos de Bruselas y Brócoli para cada fracción termoresistente y termolábil

TEMPERATURA (°C)	REPOLLITO BRUSELAS		BRÓCOLI	
	k_R (s ⁻¹) (DE)	k_L (s ⁻¹) (DE)	k_R (s ⁻¹) (DE)	k_L (s ⁻¹) (DE)
75	$3,85 \times 10^{-3}$ ($3,64 \times 10^{-4}$)	$3,11 \times 10^{-2}$ ($2,04 \times 10^{-3}$)	$2,41 \times 10^{-3}$ ($1,32 \times 10^{-4}$)	$2,38 \times 10^{-2}$ ($8,96 \times 10^{-4}$)
80	$5,37 \times 10^{-3}$ ($1,52 \times 10^{-4}$)	$4,24 \times 10^{-2}$ ($4,21 \times 10^{-3}$)	$3,83 \times 10^{-3}$ ($1,94 \times 10^{-4}$)	$4,83 \times 10^{-2}$ ($4,57 \times 10^{-4}$)
90	$7,47 \times 10^{-3}$ ($2,43 \times 10^{-4}$)	$7,87 \times 10^{-2}$ ($1,792 \times 10^{-3}$)	$6,15 \times 10^{-3}$ ($1,79 \times 10^{-4}$)	$5,55 \times 10^{-2}$ ($9,30 \times 10^{-4}$)

Las energías de activación de cada una de las dos fracciones en los dos vegetales se determinaron en base a las E^b y 8. En la Tabla 4 se muestran los resultados de las energías de activación y la fracción inicial de enzima resistente (α_R) para los dos vegetales.

Tabla 4. Energías de activación y fracción inicial de enzima resistente (α_R) para los vegetales

	E_{aR} (J/mol) (DE)	E_{aL} (J/mol) (DE)	α_R % (DE)
Repollito Bruselas	$5,63 \times 10^4$ ($2,98 \times 10^3$)	$6,25 \times 10^4$ ($1,87 \times 10^3$)	25,019 (0,976)
Brócoli	$7,17 \times 10^4$ ($2,46 \times 10^3$)	$7,18 \times 10^4$ ($3,44 \times 10^3$)	21,160 (0,540)

Los resultados encontrados para el brócoli son similares a los reportados por Morales, *et al.* (2002); se debe resaltar que hasta el momento según las revisiones bibliográficas realizadas no existen valores de estos parámetros cinéticos para repollitos de Bruselas.

CONCLUSIONES

Se midieron experimentalmente las curvas de inactivación enzimática en repollitos de Bruselas y brócoli detectando un comportamiento bifásico con presencia de dos fracciones, una termolábil y otra termoresistente.

A partir de estos resultados se calcularon las constantes de inactivación de cada fracción en ambos vegetales y mediante regresiones no-lineales se pudieron calcular las energías de activación. Asimismo se determinó la fracción inicial de cada isoenzima en ambos vegetales y la composición proximal.

La determinación de la cinética de inactivación enzimática de POD en crucíferas es de importancia ya que estas permiten su acoplamiento a ecuaciones diferenciales de transferencia de energía para el cálculo de tiempos de procesamiento industrial. Estos modelos de simulación ayudan a la optimización de cada etapa del proceso, calentamiento y congelación, generando un producto alimenticio que cumpla con las condiciones mínimas de inactivación enzimática conservando los beneficios nutricionales y sensoriales para el consumo humano.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 1990. Official methods of analysis of association of official analytical chemist's 15th ed. Arlington VA, USA: K. Helrich. pag. 74.

Arabshahi,A y Lund,D.1984. Considerations in calculating kinetic parameters from experimental data. Journal of Food Process Engineering, 7: 239-251.

Bottcher, H. 1975. Enzyme activity and quality of frozen vegetables. Part I. The residual activity of peroxidase. Die Nahrung, 19:173.

Burnette, F. 1977. Peroxidase And Its Relationship To Food Flavor And Quality: A Review. Issue Journal of Food Science, 42, 1-6.

Campas, O. 2009. Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano). Archivos Latinoamericanos De Nutricion, 1(59): 95-100.

Chen AO, Whitaker JR. 1986. Purification and characterization of a lipoxygenase from immature English peas. J Agric Food Chem, 34(2): 203-211.

Lagrimini LM, V. J. 1993. Peroxidase overproduction in tomato; wound-induced poluphenol deposition and disease resistance. HortScr, 28: 218-221.

Ling A, Lund D. 1978. Determining kinetic parameter for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. J Food Sci, 43(4): 1307-1310.

Maehly, A., y Chance, B. 1966. The Assay of Catalases and Peroxidases, *Methods Biochem Anal* 1, 357, 1954

Masure, M.P. y Campbell, H. 1944. Rapid estimation of peroxidase in vegetable extracts-An index of blanching adequacy for frozen vegetables. *Fruit Prod. J. Am. Food. Manuf*, 23(12): 369.

Morales-Blancas E.F., Chandia V.E., y Cisneros-Zevallos L., 2002. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. *Journal of Food Science*, 67, (1): 146-154.

Müftügil, N. 1985. The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *Journal Science Food agric*, 36: 887-880.

Ponting, J.D. y Joslyn, M.A. 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.* 19: 47.

Powers JR, Costello MJ, Leung HK. 1984. Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities. *J Food Sci*, 49(6):1618-1619

USDA-Agricultural Research Service. 2014
.http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/nut_search_new.pl

Viña S.Z., Olivera D.F., Marani C.M., Ferreyra R.M., Mugridge A., Chaves A.R., Mascheroni R.H. 2007. Quality of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. gemmifera DC) as affected by blanching method. *Journal of Food Engineering*, 8:218–225.

Wang Z, Luh BS. 1983. Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J Food Sci*, 48(5):1412-1417, 1421.

Williams, D. C., Lim, M. H., Chen, A. O., Pangborn, R. M., y Whitaker, J. R. 1986. Blanching of vegetables for freezing – which indicator enzyme to choose. *Food Technology*, 40(6): 130–140.

Willstalter, R. y Stoll, A. 1918. The iron enzymes. In "Chemistry and Methods of Enzymes," 2nd Ed. New York: AcademicPress, pag. 201.

Agradecimientos

Los autores agradecen las contribuciones recibidas del CONICET, Universidad Nacional de La Plata, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)- ARGENTINA.

COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINOS TINTOS REGIONALES

Pérez N.P.¹, Di Carlo B.M.¹, Gómez de Díaz R.¹, Salomón R.², Moyano F.¹, Peñaranda S.S.¹, Zerpa G.¹

1: Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Argentina

2: Universidad Nacional de Salta, Facultad de Ingeniería, Argentina.

berta@unsa.edu.ar

Resumen: Los compuestos fenólicos dependen de la variedad de la uva y de las prácticas de cultivo. Se determinó el contenido total de fenoles en vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta, variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu; antocianos totales por variación del pH del medio y taninos totales por la técnica de Masquelier. Los resultados promedios fueron: fenoles totales 874 a 1160 mg/L ácido gálico; 2,15 a 3,24 g/L de taninos totales y 430 a 556 mg/L para antocianos. Los máximos valores de estos compuestos se registraron para el varietal *Cabernet Sauvignon* con un contenido fenólico de 1160 mg/L ácido gálico; siguiendo en orden de valores de 1015 mg/L, 921 mg/L y 874 mg/L ácido gálico para las variedades *Malbec*, *Tannat* y *Syrah*, respectivamente. Los contenidos de antocianos y taninos, relacionados con el color y añejamiento del vino, registraron mayores valores para *Malbec* con 2,83 g/L de taninos y 530 mg/L de antocianos y para los vinos *Cabernet*, con valores de 3,24 g/L y 556 mg/L, indicando que éste último

varietal presenta mejor contenido de polifenoles. La variabilidad en los resultados depende de la madurez de las uvas, las técnicas de vinificación y conservación de los vinos.

Palabras claves: vinos tintos, polifenoles, antocianos, taninos.

Abstract: The phenolic compounds in red wines are correlated with their grape variety and cultivation practices. We determined the total phenol content in red wines from Calchaquíes Valleys, Salta, in *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* and *Syrah* variety using the technique of Folin-Ciocalteu; by analysis of total anthocyanin with pH variation and total tanins according to the Masquelier technique. The results showed a total phenol contents between 874 to 1160 mg/L galic acid; total tannin values of 2.15 to 3.24 g/L and anthocyanin content of 430 to 556 mg/L. The *Cabernet Sauvignon* variety wine is the most phenolic degree (1160 mg/l galic acid). The growing order of the others is *Malbec*, *Tannat* and *Syrah* with values of 1015 mg/L, 921 mg/L and 874 mg/L. The maximum values of anthocyanin and tannin were 2.83 g/L, 3.24 g/L and 539 mg/L, 556 mg/L for *Malbec* and *Cabernet Sauvignon* variety, respectively. The variation of results depends of ripened grapes, winemaking and conservation of the wines.

Keywords: red wines, polyphenol, anthocyanin, tannin.

INTRODUCCIÓN

En los vinos tintos los compuestos fenólicos contribuyen a las características organolépticas del vino y le proporcionan propiedades antioxidantes. Las sustancias fenólicas pertenecen a dos familias principales: flavonoides y no flavonoides, entre los primeros los mejor representados son los flavonoles, los flavanoles (catequinas y proantocianidinas) y los antocianos. En un vino joven, los flavonoides se encuentran en forma de dímeros o trímeros, mientras que, en vinos más envejecidos los encontramos como polímeros de ocho a diez o más unidades. En general, los flavonoides caracterizan a los vinos tintos, constituyendo más del 85% de su contenido fenólico (Jackson 2000). Las principales sustancias fenólicas encontradas en los vinos son el ácido cafeico, epicatequina, catequina, ácido gálico, cianidina, malvidina-3-glucósido, rutina, miricetina, quercetina, resveratrol. Los flavonoles se encuentran como monoglucósidos del kaempferol, de la quercetina y la miricetina, además también como monoglucuronósido de la quercetina y se hidrolizan fácilmente dando principalmente estas tres agliconas en estado libre (Frankel *et al.* 1995, Simonetti *et al.* 1997, Ghiselli *et al.* 1998).

Los compuestos fenólicos afectan la apariencia, sabor, aroma y color de los vinos tintos, determinando sus características particulares y de calidad. Generalmente, la composición fenólica de los vinos depende de varios factores como la variedad de las uvas, las características del suelo, el clima, las prácticas agronómicas, el proceso de elaboración y el añejamiento (Durán y Trujillo 2008).

Estudios epidemiológicos realizados por De Ruvo *et al.* (1992) y Youdin *et al.* (2002) indican que los hábitos alimenticios que incluyen el consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos pueden reducir la evolución de enfermedades neurovegetativas. Por lo tanto, el consumo regular y moderado de vino tinto, demostró ser una de las razones de estos efectos beneficiosos (Renaud y Ruf 1994, Orgogozo *et al.* 1997), existiendo evidencias que indican a los polifenoles como responsables de la actividad antioxidante (Frankel *et al.* 1993).

La riqueza en polifenoles (principalmente antocianos) es un factor preponderante en el establecimiento de la demanda y el precio de los vinos comercializados a granel, que llegan hasta duplicar su precio cuando los contenidos de antocianos son elevados, ya que poseen gran aptitud para los cortes. En el caso de los vinos tintos jóvenes, su color se debe principalmente a las antocianinas que provienen de la piel de las uvas, a sus glucósidos y a sus formas aciladas (Sommers *et al.* 1977, Ribéreau-Gayon *et al.* 1983).

El objetivo de éste trabajo fue cuantificar los compuestos fenólicos de vinos tintos provenientes de los Valles Calchaquíes, zona que comprende los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi de la provincia de Salta, donde existen 26 bodegas que elaboran vinos tintos varietales *Cabernet Sauvignon*, *Malbec*, *Syrah* y *Tannat*. Es de importancia esta caracterización fenólica, dado que el contenido y clase de estos compuestos depende de la variedad de la uva, dando la tipicidad a cada vino tinto respecto a su color y características organolépticas, las cuales inciden en su calidad y valor de comercialización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 18 muestras de vino adquiridas en el mercado local. Las variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah* fueron evaluadas mediante el análisis de compuestos fenólicos totales a través de la técnica de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a Singleton y Rossi (1965), por medición de la absorbancia a 700 nm, determinando los mg/L con una curva patrón de ácido gálico. Los antocianos totales se determinaron por variación del pH del medio según la técnica Paronetto (1977), por medición a 520 nm de la diferencia de absorbancia a pH 0,6 y 3,5. Los taninos totales se evaluaron por la técnica de Masquelier (Ribéreu-Gayon *et al.* 2006), por medición espectrofotométrica a 550 nm de los antocianos formados a partir de los taninos condensados a 100 °C en medio ácido.

Para el análisis estadístico se empleó el análisis de la varianza, el test de Tukey para comparar medias y el análisis de componentes principales mediante el programa estadístico InfoStat, 2008.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de polifenoles totales promedio encontrado en los vinos tintos fue entre 874 a 1160 mg/L ácido gálico, como se puede observar en la **Figura 1**, con un máximo de contenido fenólico de 1160 mg/L ácido gálico para el varietal *Cabernet Sauvignon*; siguiendo en orden decreciente de valores las variedades *Malbec*, *Tannat* y *Syrah* con 1015 mg/L, 921 mg/L y 874 mg/L ácido gálico, respectivamente.

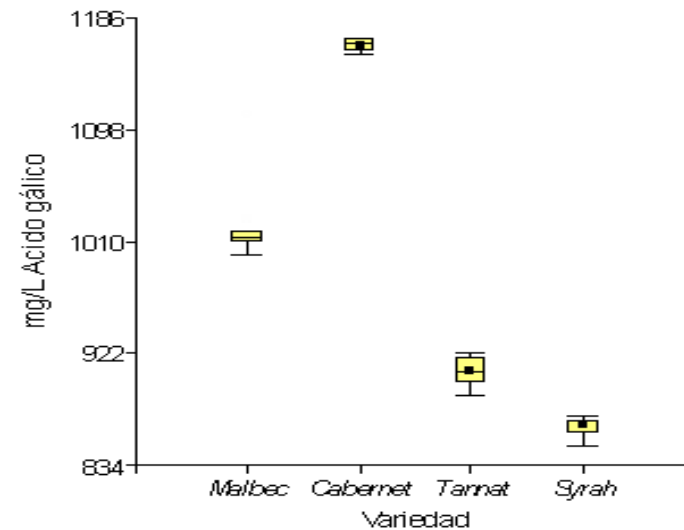


Figura 1: Contenido de fenoles totales en vinos regionales

Los polifenoles totales a nivel mundial en vinos tintos varían entre 1200 y 406 mg/L de ácido gálico, y en Argentina se determinaron valores entre 1100 a 2400 mg/L de ácido gálico en vinos tintos sanjuaninos y mendocinos. Esta variabilidad depende de la madurez de las uvas, las técnicas de vinificación y conservación de los vinos (Peynaud 1996, Durán y Trujillo 2008). Los valores polifenólicos encontrados en los vinos tintos de los Valles Calchaquíes son similares a los determinados en vinos tintos uruguayos, que presentaron valores promedios de hasta 1.100 mg/L, en los que se demostró que las variables cromáticas y composición fenólica están condicionadas por la edad del vino, dado que el tiempo de conservación y envejecimiento influye en la naturaleza de los pigmentos presentes (González Neves *et al.* 1997). Los polifenoles influyen en las características organolépticas de los

vinos tintos que son resultado del balance entre los aromas derivados de la uva, del pasaje por madera y de los taninos; éstos últimos enmascaran los aromas frutales produciendo vinos con un aroma particular de la variedad, vinos con excesivo aroma fenólico, vinos balanceados con taninos suficientes para ser guardados que a la vez retienen la frescura del aroma primario (Peynaud, 1996).

Los antocianos determinan el color rojo en el vino tinto, se encuentran como monoglucósidos, diglucósidos y derivados acilados de antocianidinas, entre los cuales el más importante es la malvidina, según trabajos reportados por Ghiselli *et al.* (1998), quienes al estudiar la capacidad antioxidante de las distintas fracciones polifenólicas del vino sugirieron que las antocianinas tendrían un papel importante en la actividad antioxidante total. A medida que se va añejando el vino tinto, van disminuyendo los pigmentos rojos por hidrólisis de los antocianos que son inestables, que por otro lado se condensan con los taninos. En función de esto, se determinó el contenido promedio de taninos totales, el cual fue de 2,15 a 3,24 g/L y el contenido promedio de antocianos, el cual fue de 430 a 556 mg/L, como se puede observar en la **Tabla 1**. Los pigmentos antociánicos son los compuestos más importantes en las uvas y los vinos, debido a su participación en las características sensoriales de los mismos (Blouin *et al.* 2000).

Tabla 1. Compuestos fenólicos de los vinos tintos regionales

Resultados promedios	Variedades de vinos tintos			
	<i>Syrah</i>	<i>Tannat</i>	<i>Malbec</i>	<i>Cabernet Sauvignon</i>
Fenoles totales (mg/L ácido gálico)	874±9,8 ^a	921±10,3 ^b	1015±8,1 ^c	1160± 7,3 ^d
Taninos totales (g/L)	2,15±0,04 ^a	2,48± 0,05 ^b	2,83±0,03 ^c	3,24± 0,03 ^d
Antocianos (mg/L)	430±6,3 ^a	458± 7,8 ^b	530±5,3 ^c	556± 6,9 ^d

Letras diferentes por fila son diferencias significativas por test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Los contenidos de antocianos y taninos, relacionados con el color y añejamiento del vino, como se pueden observar en las **Figuras 2 y 3**, registraron mayores valores para *Malbec* con 2,83 g/L de taninos y 530 mg/L de antocianos y para los vinos *Cabernet*, con valores de 3,24 g/L y 556 mg/L, indicando que éste último varietal presenta mejores características polifenólicas. Esta variabilidad depende de la madurez de las uvas, las técnicas de vinificación y conservación de los vinos. Los valores de taninos son similares a los encontrados por Durán y Trujillo (2008), en vinos tintos chilenos de 3g/L; mientras que los valores de antocianos son superiores a los determinados en vinos tintos finos argentinos de Mendoza y San Juan, con un contenido promedio de 470 mg/L (Camussoni y Carnevali, 2004). Los taninos son más abundantes en los vinos tintos, cuando en el proceso de vinificación el tiempo de remontado es más prolongado, por lo que se aconseja para obtener vinos menos astringentes, acortar el tiempo de remontado aumentando su frecuencia (García *et al.* 1997). Con el objeto

de completar los estudios anteriores, se realizó un Análisis de Componentes principales, (**Figura 4**).

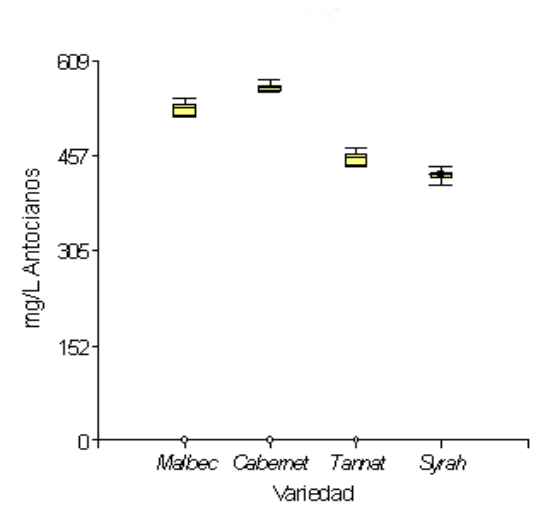
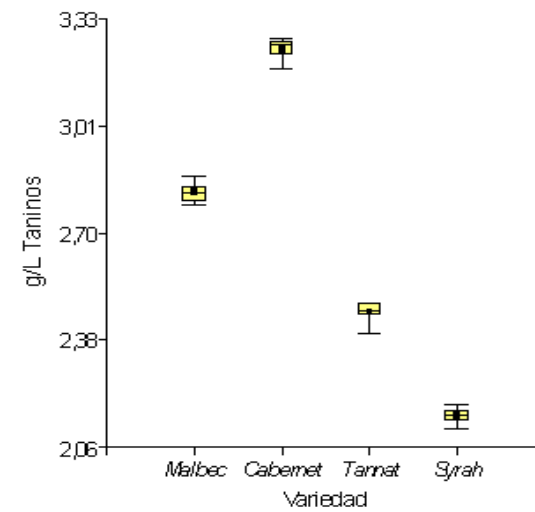


Figura 2: Taninos en vinos regionales
Figura 3: Antocianos en vinos regionales

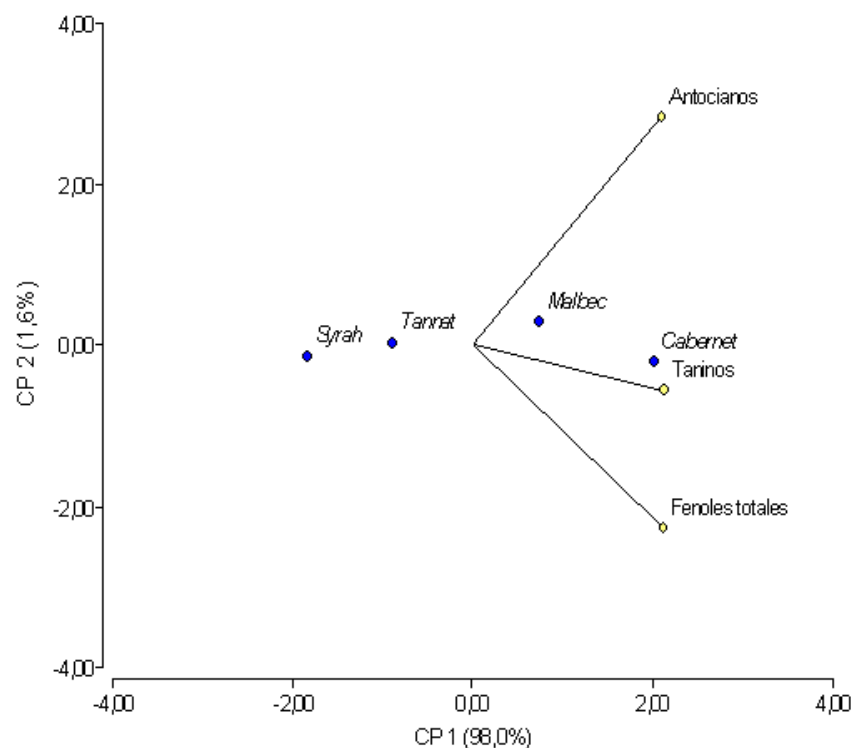


Figura 4: Análisis de compuestos fenólicos en vinos tintos regionales, variedades *Syrah*, *Tannat*, *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*.

En el gráfico se observa que la componente 1 participa con el 98 % y la componente 2 con el 1,6 %, explicando ambas componentes el 99,6 % de la variabilidad total en los resultados. Se determinó la asociación de los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* con los mayores

valores de antocianos, taninos y fenoles totales que proveen buen color y contenido fenólico a estos varietales. Por otra parte, se observa que los varietales *Syrah* y *Tannat* se encuentran asociados con menores valores fenólicos. Esto es confirmado por los valores de autovectores e_1 y e_2 , fueron de 0,58 y -0,15 para los taninos, con valores de 0,58 y -0,62 para fenoles totales; mientras que, para antocianos registraron valores positivos de 0,57 y 0,77, respectivamente.

De éste análisis multivariado de componentes principales, se puede visualizar que los varietales *Malbec* y *Cabernet* presentan mejores características polifenólicas, características de importancia si consideramos la capacidad antioxidante de éstos compuestos para el organismo, siempre que se realice un consumo moderado. Así, se ha demostrado que los constituyentes fenólicos de los vinos tintos, en ensayos in vitro inhiben la susceptibilidad de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) a la oxidación, causantes de lesiones vasculares arterioescleróticas. También, se han descrito efectos protectores en patologías como diabetes, cáncer, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, inflamaciones y hasta acción antialérgica (Martínez-Flores *et al*, 2002).

Los resultados demuestran que los varietales jóvenes tintos analizados poseen buen contenido fenólico, siendo el *Cabernet Sauvignon* la variedad de vino tinto con mejor contenido fenólico, además de ser la variedad tinta de mayor producción en la zona vitivinícola de los Valles Calchaquíes, siguiendo en orden de importancia el varietal *Malbec*.

La cuantificación de polifenoles es de importancia, tanto en los vinos como en las uvas, ya que esta variará con el índice de maduración del fruto y con el manejo del viñedo. Existen evidencias que indican que vinos procedentes de uvas de la misma parcela y de diferentes momentos de vendimia,

presentan diferencias importantes en la intensidad colorante y el índice polifenólico total, siendo el color de mejor calidad en uvas maduras que en uvas sobremaduras o poco maduras (Pardo Minguez, 2002). Además, se ha encontrado que los vinos tintos jóvenes, de 1 ó 2 años de añejamiento, tienen mayor contenido fenólico que los vinos más viejos, lo que los hace química y sensorialmente muy complejos y con frecuencia muy diferentes. Estas diferencias determinan, muchas veces, la preferencia en su consumo por los degustadores (Guerra y Rosier, 1998). Los compuestos fenólicos son la causa principal de la diferencia en el color de los varietales, Asselin y Ballester (1992) reportaron que el color y la estructura polifenólica encontrada en las diferentes variedades de uvas son fundamentales para la definición de criterios de calidad organoléptica de los vinos tintos.

CONCLUSIONES

Estos resultados contribuyen a caracterizar los vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta. La cuantificación de sus compuestos fenólicos, resulta de importancia para su calidad comercial, ya que le confieren características organolépticas y cromáticas que son específicas para los vinos de esta región del noroeste argentino.

El contenido de polifenoles de estos vinos contribuirá a la denominación de origen controlada en el futuro, además de proporcionar un valor agregado comercial para estos vinos.

BIBLIOGRAFÍA

Asselin C, Ballester FF. 1991. Une caractérisation polyphenolique des raisins et des vins de *Cabernet franc*. Progrés Agricole. Et Votov, 109: 415-420.

Blouin J, Papet N, Stonestreet E. 2000. Etude de la structure polyphenolique des raisins et des vins de *Cabernet franc*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 34: 33-40.

Camussoni G, Carnevali E. 2004. Determinación comparativa del contenido de polifenoles en vinos tintos de origen argentino. Invenio, 7,13:151-159.

De Ruvo C, Amodio R, Ageri S, Martelli N, Intilangelo A, D'Ancora GM, Esposito E. 2000. Nutritional antioxidants as antidegenerative agents. International Journal of Developmental Neuroscience, 18: 359-366.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Durán O, Trujillo N. 2008. Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados. Redalyc vitae, 15: 17-24.

Frankel E, Kanner J, German JB, Parks JE. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet, 341: 454-457.

Frankel EA, Waterhouse E, Teissedre P. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 890-894.

- García T, Pardo F, Martínez F. 1997. Influencia de la duración y frecuencia de los remontados en los parámetros de color de vinos tintos de uvas *Monastrell*. *Viticultura Enología Profesional*, 52: 5-13.
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 361-367.
- González Neves G, Barreiro Medina L, Bochicchio visintin R, Curbelo Marrero M, Gatto Pesce G, Gil Montoli G, Tessore Vidal A. 1997. Composición fenólica y color de vinos blancos, rosados y tintos de Uruguay. *Viticultura Enología Profesional*, 52: 14-20.
- Guerra C, Rosier JP. 1998. Sauvignon potentiel polyphenolique et quantitatif du raisin *Cabernet* de différentes origines géographiques dans le Sud du Brésil. *Proc. XXIII Congres Mondial. de la vigne et du Vin. II*: 27-32. Actas.
- Martínez Flores S, González-Gallego J, Culebras JM y Tuñón MJ. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria XVII*, 6: 271-278.
- Noriega Domínguez MJ, Casp Vanaclocha A. 2003. Caracterización polifenólica y cromática de vinos tintos jóvenes variedad Tempranillo de la D. O. Navarra. *Vitivinicultura Enología Profesional*, 88: 47-54.
- Orgogozo JM, Dartigues JF, Lafont S, Letenneur L, Commenges D, Salomón R, Renaud S, Breteler MB. 1997. Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux Area. *Revista de Neurología*, 3: 185-192.
- Pardo Minguez F. 2002. Valoración de la calidad de uvas tintas a la entrada de la bodega. Conferencia presentada en las XXIV Jornadas de Vitivinicultura y Enología. Tierra de Barros.
- Almendralejo 2002. Actas.
- Paronetto L. 1977. *Polifenoli e tecnica enologica*. Selepress. Milan.
- Peynaud E. 1996. *Balance in wine*. New York, USA: 2º Ed. John Wiley & Sons, Inc., pag 188.
- Renaud S, Ruf JC. 1994. The French paradox: vegetables or wine. *Circulation*, 90: 3118-3119.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudrad P, Ribéreau-Gayon P. 2006. *Ciencias y Técnicas del vino*. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pag 537.
- Ribéreau-Gayon P, Pontallier P, Glories Y. 1983. Some interpretations of colour changes in young red wines during their conservation. *Journal Science Food Agricultural*, 34: 505-516.
- Simonetti P, Pietta P, Tetolin G. 1997. Polyphenol Content and total antioxidant potential of selected Italian wines. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 45: 1152-1155.
- Singleton VL, Joseph A, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sommers C, Evans M. 1978. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "chemical age". *Journal Science of Food and Agriculture*, 28: 279-287.
- Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice Evans C. 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biology Chemistry*, 383: 503-519.

VALOR AGREGADO DE VINOS TINTOS DE LOS VALLES CALCHAQUÍES, SALTA, ARGENTINA

Pérez, NP⁽¹⁾, Di Carlo BM⁽¹⁾, Gómez de Díaz R⁽¹⁾, Salomón R⁽²⁾, Moyano F⁽¹⁾, Peñaranda SS,⁽¹⁾ , Zerpa G⁽¹⁾

1. Universidad Nacional de Salta, Consejo de Investigación, Facultad de Ciencias Exactas, Argentina

2. Facultad de Ingeniería, Argentina.

berta@unsa.edu.ar

Resumen: La calidad fisico-química del vino determina su valor agregado, siendo importante para una futura denominación de origen. El objetivo de éste trabajo es caracterizar físico-químicamente los vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta, Argentina. Se analizaron las variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, mediante técnicas de análisis del Instituto Nacional de Vitivinicultura para determinar azúcares, extracto seco, alcohol, acidez total y volátil, pH, densidad, anhídrido sulfuroso total y libre. Los resultados fisicoquímicos presentaron valores promedios de acidez de 3,66 a 4,12 g/L ácido tartárico; pH máximo de 3,7; extracto seco entre 19,2 y 27,2 g/L, azúcares entre 2,8 y 6 g/L, grado alcohólico máximo de 14; acidez volátil máxima de 0,65 g/L ácido acético y contenido de anhídrido sulfuroso total entre 29,7 y 92 mg/L siendo los mayores valores del libre 8,9 mg/L. Los varietales *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* registran los mayores valores de azúcares (6 y 5,39 g/L) y extracto seco (25 y 27,2 g/L), respectivamente. El varietal *Syrah* registró los

mayores valores de anhídrido sulfuroso total (91,96 mg/L) y libre (8,9 mg/L). Se concluye que los vinos tintos regionales poseen buen tenor alcohólico, considerable extracto seco, acidez, pH y contenido de anhídrido sulfuroso normales.

Palabras claves: vinos tintos, físico-química, Valles Calchaquíes.

Abstract: The physico-chemistry quality of the wine to attach great importance to the commercial value and future origin denomination. The objective of this work is to determine the physical and chemical characteristics of regional red wines from Calchaquies Valleys of Salta in Argentine. We analyzed red wines variety *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* and *Syrah*, using analysis techniques National Wine Institute to determine sugars, dry extract, alcohol, acidity, pH, density and sulfur dioxide. The results physicochemical showed acidity average values of 3.66 to 4.12 g / L tartaric acid, maximum pH 3.7, dry extract between 19.2 to 27.2 g / L, sugars between 2.8 g/L to 6 g/L, maximum alcohol content of 14, maximum volatile acidity of 0.65 g/L acetic acid and total sulfur dioxide content of between 29.7 to 92 mg/L being the highest values of free 8.9 / L. The *Malbec* and *Cabernet Sauvignon* variety have the maximum values of sugars (6 and 5.39 g/L) and dry extract (25 and 27.2 g/L) respectively. The *Syrah* variety showed the maximum values of total sulfur dioxide content (91.96 mg/L) and free (8.9 mg/L). These values indicate regional red wines with good alcohol content, significant solids and normal acidity, pH and sulfur dioxide.

Keywords : red wines, physico-chemistry, Calchaquíes Valley.

INTRODUCCIÓN

Argentina ocupa a nivel mundial el 8° lugar en el ranking de 2013 de la elaboración de vinos, con 11.778 miles de hectolitros. En el 2010 la vitivinicultura contribuyó en casi 14 mil millones de pesos al valor de la producción bruta del país. Mientras que las ventas al mercado interno fueron de 9,7 millones de litros cuyo equivalente en pesos es de 9 mil millones. Mendoza le aporta al producto bruto interno nacional en materia vitivinícola el 66%, mientras que San Juan el 28% y el resto de las provincias vitivinícolas el 6%, entre las que se encuentra la provincia de Salta. (INV, 2013)

Los Valles Calchaquíes en Salta, está integrado por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi, donde existen 26 bodegas con mas de 3.200 hectáreas de viñedos, siendo las de la localidad de Colomé las que están a mayor altura en todo el mundo, en 3.111 m sobre el nivel del mar, dando características propias a las uvas y vinos regionales. En Salta el 55,51 por ciento de la superficie sembrada está compuesta por las uvas tintas, siendo los varietales más difundidos *Cabernet Sauvignon* con el 44,8 %, seguido por *Malbec* con el 31,84 %, *Merlot* con el 7,7 %, *Syrah* con el 5,31 % y *Tannat* con el 5,24 %.

El vino contiene sustancias que forman el extracto, el sabor y el aroma, contiene un 75 a 90% de agua y etanol en un rango de 9 a 14%, que puede llegar hasta un 21% (Peynaud, 1996). Los azúcares que se pueden encontrar en el vino son principalmente glucosa y fructosa, y en menor proporción galactosa, manosa, celobiosa, rafinosa, arabinosa, xilosa y ribosa. La acidez titulable es una medida de los ácidos orgánicos del vino y representa la suma de los ácidos

valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada.

El vino presenta también compuestos que contienen azufre; el anhídrido sulfuroso aparece durante la fermentación de las uvas con alto contenido de azufre elemental, también tioles y tioésteres (Rapp y Mandery, 1986). Las sustancias fijas que constituyen el extracto del vino y el alcohol afectan la intensidad del aroma, dando características propias del flavor. El varietal Malbec se ha convertido en el típico vino tinto argentino, siendo necesario alcanzar por consenso criterios respecto de la madurez de la uva, maceración y períodos de añejamiento en botella y barrica.

Cada región vitivinícola está marcada por características propias, hay áreas con climas y suelos diferentes que favorecen el cultivo de varias cepas y la producción de amplia variedad de estilos de vinos, por ello es importante estudiar los compuestos químicos y parámetros físicos de los vinos tintos de los Valles Calchaquíes, de la provincia de Salta en Argentina.

Nuestro objetivo es estudiar las características fisico-químicas de los vinos regionales provenientes de bodegas de estos valles salteños; contribuyendo a aumentar su valor agregado, además de aportar datos que son exigidos para gestionar una futura denominación de origen, esta caracterización de los vinos es de importancia dado que cada región vitivinícola está marcada por características propias, con áreas que poseen climas y suelos diferentes que favorecen el cultivo de vinos con flavor, color y aroma que determinan su origen.

Materiales y Métodos

Se analizaron 18 muestras compradas en el mercado local, variedades *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*, *Tannat* y *Syrah*, mediante técnicas de análisis del Instituto Nacional de Vitivinicultura para determinar azúcares, extracto seco, alcohol, acidez, pH, densidad, anhídrido sulfuroso total y libre (INV, 2007). Se aplicó el análisis de la varianza a los resultados usando el test de Tukey para comparar medias y análisis de componentes principales mediante el programa estadístico InfoStat (2008).

Resultados y Discusión

Los resultados fisicoquímicos de los vinos tintos regionales arrojaron valores promedios de acidez de 3,66 a 4,12 g/L ácido tartárico con un pH máximo de 3,7; estos valores son normales en vinos tintos, lo mismo que el extracto seco que varió entre 19,2 y 27,2 g/L y los azúcares 2,8 y 6 g/L; indicando que se trata de variedades con buen cuerpo y acidez.

Desde el punto de vista químico, el vino es una solución hidroalcohólica que contiene varias sustancias que forman el extracto y dan sabor, y otras tantas sustancias volátiles que constituyen el aroma. En los vinos regionales analizados el contenido alcohólico varió entre 13 al 14 %v/v que indica un buen tenor de alcohol. La función principal de esta mezcla es la de ser el solvente del resto de los componentes; entre ellos, el metanol que es un producto de la hidrólisis de las pectinas con un contenido promedio de 100 mg/l, mayor en el vino tinto que en el blanco.

La acidez titulable es una medida de los ácidos orgánicos del vino y representa la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada.

Los ácidos más frecuentes en el vino son el tartárico, málico y láctico. Los primeros provienen de la uva, y el último se produce a partir de la fermentación del segundo por las bacterias lácticas. Otros ácidos minoritarios en el vino son el acético, cítrico, ascórbico, succínico, glucónico

En la tabla siguiente se observan los parámetros fisicoquímicos de los vinos provenientes de los Valles Calchaquíes de Salta, así el valor máximo fue del grado alcohólico fue 14% v/v para el varietal *Malbec*, mientras que la acidez volátil máxima registrada es de 0,65 g/L ácido acético y los contenidos de anhídrido sulfuroso total estuvieron entre 29,7 y 92 mg/L; en cuanto a los valores del anhídrido sulfuroso libre el máximo registrado fue de 8,9 mg/L para el varietal *Syrah* (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de los vinos tintos regionales

Datos fisicoquímicos Promedios	Variedades de vinos tintos			
	<i>Syrah</i>	<i>Tannat</i>	<i>Malbec</i>	<i>Cabernet Sauvignon</i>
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,12 ^a	3,98 ^b	3,66 ^c	4,11 ^d
Acidez volátil (g/L ácidoacético)	0,65 ^a	0,56 ^b	0,50 ^c	0,42 ^d
pH	3,7 ^a	3,7 ^a	3,65 ^b	3,7 ^a
Densidad	0,998 ^a	0,990 ^a	0,991 ^a	0,990 ^a
Extracto seco(g/L)	19,2 ^a	22,3 ^b	25 ^c	27,2 ^d
Azúcares (g/L)	2,9 ^a	2,9 ^a	6,0 ^a	5,39 ^a
Alcohol (%v/v)	13,0 ^a	13,0 ^a	14,0 ^b	13,9 ^c

Anhídrido Sulfuroso total (mg/L)	91,96 ^a	83,06 ^b	41,66 ^c	29,7 ^d
Anhídrido Sulfuroso libre (mg/L)	8,90 ^a	2,97 ^b	4,45 ^c	5,93 ^d

Letras diferentes por fila son diferencias significativas por test de Tukey ($p \leq 0,05$).

El extracto seco es un dato importante para caracterizar a un vino, dado que contribuye a ofrecer una apreciación de la naturaleza del vino tinto, porque determina el residuo fijo obtenido después de la evaporación de sustancias volátiles. El dulzor de un vino está relacionado con los azúcares reductores; el cuerpo con la densidad, el alcohol y el extracto seco y la acidez con los ácidos orgánicos. (Ribéreau-Gayon *et al*, 2006)

Los valores de pH, acidez total y extracto seco encontrados están entre los normales comparados con los valores obtenidos en vinos mendocinos (Catania, 2005), con considerable contenido de sólidos, que le otorgan cuerpo al vino tinto, además de los azúcares que le proporcionan el dulzor.

Gawel (1998) afirmó que el vino contiene varias clases de sustancias que contribuyen a la viscosidad, entre ellas el etanol, el glicerol, los polisacáridos, los monosacáridos y los azúcares reductores. Gawel *et al*. (2007) determinaron que el incremento del nivel de alcohol se traduce en un leve incremento del cuerpo en vinos modelo.

Los varietales *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* registran los mayores valores de azúcares (6 y 5,39 g/L) y extracto seco (25 y 27,2 g/L), respectivamente, indicando que estos varietales son los que poseen mayor cuerpo y sensación de completud.

Por otro lado, se observa que las variedades de vinos tintos *Syrah* y *Malbec*, presentaron los mismos valores de azúcares

totales (2,9 g/L), también los menores valores de extracto seco, de 19,2 % y 22,3 %, respectivamente.

Respecto a la acidez volátil no superaron los máximos de 2 g/L establecidos en el Código Alimentario Argentino, siendo los vinos de la variedad *Syrah*, los que presentan los mayores valores de ésta acidez con 0,65 g/L.

En los últimos tiempos la industria vitivinícola busca reducir el uso del anhídrido sulfuroso, dado que su oxidación progresiva con el tiempo aumenta la acidez del vino, que si se incrementa en exceso resulta poco beneficiosa para su calidad. Además, éste antiséptico ha sido reportado por algunos consumidores como fuente de alergias afectando la salud.

El anhídrido sulfuroso introducido en un vino se combina en pocas horas con los cuerpos de función carbonilo como etanal, azúcares, ácido pirúvico, etc. para formar el anhídrido sulfuroso combinado que se encuentra en equilibrio con el libre. La cantidad del anhídrido sulfuroso libre depende de la temperatura del vino, así se observó que incrementa en épocas de primavera y verano, además de relacionarse con la aireación del vino que aumenta notablemente su cantidad. (Peynaud, 1996)

El anhídrido sulfuroso combinado no protege al vino de alteraciones microbianas y resulta nefasto para el gusto del vino, que adquiere un sabor azufrado. Si bien es un auxiliar para el vinificador, debe ser usado con precaución para evitar aromas o gustos desagradables, o favorecer ciertos enturbiamientos durante la conservación. (Ribéreau-Gayón *et al*, 2006)

El vino tinto de la variedad *Syrah* posee los mayores contenidos de anhídrido sulfuroso total de 91,96 mg/L y libre de 8,9 mg/L, pero no supera los máximos establecidos por el

Código Alimentario Argentino (2010) de 20 mg/L en el valor del libre y 300 mg/L en el total. Los valores totales menores de éste compuesto químico lo registraron los vinos variedad *Cabernet Sauvignon*.

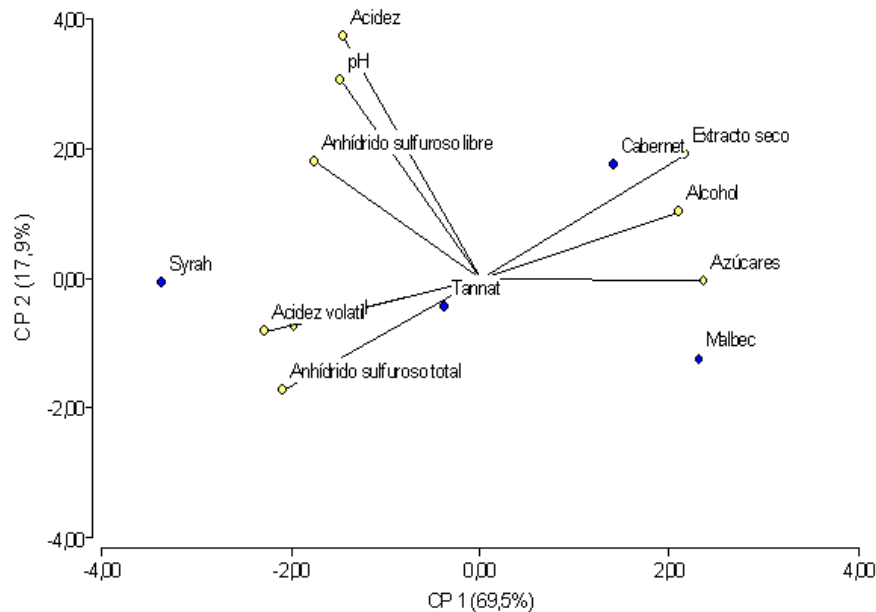


Figura 1. Valores fisicoquímicos de vinos tintos regionales, variedades *Syrah*, *Tannat*, *Malbec*, *Cabernet Sauvignon*

El análisis estadístico de componentes principales explica la variabilidad de los resultados, la cual es explicada en un 87,4% por las dos principales componentes del análisis multivariante; la componente 1 con el 69,5 % y la componente 2 el 17,9 %,

como se observa en la figura 1. Se observa la asociación de los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon* con los mayores valores de extracto seco, alcohol y azúcares, que proveen buen cuerpo y contenido alcohólico a estos varietales.

El extracto seco es un dato importante para caracterizar a un vino, dado que está relacionado con el cuerpo del vino tinto, mientras que los azúcares con el dulzor. También se vincula el cuerpo con la densidad y el contenido alcohólico, mientras que la acidez del vino está determinada por los ácidos orgánicos.

Por otra parte, los vinos de las variedades *Tannat* y *Syrah* se asocian con los mayores valores de acidez volátil de 0,56 y 0,65 g/L y de anhídrido sulfurosos total de 83,06 y 91,96 mg/L, respectivamente.

Las sustancias fijas que constituyen el extracto del vino también afectan la intensidad del aroma. El alcohol, puede tener un efecto supresor o intensificador de aromas. De esto también deriva un tipo de balance entre los aromas frutales y los aromas derivados de la uva, del pasaje por madera y de los taninos debido a los fenoles: los taninos enmascaran los aromas frutales; y puede haber, entonces, vinos con un aroma particular de la variedad, vinos con excesivo aroma fenólico, vinos balanceados con taninos suficientes para ser guardados que a la vez retienen la frescura del aroma primario (Peynaud, 1996).

En los Valles Calchaquíes, existen bodegas con pequeños volúmenes de producción, del orden de 500 mil litros, por lo que es importante el análisis físico-químico de los vinos regionales, para aumentar el valor agregado de estos vinos, que son producidos en un 70 % por la zona vitivinícola de Cafayate, favoreciendo su comercialización tanto a nivel

nacional como internacional. Los vinos tintos varietales analizados son vinos jóvenes, de un año de edad, con características cromáticas que presentan mayor proporción del color rojo que los vinos de mayor edad, con buena relación de calidad y precio, destinados al consumo diario y en el último tiempo están siendo preferidos por los consumidores más que los vinos más envejecidos de mayor precio en el mercado. En ésta zona vitivinícola, las bodegas destinan la mayor parte de la cosecha a la producción de vinos jóvenes satisfaciendo la demandas locales y recuperando a corto plazo la inversión realizada.

El reconocimiento de la calidad de vinos regionales, en base a sus características físico-químicas y sensoriales, es un primer paso para lograr la denominación de origen controlada (DOC), cumplimentando la ley 25.163 de normas para la designación y presentación de vinos y bebidas espirituosas de origen vínico, que exige para otorgar la DOC de una región, provincia, departamento, distrito, localidad o área del territorio nacional, que sea un producto originario con cualidades o características debidas al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos. Se aplica a vinos de variedades selectas, de calidad superior, producidos en una región diferenciada, cuya materia prima y elaboración, crianza y embotellado se realicen en la misma área de producción delimitada. La región de los Valles Calchaquíes, comprendida por los departamentos de Cafayate, San Carlos, Molinos (Colomé) y Cachi, puede lograr una DOC, por las características físico-químicas y sensoriales de sus vinos tintos, que les proporcionan una particular apariencia, sabor, color y sensación en boca, de acuerdo a su composición de extracto, alcohol, densidad, pH, acidez total y volátil.

CONCLUSIONES

Estos resultados contribuyen a caracterizar a los vinos tintos de los Valles Calchaquíes de Salta, siendo de importancia para determinar su calidad y valor agregado, también serán de utilidad para gestionar, en un futuro, la denominación de origen controlada. Los vinos tintos regionales poseen un buen tenor alcohólico, considerable extracto seco, acidez y pH normales, que proporcionan a los vinos un buen cuerpo y sensación de completud, especialmente en los vinos de las variedades *Malbec* y *Cabernet Sauvignon*. Este último varietal presentó los menores valores de anhídrido sulfuroso total de 29,7 mg/L, éste dato es de interés para consumidores que puedan tener reacciones alérgicas a éste antiséptico; mientras que el varietal *Syrah* registró los valores mayores tanto en el total como en el libre, pero en todos los vinos tintos regionales no se superaron los máximos permitidos para éste conservante. Se debe continuar analizando otros parámetros de importancia para la calidad de los vinos tintos, como son las sustancias fenólicas que son responsables de la tipicidad organoléptica y cromática de los éstos vinos.

BIBLIOGRAFÍA

- Catania CD. 2005. Influencia de distintos sistemas de maceración sobre el color, la composición polifenólica y las características organolépticas de vinos cv. *Merlot* de la zona alta del río Mendoza. Mendoza: INTA. Informe 03/18305. pag 18.
- Código Alimentario Argentino (CAA). 2010. Artículo 1104. Cap. XIII. <http://www.anmat.gov.ar>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M.y Robledo C.W. 2008. InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2007. Manual de Técnicas Analíticas. Mendoza: Instituto Nacional de Vitivinicultura. pag107.
- INV.2013.www.inv.gov.ar.
- Gawel R 1998. Red wine astringency: a review. Australia. Journal Grape Wine Research, 4: 74-95.
- Gawel R, Van Sluyter S, Waters EJ. 2007. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. Australia. Journal of Grape and Wine Research, 13, 38-45.
- Peynaud, E.1996. Balance in wine. New York, USA : 2º Ed. John Wiley & Sons, Inc., pag 188
- Rapp A, Mandery H.1986. Wine aroma. Experiencia, 42: 873-884.
- Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudrad P, Ribéreau- Gayon P. 2006. Ciencias y Técnicas del vino. Buenos Aires: Hemisferio Sur. pag 537.

PROPIEDADES REOLÓGICAS DE MASAS PANARIAS CON DISTINTOS PORCENTAJES DE SALES

Rodríguez De Marco E.¹, León A.E.¹, Steffolani M.E.¹

¹Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (CONICET-UNC). Córdoba, Argentina.
erodriguezdemarco@agro.unc.edu.ar

Palabras Clave: Masas panarias, Reología, Cloruro de Sodio, Cloruro de Potasio

Resumen: El objetivo fue evaluar el efecto del contenido de NaCl y el de su reemplazo por KCl sobre las propiedades reológicas de masas panarias. Se realizaron ensayos farinográficos; ensayos alveográficos; y se determinaron las propiedades viscoelásticas de masas de harina de trigo pan con distintas proporciones de NaCl, KCl, mezclas de ambas sales y sin sal. La reducción del contenido de NaCl aumentó la absorción de agua y disminuyó el tiempo de desarrollo y la estabilidad de las masas. Las masas presentaron una menor tenacidad a bajos porcentajes de NaCl y no se observó una tendencia clara del efecto del NaCl sobre la extensibilidad. El reemplazo de NaCl por KCl no produjo diferencias significativas en la absorción de agua y el tiempo de desarrollo, pero disminuyó significativamente la estabilidad y la tenacidad de las masas. Tanto la reducción de NaCl como el reemplazo por KCl, disminuyeron significativamente la componente viscosa (G'') y elástica (G') de las masas, pero la $\tan \delta$ no se vio afectada. Las modificaciones causaron un detrimento en las propiedades viscoelásticas de las masas, por

lo que se deberían agregar aditivos que mitiguen el deterioro de la calidad de las masas.

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the effect of the NaCl and their replacement by KCl on the viscoelastic properties of bread dough. Farinographic and alveographic tests were carried out, and viscoelastic properties were analysed on bread dough with different amounts of NaCl, KCl, mixed of both and without salt. The reduction of NaCl content increased water absorption and decreased development time and stability of the dough. Lower NaCl content reduced tenacity and any trend was observed in dough extensibility. The replacement of NaCl by KCl did not produce significantly differences in water absorption and development time, but significantly reduced dough stability and tenacity. The reduction of NaCl and their replacement by KCl significantly decreased G'' and G' of dough, but $\tan \delta$ was not affected. The modification in dough formulation produced a deterioration in viscoelastic properties and additives should be added to mitigate the deterioration in dough quality.

INTRODUCCIÓN

En Argentina, según datos del Ministerio de Salud de la Nación, el consumo de sal por persona por día es de aproximadamente 12 g, más del doble del recomendado por la OMS (5 g por día por persona). Es de amplio conocimiento que el consumo elevado de sodio (consumido como sal, cloruro de sodio -NaCl-) es la principal causa de aumento de la presión arterial, siendo la alta presión arterial un factor de riesgo importante para las enfermedades cardíacas coronarias y accidentes cerebrovasculares, tanto isquémicos como hemorrágicos. A su vez también, diversos estudios han demostrado que el consumo excesivo de sodio favorece la osteoporosis, la hipertrofia ventricular derecha, la obesidad, los cálculos renales, el cáncer de estómago, y puede estar vinculado a la gravedad del asma (He y MacGregor, 2009).

En este sentido, el NaCl es considerado como un constituyente no deseable en los alimentos y se llevan a cabo diversas campañas de reducción del consumo de sodio en todo el mundo. A nivel local, se han desarrollado programas impulsados por el Ministerio de Salud de la Nación, de concientización, entre los que se destaca la iniciativa "Menos sal, más vida" vigente desde el año 2010; la ley de reducción de sodio sancionada en Noviembre de 2013 y la campaña destinada a panaderos artesanales con el objetivo de reducir el contenido de sal en el pan. El consumo de productos de panificación en nuestro país es uno de los más altos del mundo y se estima que se consumen 200 g de pan por día por persona, lo que significa que el consumo de pan representa más del 25% del consumo total de sodio. En este sentido, las

modificaciones que se produzcan en la composición de este alimento tendrán una importante repercusión.

Si bien, el NaCl es importante en la percepción sensorial de los productos de panificación, no solo por impartir un sabor salado, sino también porque imparte un sabor dulce y enmascara los sabores metálicos y agrio (Miller y Hosney, 2008); la sal produce importantes cambios en las propiedades reológicas de las masas durante el proceso de elaboración, que determinan las características del producto final.

Las masas elaboradas a partir de harina de trigo son materiales visco elásticos y sus propiedades reológicas dependen de su composición y de las condiciones de proceso utilizadas en su elaboración (Rodríguez Sandoval et al., 2005). El comportamiento reológico de las masas se puede conocer a través de dos tipos de técnicas de medición: las de tipo fundamental y las de tipo empírico. Los métodos empíricos, como el farinógrafo, mixógrafo, extensógrafo, ofrecen información útil y práctica para la industria de la panadería y molinería; sin embargo no dan suficiente información para interpretar el comportamiento fundamental de la reología de la masa de trigo porque utilizan medidas arbitrarias propias de cada equipo (Rodríguez Sandoval et al., 2005). Mientras que para obtener parámetros característicos de las masas se llevan a cabo mediciones bajo condiciones controladas que no afectan en gran medida ni destruyen la estructura de la masa. Este es el caso de los experimentos dinámicos, que al efectuarse en estado no estacionario, generan datos que reflejan el comportamiento visco elástico de un material (Rodríguez Sandoval et al., 2005).

En estudios previos realizados con técnicas de reología empírica se observó un efecto reforzador del NaCl en las masas, aunque son estudios que datan de mucho tiempo

(Preston 1981; Hlynka 1962). Sin embargo por medio de ensayos de reología dinámica los resultados obtenidos fueron contradictorios. Algunos autores encontraron un aumento significativo de G' cuando se incorpora NaCl (Larsson, 2002), mientras que otros reportaron una disminución de G' con la incorporación de sal (Lynch 2009; Angioloni y Dalla-Rosa, 2004).

Pocas investigaciones se han llevado a cabo referente al estudio del efecto de otras sales en la reología de las masas y datan de mucho tiempo. No se encontraron grandes diferencias cuando se sustituyó parte de NaCl por KCl en los parámetros reológicos evaluados mediante técnicas empíricas (Lorenz 1971, Salovaara 1982, Kaur 2011). Estos resultados fueron atribuidos por los autores a las similitudes físicas y químicas que hay entre los iones. Sin embargo, no se hay antecedentes del efecto del reemplazo de NaCl por KCl en la masa evaluados mediante experimentos dinámicos.

El uso de KCl como reemplazante del NaCl en productos de panificación ha sido cuestionado debido a que se lo ha asociado a producir un sabor metálico y amargo en los productos de panificación. Salvoaara (1982) encontró que se podía reemplazar un 20% de NaCl por KCl sin que se produzcan diferencias sensoriales con el pan control, pero un 40% de reemplazo generaba un sabor indeseable que era apenas tolerable por los consumidores. En estudios recientes que llevamos a cabo determinamos el límite de detección de KCl en el pan, siendo de un 44.5% de sustitución de NaCl por KCl; y observamos que, cuando se reemplaza el 50% de NaCl por KCl, el pan fue considerado ligeramente agradable (Rodríguez De Marco et al., 2014). Estos resultados, sumado a los cambios de costumbres de la población y a la búsqueda por parte de los consumidos de alimentos más saludables a

pesar que éstos no satisfagan completamente sus expectativas sensoriales, abren nuevas posibilidades de formulación.

Para poder proponer alternativas que respondan a las necesidades actuales, es fundamental tener en claro los efectos del NaCl en el proceso de obtención de pan, como así también el efecto de los posibles sustituyentes, como es el caso del KCl. En este sentido, se planteó como objetivo evaluar el efecto del contenido de NaCl y el de su reemplazo por KCl sobre las propiedades reológicas empíricas y dinámicas de masas panarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó harina de trigo pan obtenida comercialmente (Graciela Real): Humedad: 12,97%; Cenizas: 0,71%; Proteínas: 14,29%; Lípidos: 1,03%; Hidratos de Carbono: 71%. El NaCl (Dos Anclas) y el KCl, fueron de grado alimenticio.

Métodos

Ensayos farinográficos

Se empleó un farinógrafo Brabender (C.W. Brabender Instruments, Inc., Alemania) y se siguió la metodología propuesta según el método 54-21 de la AACC (2002). Los ensayos farinográficos se llevaron a cabo con 0, 1 y 2% de NaCl y con las siguientes proporciones de NaCl:KCl: 1%:1% y 0%:2%. Se determinó la capacidad de absorción de agua, el tiempo de desarrollo y la estabilidad de las masas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Ensayos alveográficos: Se utilizó un Alveógrafo (Chopin, Francia) y se siguió la metodología propuesta según el método 54-30 de la AACC (2002) con algunas modificaciones. Se prepararon masas de harina de trigo y agua o con solución salina, siguiendo las siguientes proporciones: 2% NaCl, 1% NaCl, 1%:1% NaCl:KCl y 2% KCl. Se determinó la tenacidad (P), la extensibilidad (L), la relación entre ambas (P/L) y W. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Propiedades Viscoelásticas

Las propiedades visco-elásticas de las masas fueron medidas por medio de un reómetro RHEOPLUS/32 (Anton Paar, Germany), usando una geometría de platos paralelos de 25 mm (pp25); entre 0,03 y 100 Hz y dentro del rango de viscoelasticidad lineal (0,05% de deformación), éste último determinado experimentalmente al comenzar el ensayo. Por medio del software Rheoplus/32 V3.10 se calcularon los datos de G' , G'' y $\tan \delta$. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada una de las muestras, y las masas fueron elaboradas por duplicado para cada porcentaje de sal.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa INFOSTAT (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina). Todos los panes fueron elaborados por duplicado y se realizaron las determinaciones por triplicado. Los resultados se informaron como el valor promedio \pm la desviación estándar. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza y los resultados fueron comparados por el Método de la Mínima

Diferencia Significativa (LSD) de Fisher a un nivel de significación $< 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos farinográficos

Los parámetros farinográficos obtenidos se presentan en la **Tabla 1**. La reducción del NaCl aumentó significativamente la capacidad de la harina de trigo de absorber agua y disminuyó el tiempo de desarrollo y la estabilidad de la masa.

El efecto del NaCl sobre la capacidad de absorción de agua de la harina de trigo se debe a la competencia de los iones sodio y cloruro con las moléculas de agua sobre la superficie de las proteínas: los iones interactúan con las cadenas laterales de las proteínas y dificultan la absorción de agua por parte de la harina.

Las proteínas del gluten son las que determinan las propiedades físicas de una masa de harina de trigo. Los cambios que ocurren en la estructura y las propiedades de los sistemas proteicos como consecuencia de la incorporación de sales neutras, son atribuidos al efecto de las interacciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas. A bajas concentraciones de sal, como son los casos de estudio, el efecto que predomina son las interacciones electrostáticas entre los iones de la sal y los aminoácidos de la superficie de las proteínas (Preston, 1989).

Tabla 1. Parámetros Farinográficos

Muestra	Absorción de agua (%)	Tiempo de desarrollo de la masa (min)	Estabilidad de la masa (min)
<i>Reducción de NaCl</i>			
2%NaCl	58,9±0,2 ^a	13,9±1,1 ^c	18,3±0,2 ^c
1%NaCl	59,7±0,0 ^b	11,3±0,2 ^b	13,7±0,6 ^b
Sin NaCl	52,8±0,1 ^c	7,4±0,4 ^a	9,9±0,6 ^a
<i>Remplazo de NaCl por KCl</i>			
2%NaCl	58,9±0,2 ^a	13,9±1,1 ^a	18,2±0,2 ^b
1%NaCl:1%KCl	58,2±0,1 ^a	12,0±0,0 ^a	16,8±0,2 ^a
2%KCl	58,2±0,4 ^a	12,6±0,4 ^a	16,4±0,1 ^a

Letras diferentes en la misma columna, para cada clasificación, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

El desarrollo de la masa consiste en la hidratación de las proteínas y la formación de interacciones entre gluteninas y gliadinas (Belton, 1999). La masa panaria es un sistema de harina y agua, que se encuentra a pH 6. Bajo esta condición de pH, las proteínas del gluten presentan cargas positivas y se produce la repulsión electrostática entre ellas, haciendo que las proteínas se hidraten rápidamente (Miller y Hosney, 2008). Sin embargo, la repulsión electrostática mantiene a las cadenas de proteínas alejadas unas con otras, dificultando la

interacción entre gliadinas y gluteninas, lo que resulta en una masa más débil.

Bajos niveles de sal, enmascaran las cargas disminuyendo las repulsiones electrostáticas y permitiendo a las cadenas de proteínas aproximarse unas con otras. Esto hace que las proteínas se hidraten más lentamente y permite que las proteínas interactúen por medio de interacciones hidrofóbicas, resultando en un incremento de la estructura β -sheet entre las proteínas (Wellner et al., 2003) y la formación de grandes estructuras fibrilares que conducen a una masa más fuerte y con mayor estabilidad.

McCann y Day (2013) evaluaron la influencia del NaCl en el desarrollo de la masa por medio de microscopía confocal láser de barrido (MCLS) y observaron que, en ausencia de sal, la red de gluten comenzaba a formarse a los 2 min de mezclado y estaba completamente desarrollada a los 6 min, mientras que la muestra con 2% de sal mostró grandes hebras de proteínas a los 6 min y se desarrolló completamente cerca del tiempo final de mezclado (20 min). Con esto demostraron que la hidratación de las proteínas y el desarrollo de la matriz de gluten en la masa son más lentos en presencia de NaCl.

El reemplazo de NaCl por KCl en la elaboración de las masas no mostró diferencias significativas en la absorción de agua y el tiempo de desarrollo, resultados que coinciden con los expuestos por Salovaara (1982). Sin embargo, la estabilidad de la masa disminuyó significativamente cuando se utilizó KCl en la formulación. La estabilidad de la masa es un indicador de la tolerancia de la masa al mezclado. Salovaara (1982) utilizó diversas sales y observó un gran efecto del tipo de sal en la estabilidad de la masa. El KCl fue la sal que menor efecto tuvo en la estabilidad de la masa, disminuyéndola cuando se sustituyó un 20% de NaCl por KCl y produciendo un aumento

de la estabilidad cuando el porcentaje de sustitución fue del 40%.

Ensayos Alveográficos

A partir de las curvas alveográficas se obtuvieron los valores de tenacidad (P), extensibilidad (L), la relación entre ellos (P/L) y el área de la curva o fuerza de la masa (W) (**Tabla 2**). La tenacidad de la masa disminuyó conforme se redujo el contenido de NaCl, sin embargo no se observó una clara tendencia en la extensibilidad de la masa, siendo el mayor valor obtenido correspondiente a la muestra con 1% de NaCl. La relación entre dichos parámetros, nuevamente, no siguió una tendencia clara conforme se redujo el contenido de NaCl y el parámetro W disminuyó significativamente con menores contenidos de NaCl.

Tabla 2. Parámetros Alveográficos

Muestra	P	L	P/L	W
Reducción de NaCl				
2%NaCl	149,0±4,2 ^c	52,0±1,4 ^a	2,9±0,1 ^b	264,0±7,07 ^c
1%NaCl	133,0±7,1 ^b	60,0±1,4 ^b	2,2±0,2 ^a	232,0±12,7 ^b
Sin NaCl	121,5±3,5 ^a	47,5±2,1 ^a	2,6±0,2 ^{ab}	199,5±7,8 ^a
Reemplazo de NaCl por KCl				
2%NaCl	149,0±4,2 ^b	52,0±1,4 ^a	2,9±0,1 ^b	264±7 ^b
1%NaCl:1%KCl	148,0±1,4 ^b	53,0±4,2 ^a	2,8±0,3 ^{ab}	261±4 ^b

2%KCl	138,0±0,0 ^a	60,0±4,2 ^a	2,3±0,2 ^a	242±3 ^a
--------------	------------------------	-----------------------	----------------------	--------------------

Letras diferentes en la misma columna, para cada clasificación, indican diferencias significativas por el test de LSD-Fisher ($p \leq 0,05$).

Como se dijo anteriormente, la incorporación de sal en el sistema enmascara las cargas de las proteínas del gluten, reduciendo la repulsión electrostática entre ellas y facilitando su interacción. Esto se ve reflejado en los mayores valores de tenacidad de la masa en presencia de sal así como en los mayores valores del parámetro W.

En lo que respecta a la sustitución del NaCl por KCl, no se observaron diferencias significativas en la extensibilidad de la masa, sin embargo el reemplazo del 100% de NaCl por KCl causó una disminución significativa del valor P, P/L y W de las masas con respecto a las otras dos muestras ensayadas.

Reología dinámica

En la **Figura 1** se presentan los valores obtenidos para la componente elástica (G'), la componente viscosa (G'') y la $\tan \delta$, en todo el rango de frecuencias evaluado. En todas las muestras analizadas los valores de G' fueron superiores a los valores G'' en todo el rango de frecuencia, indicando un comportamiento visco-elástico de las masas con predominio de la componente elástica.

Tanto la reducción de NaCl, como su reemplazo por KCl, no produjeron cambios significativos en la viscoelasticidad de la masa ($\tan \delta$), pero si se disminuyeron significativamente el valor de los módulos G' y G'' , indicando una mayor

interacción entre las proteínas, lo que refuerza la red de gluten. .

La disminución del valor de los módulos con la reducción del contenido de NaCl coinciden con los resultados expuestos previamente por Larsson (2002) y Beck et al. (2012). Mayores valores de G' y G'' a mayor contenido de sal, estaría indicando una mayor agregación proteica, resultados que coinciden con los obtenidos por medio del uso de métodos empíricos. Sin embargo, estos resultados se contradicen con los encontrados por Lynch et al. (2009) y Angioloni y Dalla-Rosa (2004). Las variaciones observadas por los diferentes autores se pueden deber, por un lado, a la calidad y la cantidad de proteínas provenientes de la harina de trigo y, por otro lado, al contenido de almidón. Wu et al. (2006) en sus estudios reológicos de masas de noodles demostraron que el módulo elástico de masas elaboradas con harinas de diferente composición proteica presentaron una tendencia diferente a medida que se disminuyó el contenido de sal en el sistema.

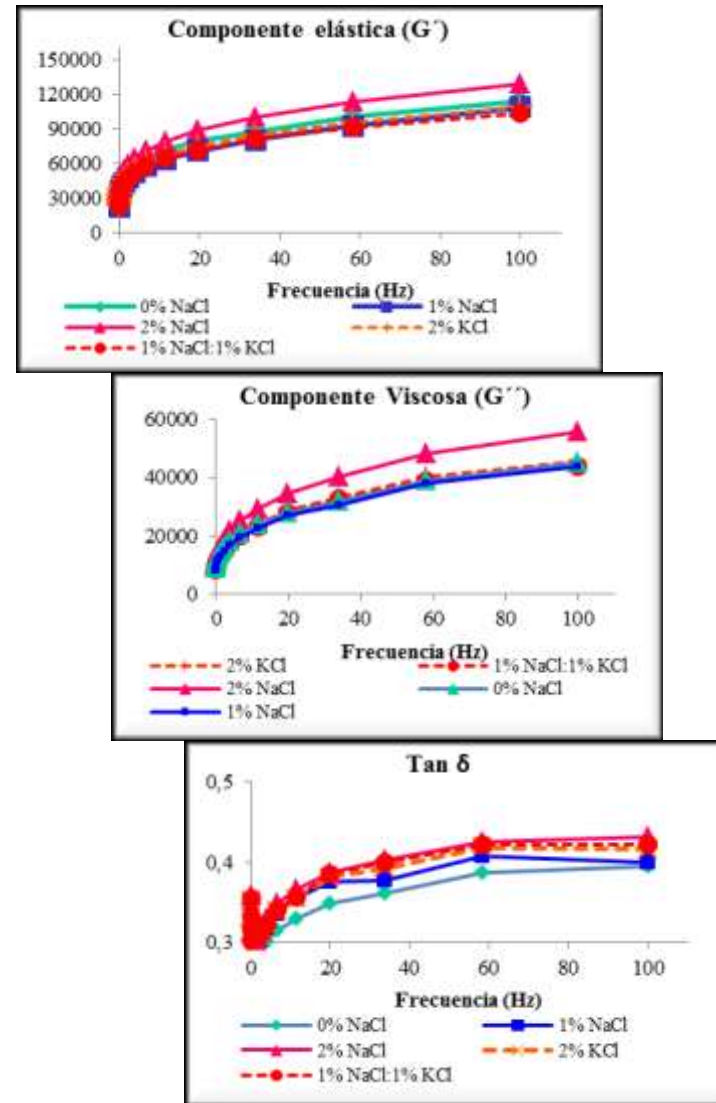


Figura 1. Reología Dinámica

CONCLUSIÓN

El NaCl cumple un rol esencial en el desarrollo y formación de la masa, y tanto su reducción como su reemplazo por KCl producen cambios en las propiedades físicas de la masa que impactan en las características del producto final. El uso de aditivos sería una buena alternativa para mitigar el deterioro de la masa por la ausencia o reducción de NaCl.

BIBLIOGRAFÍA

Angioloni A, y Dalla-Rosa M. 2004. Dough thermomechanical properties: influence of sodium chloride, mixing time and equipment. *Journal of Cereal Science*. 41: 327-331.

Beck M, Jekle M, Becker T. 2012. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast-leavened products. I. Rheological attributes. *Journal Science of Food Agriculture*. 92: 585-592

Belton P.S. 1999. On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science*. 29: 103-107.

He FJ y MacGregor GA. 2009. A Comprehensive Review on Salt and Health and Current Experience of Worldwide Salt Reduction programmes Salt and Health. *Journal of Human Hypertension*, 23: 363-384

Hlynka I. 1962. Influence of temperature, speed of mixing and salt on some rheological properties of dough in the farinograph. *Cereal Chemistry*. 39: 286-303.

Kaur A, Bala R, Singh B y Rehal J. 2011. Effect of Replacement of Sodium Chloride with Mineral Salts on Rheological Characteristic of Wheat Flour. *American Journal of Food Technology*, 6: 674-684.

Larsson H. 2002. Effect of pH and sodium chloride on wheat flour dough properties: ultracentrifugation and rheological measurements. *Cereal chemistry*. 79: 544-545.

Lorenz K, Bowman F y Maga J. 1971. Special dietary bread. *Bakers Dig.* 45(5):34

Lynch EJ, Dal Bello F, Sheehan EM, Cashman KD, Arendt EK. 2009. Fundamental studies on the reduction of salt on dough and bread characteristics. *Food Research International.* 42: 885-891.

Miller RA y Hosney RC. 2008. Role of salt in baking. *Cereal Food World,* 53: 4-6

McCann T y Day L. 2013. Effect of sodium chloride on gluten network formation, dough microstructure and rheology in relation to breadmaking. *Journal of Cereal Science.* doi:10.1016/j.jcs.2013.01.011.

Preston KR. 1981. Effects of neutral salts upon wheat protein properties. I. Relationship between the hydrophobic properties of gluten proteins and their extractability and turbidity in neutral salt. *Cereal Chemistry.* 58: 317-324.

Preston KR. 1989. Effects of Neutral Salts of the Lyotropic Series on the Physical Dough Properties of Canadian Red Spring Wheat Flour. *Cereal Chemistry.* 66: 144-148

Rodríguez De Marco E, León AE, Steffolani ME. 2014. Análisis sensorial de pan de molde reducido en sodio. V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2014.

Salovaara H. 1982 (1). Effect of Partial Sodium Chloride Replacement by Other Salts on Wheat Dough Rheology and Breadmaking. *Cereal Chemistry.* 59:422-426.

Salovaara H. 1982 (2). Sensory limitations to replacement of sodium with potassium and magnesium in bread. *Cereal Chemistry.* 59:427-430.

Wellner N, Bianchini D, Mills ENC, Belton PS. 2003. Effect of selected Hofmeister anion on the secondary structure and dynamics of wheat prolamins in gluten. *Cereal Chemistry.* 80: 596-600.

Wu J, Beta J y Clake H. 2006. Effects of salt and alkaline reagents on dynamic rheological properties of raw oriental wheat noodles. *Cereal Chemistry.* 83: 211-217.

EXTRACCIÓN CON MICROONDAS DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN CÁSCARA DE GIRASOL (*HELIANTHUS ANNUUS* L)

Rodríguez M. ¹, Nolasco S.M. ¹, Mascheroni R. ^{2,3}, Quintero Ramos A. ⁴

¹TECSE- Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Olavarría, Buenos Aires, Argentina.

²CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) (CONICET La Plata – UNLP), La Plata, Argentina

³MODIAL – Facultad de Ingeniería (UNLP), La Plata, Argentina

⁴Facultad de Ciencias Químicas – Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.

mariamarcelarodriguez@hotmail.com;
snolasco@fio.unicen.edu.ar

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar condiciones adecuadas (temperatura y tiempo) para la extracción asistida por microondas de compuestos antioxidantes de las cáscaras de diferentes híbridos de girasol, comparando rendimientos y actividad antioxidante. Para ello, se trabajó con cáscaras de cinco híbridos cultivados en Balcarce (Argentina): SyN 3840, SyN 3950, DK 4065, CF 201 y PAN 7077. Las extracciones se realizaron a 70 y 90°C durante 20

y 10 minutos, respectivamente, utilizando agua como solvente (relación muestra/solvente: 1/20) y una potencia de 600 W. En los extractos obtenidos se evaluaron, por técnicas espectrofotométricas, el contenido de fenoles totales, de flavonoides y la actividad antioxidante. Los fenoles totales estuvieron comprendidos entre $190,44 \pm 15,71$ y $439,89 \pm 32,21$ mg ácido gálico/100 g cáscara, los flavonoides variaron entre $112,24 \pm 8,08$ y $237,55 \pm 10,10$ mg catequina/100 g cáscara y la actividad antioxidante osciló de $29,05 \pm 2,24$ a $96,14 \pm 5,69$ $\mu\text{mol TE/g}$ cáscara. El tratamiento con microondas a 90°C durante 10 minutos permitió obtener valores significativamente mayores ($p \leq 0,05$) de fenoles totales y actividad antioxidante. Además, se detectaron diferencias significativas entre híbridos para fenoles totales ($p = 0,0327$) y actividad antioxidante ($p < 0,0001$). Los resultados de este estudio aportan una información valiosa relacionada con el otorgar valor agregado a un residuo de la industria aceitera.

Palabras clave: cáscaras de girasol, microondas, fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante.

Abstract

The objective was to determine appropriate conditions (temperature and time) for microwave assisted extraction of antioxidant compounds from the shells of different sunflower hybrids, comparing yields and antioxidant activity. To do this, we worked with five shells hybrids grown at Balcarce (Argentina): SyN 3840, SyN 3950, DK 4065, CF 201 and PAN 7077. The extractions were performed at 70 and 90°C for 20 and 10 minutes, respectively, using water as a solvent (ratio sample/solvent of 1/20) and a power of 600 W.

In the extracts obtained were evaluated by spectrophotometric techniques, the contents of total phenols, flavonoids and antioxidant activity. Total phenols were between 190.44 ± 15.71 and 439.89 ± 32.21 mg gallic acid/100 g hull, flavonoids ranged from 112.24 ± 8.08 and 237.55 ± 10.10 mg catechin/100 g hull and antioxidant activity ranged from 29.05 ± 2.24 to 96.14 ± 5.69 mol TE/g skin. Microwave treatment at 90°C for 10 minutes yielded significantly higher values ($p \leq 0.05$) of total phenolics and antioxidant activity. Furthermore, significant differences between hybrids for total phenols ($p = 0.0327$) and antioxidant activity ($p < 0.0001$) were detected. The results of this study provide valuable information regarding the great value to a residue of the oil industry.

Keywords: sunflower hull, microwave, total phenols, flavonoids, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

El grano de girasol (*Helianthus annuus* L) es una de las oleaginosas más importantes en el mundo (Karaaslan *et al.*, 2010; Hamed *et al.*, 2012; Karamać *et al.*, 2012) que se cultiva principalmente como fuente de aceite comestible. El grano está constituido por la pepa (75-80%), donde se sintetiza y acumula el aceite, y por la cáscara o pericarpio (20-25%) (De Leonardis *et al.*, 2005; Taha *et al.*, 2012). La cáscara contiene celulosa (31-51%), hemicelulosa (13-28%), lignina (20%), proteína (4-6%), ceniza (2-6%) y lípidos (5%, de los cuales hasta un 3% pueden ser ceras) (Cancalon, 1971; Taha *et al.*, 2012).

Los granos de girasol, previo al proceso de extracción de aceite, son parcialmente descascarados hasta alcanzar un rango de 10-12% de cáscara residual, lo que reduce el procesamiento de materia prima innecesaria y tiene efectos beneficiosos sobre la calidad del aceite crudo y la harina residual. Las ceras, provenientes de la cáscaras, cristalizan a bajas temperaturas produciendo turbiedad en el aceite extraído (Taha *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, en esta etapa del procesamiento de los granos, se origina una cantidad importante de residuo de bajo peso específico (aprox. 0,1 ton/m³) (Cancalon, 1971). Actualmente, las plantas aceiteras utilizan las cáscaras como combustible, quemándola en la caldera, con diferentes inconvenientes técnicos y económicos. El aprovechamiento de la cáscara de girasol es considerado industrialmente un problema de difícil solución.

Varios autores han reportado al grano de girasol como fuente importante de compuestos fenólicos (1-4% en peso,

flavonoides y ácidos fenólicos), siendo el ácido clorogénico el compuesto mayoritario (80% de los compuestos fenólicos) (Gotor *et al.*, 2007; Weis *et al.*, 2009; Žilic *et al.*, 2010; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2011; Hamed *et al.*, 2012; Karamać *et al.*, 2012), seguido del ácido caféico, cinámico, cumárico, ferúlico, sinápico e hidroxicinámico y cantidades inferiores de los ácidos vanílico, siríngico e hidroxibenzoico (Sripad *et al.*, 1982; Pedrosa *et al.*, 2000; De Leonardis *et al.*, 2005; Žilic *et al.*, 2010). Entre el 0,7-5,4 de los compuestos fenólicos presentes en el grano de girasol se localizan en la cáscara, lo que transforma a este residuo de la industria aceitera en una fuente potencial de compuestos bioactivos (Pedrosa *et al.*, 2000; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2011). El ácido clorogénico corresponde al grupo de los hidroxicinámicos, los cuales se destacan por su alto valor biológico, incluyendo propiedades antioxidantes (Žilic *et al.*, 2010), pero al mismo tiempo es responsable del pardeamiento indeseable y la reducción significativa en la disponibilidad y la digestibilidad de las proteínas de girasol (Pedrosa *et al.*, 2000; De Leonardis *et al.*, 2005; Weis *et al.*, 2009; Žilic *et al.*, 2010).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos poseen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y sus estructuras van desde una molécula fenólica sencilla hasta la de un polímero complejo de alto peso molecular (Balasundram *et al.*, 2006). De ellos, los ácidos fenólicos, los flavonoides y los taninos son los grupos más relevantes. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular (C₆-C₃-C₆), conformados por dos anillos de fenilos ligados a través de un anillo de pirano. Constituyen el grupo más numeroso, habiéndose identificado hasta la actualidad más de 5.000 flavonoides diferentes (Martínez-Flórez *et al.*, 2002; Balasundram *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos juegan

un rol importante en la pigmentación, crecimiento, reproducción, resistencia a patógenos y otra gama de propiedades fisiológicas, tales como antialergénicos, antiaterogénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, anti tromboticos, cardioprotectores y efectos vasodilatadores (Balasundram *et al.*, 2006; Taha *et al.*, 2012).

La calidad de los extractos polifenólicos y su actividad antioxidante depende tanto de la calidad de la materia prima (origen geográfico, condiciones climáticas, fecha de cosecha, condiciones de almacenamiento) como del método de extracción (Nkhili *et al.*, 2009). Además, la actividad antioxidante depende de la estructura química de los compuestos fenólicos, en particular del número y las posiciones de los grupos hidroxilos y de la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos, que se refleja en la capacidad para captar radicales libres o átomos de hidrógeno, donar electrones o quelar cationes metálicos (Taha *et al.*, 2012).

La eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos varía según el método empleado y las variables involucradas en el proceso. El método utilizado debe permitir la extracción completa de los compuestos de interés sin producir ninguna modificación química (Nihal *et al.*, 2006; Turkmen *et al.*, 2006). En general, las técnicas convencionales para su extracción emplean calentamiento, ebullición, soxhlet, extracción en frío y agitación mecánica, poseen baja eficiencia e involucran largos períodos de proceso (Nkhili *et al.*, 2009).

El interés actual por la salud ha estimulado el desarrollo de nuevos procesos para la extracción de los compuestos antioxidantes (Nkhili *et al.*, 2009). La extracción asistida por microondas es un novel proceso que emplea la energía de microondas para calentar los solventes y la muestra,

umentando la velocidad de transferencia de masa de los solutos desde la matriz de la muestra al interior del solvente. Además, presenta la ventaja de ser eficiente y rápido, lo que da lugar a un menor consumo de energía y solvente, permitiendo obtener extractos con mayor pureza comparado con otras técnicas convencionales (Pan *et al.*, 2003; Nkhili *et al.*, 2009). Se han realizado estudios referidos a la extracción de compuestos antioxidantes en semilla de girasol empleando diferentes solventes (agua, etanol, metanol y/o acetona), analizando distintas temperaturas, tiempos, pH y/o relación muestra/disolvente (Pedrosa *et al.*, 2000; De Leonardis *et al.*, 2005; Weisz *et al.*, 2009; Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2011; Hamed *et al.*, 2012; Karamać *et al.*, 2012 y Taha *et al.*, 2012), no habiéndose detectado investigaciones de extracciones asistida por microondas de estos compuestos a partir de cáscara de girasol.

El objetivo del trabajo fue determinar condiciones adecuadas (temperatura y tiempo) para la extracción asistida por microondas de compuestos antioxidantes de las cáscaras de diferentes híbridos de girasol, comparando rendimientos y actividad antioxidante.

Materiales y Métodos

Muestras

El trabajo de investigación se realizó con cáscara de cinco híbridos de girasol aceitero, provenientes de la ciudad de Balcarce, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Los híbridos empleados fueron: SyN 3840, SyN 3950 y DK 4065 (Syngenta), CF 201 (Advanta), PAN 7077 (Pannar), habiéndose separado las cáscaras de los granos en forma manual. Previo al trabajo

experimental, se realizó la molienda para reducir el tamaño de partícula y facilitar la extracción de los compuestos antioxidantes.

Extracción

La extracción de los compuestos antioxidantes se realizó en el equipo CEM (Microwave Enhanced Science, EEUU) (**Figura 1**). Para definir las variables de estudio se realizaron cinéticas de extracción de fenoles totales, utilizando el híbrido CF 201. Se plantearon dos condiciones experimentales de temperatura: 70 y 90°C, potencia de 600 W, solvente:agua, relación muestra/solvente: 1/20 y peso de la muestra: 1 g.



Figura 1: Equipo de microondas utilizado para la extracción de compuestos antioxidantes.

A partir de los resultados obtenidos del estudio cinético de extracción se definieron los tiempos adecuados para alcanzar la mayor extracción de fenoles totales a las dos temperaturas seleccionadas.

Las extracciones de los compuestos antioxidantes en las cáscaras de los cinco híbridos de girasol se realizaron por

duplicado mediante dos tratamientos seleccionados. Los extractos obtenidos fueron centrifugados y filtrados con papel de filtro, luego se almacenaron congelados (-18°C). Previo a la determinación, los extractos fueron descongelados, filtrados con filtros de 0,2 µm (30 MM SYR Filter PTFE) y centrifugados. Por métodos espectrofotométricos se analizaron los fenoles totales, los flavonoides y la actividad antioxidante.

Fenoles totales

La determinación de fenoles totales se efectuó empleando el equipo Espectrofotómetro Modelo Helios, Thermo electron corporation. Se realizó una curva de calibración con concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm de ácido gálico y la absorbancia se midió a 760 nm, mediante una regresión lineal simple se obtuvo la ecuación de la recta, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9921. La técnica consiste en adicionar a 3 mL de agua destilada 30 µL de cada estándar o muestra, 200 µL de Folin Ciocalteu y 600 µL de NaCO_3 (20% p/v).

Flavonoides

La técnica de cuantificación de flavonoides consiste en adicionar a 2 mL de agua destilada 500 µL de cada estándar o muestra, 120 µL de NaNO_2 (5% p/v) seguido de 6 min de reposo, 230 µL de ClAL_3 (10% p/v) seguido de 5 min de reposo y luego 780 µL de NaOH 1M. Asimismo, para dicha determinación se realizó una curva de calibración con concentraciones de 20, 40, 80, 120, 160 y 200 ppm de catequina y la absorbancia se midió a 510 nm, mediante una

regresión lineal simple se obtuvo la ecuación de la recta, con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,9998.

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante se midió en el equipo Varioskan flash, Thermo Scientific. El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mide la capacidad de una solución para inhibir la oxidación que generan los radicales libres. La medición de la oxidación se efectúa colocando los radicales libres (AAPH) (2,2'-azobis(2-amidino-propano) dihidrocloruro), la especie antioxidante y otra solución "víctima" (Fluoresceína), que es propensa a oxidarse. Además, es necesario comparar la oxidación de la solución que se está evaluando contra otra de capacidad antioxidante conocida, para esto, se debe realizar una curva de calibración con el estándar Trolox.

El equipo posee una placa que permite analizar, por triplicado, 18 muestras, un blanco y 5 estándares. La técnica consiste en adicionar a la placa 40 μ L de los estándares (4, 8, 16, 32 y 64 μ M de Trolox en buffer Fosfato), blanco (buffer Fosfato: 75 mM, pH de 7,4) o muestra en cada pozo. Luego, añadir 200 μ L de la solución de Fluoresceína (1,4 μ M en buffer Fosfato) e introducir la placa en el equipo Varioskan flash para una incubación de 20 min a 37°C. Luego se realizará la primera lectura de fluorescencia y será considerada como "Tiempo 0", a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 535 nm. Finalmente, se debe añadir 35 μ L de la solución de AAPH (0,32 M en buffer Fosfato) y comenzaran las lecturas de fluorescencia con intervalos de 1 minuto durante 1 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 2** exhibe la variación de la concentración de fenoles totales en función del tiempo para el híbrido CF 201, variando la temperatura de procesamiento. En la misma se puede observar que, la extracción asistida con microondas a 90°C permitió obtener valores superiores de fenoles, respecto al proceso realizado a 70°C. Asimismo, los valores máximos extracción fueron alcanzados a los 20 y 10 minutos, trabajando a 70 y 90°C, respectivamente.

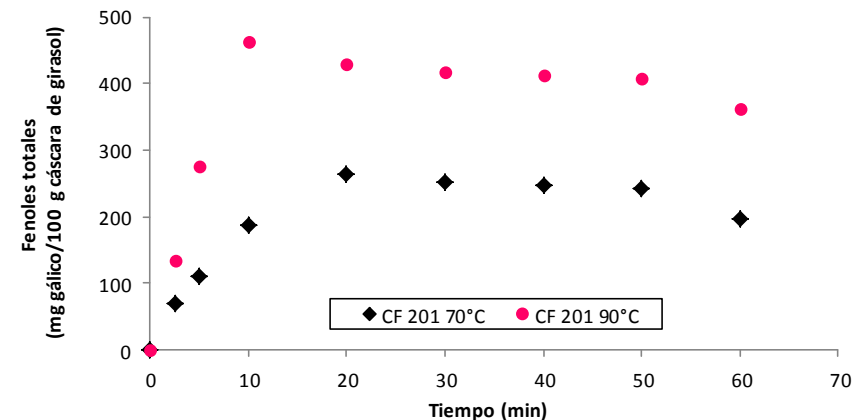


Figura 2: Cinética de extracción de fenoles totales de la cáscara del girasol CF 201, utilizando microondas a 600 W.

A partir estos resultados, se seleccionaron como condiciones adecuadas (temperatura y tiempo) para la extracción asistida por microondas de compuestos antioxidantes de las cáscaras

de diferentes híbridos de girasol: 70 y 90°C durante 20 y 10 minutos, respectivamente.

Fenoles totales

La **Figura 3** muestra el contenido de fenoles totales (mg de ácido gálico/100 g de cáscara de girasol) en la cáscara de cinco híbridos de girasol, utilizando temperatura de extracción con microondas de 70 y 90°C durante 20 y 10 minutos, respectivamente.

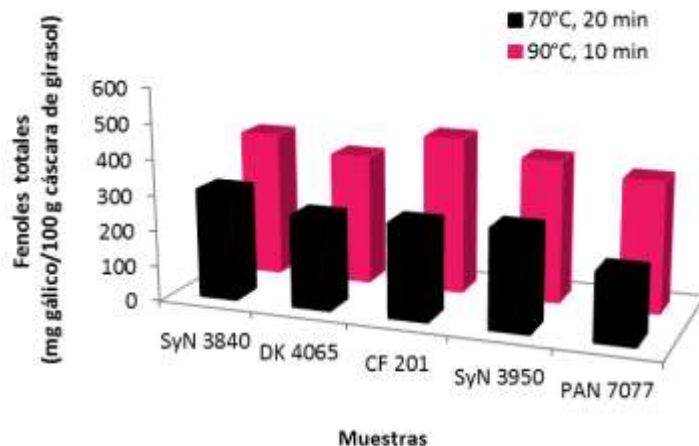


Figura 3: Concentración de fenoles totales en la cáscara de cinco híbridos de girasol obtenidos mediante extracción con microondas a 600 W, a 70 y 90°C.

El contenido de fenoles totales varió entre 190,44±15,71 (PAN7077) y 307,67±2,36 (SyN3840) mg de ácido gálico/100 g de cáscara de girasol cuando la extracción con microondas se realizó a 70°C durante 20 minutos, mientras que los valores de fenoles totales estuvieron comprendidos entre

366,56±30,64 (DK4065) y 366,56±5,50 (PAN7077) y 439,89±32,21 (CF201) cuando la extracción con microondas se realizó a 90°C durante 10 minutos.

La **Tabla 1** muestra los resultados del análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de fenoles totales con un nivel de significación del 5%. Para las fuentes de variación significativas se realizó el Test de Tukey, donde letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los niveles analizados.

Tabla 1: ANOVA para los valores de fenoles totales extraídos de las cáscaras de distintos híbridos de girasol, mediante dos tratamientos de extracción (70°C- 20 min, 90°C-10 min).

F.V.*	SC*	gl*	CM*	F	p-valor
Modelo.	115835,27	9	12870,59	12,10	0,0003
Híbrido	17316,94	4	4329,24	4,07	0,0327
Tratamiento	93240,44	1	93240,44	87,64	<0.0001
Híbrido*tratamiento	5277,90	4	1319,47	1,24	0,3546
Error	10639,63	10	1063,96		
Total	126474,91	19			

*F.V., Fuentes de variación; SC, Suma de cuadrados; gl, grados de libertad; CM, Cuadrado medio.

Se observan diferencias significativas ($p=0,0327$) entre los híbridos para los valores de fenoles totales. La diferencia entre híbridos fue establecida entre SyN 3840 y PAN 7077, siendo los híbridos que presentaron el contenido de fenólicos

más alto y más bajo, respectivamente. El método de extracción presentó diferencias significativas ($p \leq 0,0001$) sobre la obtención de los compuestos fenólicos. Para la totalidad de los ensayos, la extracción de compuestos fenólicos aumentó con el incremento de la temperatura, siendo los valores superiores cuando la extracción se realizó a 90°C durante 10 minutos, con respecto a los valores obtenidos a 70°C durante 20 minutos (**Figura 3**).

Flavonoides

La **Figura 4** muestra el contenido de flavonoides (mg de catequina/100 g de cáscara de girasol) para los 5 híbridos analizados, utilizando temperatura de extracción con microondas de 70 y 90°C durante 20 y 10 minutos, respectivamente.

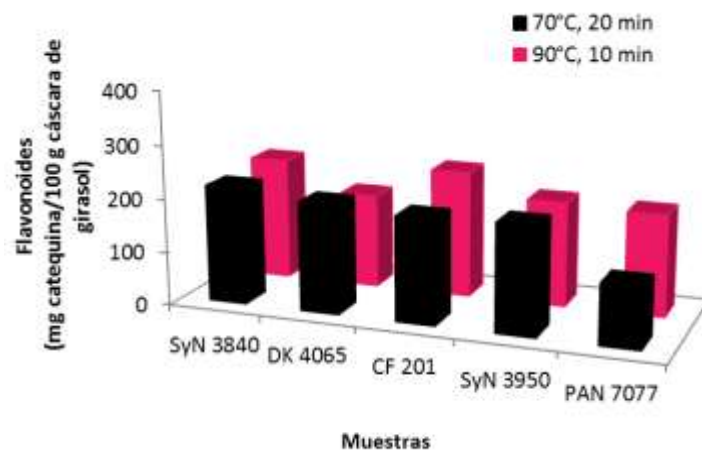


Figura 4: Contenido de flavonoides en la cáscara de cinco híbridos de girasol obtenidos mediante extracción con microondas a 600 W, a 70 y 90°C.

El contenido de flavonoides varió entre $112,24 \pm 8,08$ (PAN7077) y $219,39 \pm 71,00$ (SyN3840) mg de catequina/100 g de cáscara de girasol cuando la extracción con microondas se realizó a 70°C durante 20 minutos, mientras que los valores de flavonoides estuvieron comprendidos entre $176,63 \pm 15,15$ (DK 4065) y 237,55 (CF201) cuando la extracción con microondas se realizó a 90°C durante 10 minutos.

La **Tabla 2** exhibe los resultados del análisis de la varianza para los valores de flavonoides según el efecto de las variables independientes (híbrido, tratamiento e interacción híbrido*tratamiento).

Tabla 2: Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de flavonoides extraídos de las cáscaras de distintos híbridos de girasol, mediante dos tratamientos de extracción (70°C- 20 min, 90°C-10 min).

F.V.*	SC*	gl*	CM*	F	p-valor
Modelo.	22053,69	9	2450,41	1,85	0,1753
Híbrido	13134,59	4	3283,65	2,48	0,1110
Tratamiento	2004,60	1	2004,60	1,52	0,2465
Híbrido*tratamiento	6914,50	4	1728,62	1,31	0,3318
Error	13227,93	10	1322,79		
Total	35281,62	19			

*F.V., Fuentes de variación; SC, Suma de cuadrados; gl, grados de libertad; CM, Cuadrado medio.

El contenido de flavonoides no fue afectado significativamente ($p > 0,05$) por ninguna de las fuentes de variación analizadas (híbrido, tratamiento e interacción híbrido*tratamiento).

Por otra parte, el contenido de flavonoides fue inferior al contenido de fenoles totales para la totalidad de los ensayos, debido a que los compuestos flavonoides forman parte del grupo de los fenoles totales (Balasundram *et al.*, 2006; Gürbüz *et al.*, 2007).

Actividad Antioxidante

La **Figura 5** se exhibe la actividad antioxidante ($\mu\text{mol TE/g}$ cáscara de girasol) de la cáscara de cinco híbridos, utilizando temperatura de extracción con microondas de 70 y 90°C durante 20 y 10 minutos, respectivamente.

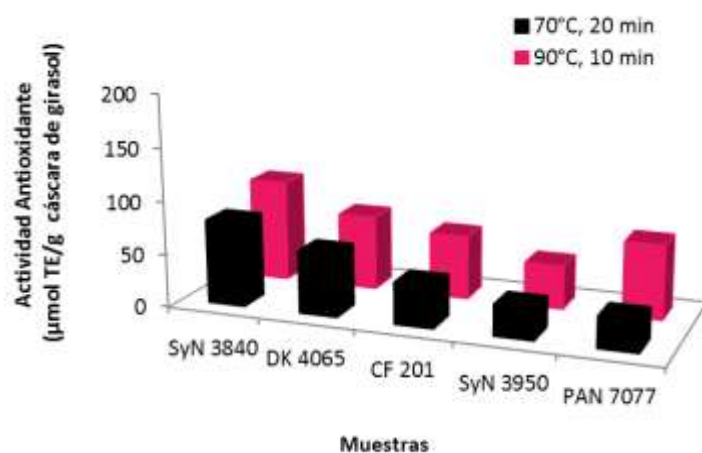


Figura 5: Actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante extracción con microondas a 600 W, a 70 y 90°C., a partir de cáscara de cinco híbridos de girasol.

La actividad antioxidante varió entre $29,05 \pm 2,24$ (SyN3950) y $79,59 \pm 18,00$ (SyN3840) $\mu\text{mol TE/g}$ cáscara de girasol cuando la extracción con microondas se realizó a 70°C durante 20 minutos, mientras que los valores de actividad antioxidante estuvieron comprendidos entre $41,02 \pm 4,76$ (SyN3950) y $96,14 \pm 5,69$ (SyN3840) cuando la extracción con microondas se realizó a 90°C durante 10 minutos.

La **Tabla 3** presenta los resultados del análisis de la varianza para los valores de actividad antioxidante con un nivel de significación del 5%.

Tabla 3: Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de actividad antioxidante de las cáscaras de distintos híbridos de girasol, mediante dos tratamientos de extracción (70°C- 20 min, 90°C-10 min).

	F.V.*	SC*	gl*	CM*	F	p-valor
Modelo.		13565,06	9	1507,23	14,88	<0,000 1
Híbrido		9603,75	4	2400,94	23,71	<0,000 1
Tratamiento		3064,34	1	3064,34	30,26	<0,000 1
Híbrido*tratamiento		896,97	4	224,24	2,21	0,1041
Error		2025,46	20	101,27		
Total		15590,52	29			

*F.V., Fuentes de variación; SC, Suma de cuadrados; gl, grados de libertad; CM, Cuadrado medio.

La actividad antioxidante fue influenciada significativamente por el tipo de híbrido ($p < 0,0001$) y por el tratamiento ($p < 0,0001$). La diferencia entre híbridos fue establecida entre DK 4065 y SyN 3950. Además, SyN 3840 se diferenció significativamente del conjunto de muestra por presentar el valor más alto de actividad antioxidante. En cuanto al tratamiento de extracción, para la totalidad de los ensayos, la actividad antioxidante de los híbridos de girasol aumentó con el incremento de la temperatura, siendo los valores superiores cuando la extracción se realizó a 90°C durante 10 minutos, con respecto a los valores obtenidos a 70°C durante 20 minutos.

CONCLUSIONES

El tipo de híbrido de girasol así como las condiciones del tratamiento de extracción influyeron significativamente sobre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de los mismos. El tratamiento de extracción con microondas a 90°C durante 10 minutos permitió obtener valores significativamente mayores de fenoles totales y de actividad antioxidante, respecto al proceso de 20 minutos a 70°C. Futuros estudios serían convenientes para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos responsables de dicha actividad antioxidante. Los resultados de este trabajo aportan una información valiosa relacionada con otorgar valor agregado a un residuo de la industria aceitera como son las cáscaras de girasol, las cuales podrían ser utilizadas como ingredientes para su aplicación en alimentos funcionales, productos nutraceuticos, farmacológicos o en la industria cosmética.

BIBLIOGRAFÍA

- Balasundram N, Sundram K, Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
- Cancalon P. 1971. Chemical Composition of Sunflower Seed Hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48: 629-632.
- De Leonardis A, Macciola V, Di Domenico N. 2005. A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus* L.). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107: 220-227.
- Gotor AA, Farkas E, Berger E, Labalette F, Centis S, Daydé J, Calmon A. 2007. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 525-530.
- Gürbüz O, Göçmen D, Dağdelen F, Gürsoy M, Aydın S. 2007. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100(2): 518-525.
- Hamed SF, Wagdy SM, Megahed MG. 2012. Chemical Characteristics and Antioxidant Capacity of Egyptian and Chinese Sunflower Seeds: A Case Study. *Life Science Journal*, 9(2): 320-328.
- Karaaslan, D, Hatipoglu A, Türk Z, Kaya Y. 2010. Determination of potential sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars for the irrigated conditions of diyarbakir. *HELIA*, 33(52): 145-152.

- Karamac M, Kosin A, Estrella I, Hernandez T, Dueñas M. 2012. Antioxidant activity of phenolic compounds identified in sunflower seeds. *Eur Food Res Technol*, 235: 221-230.
- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón M J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII(6): 271-278.
- Nihal T, Sari F, Velioglu YS. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food chemistry*, 99(4): 835-841.
- Nkhili E, Tomao V, El Hajji H, El Boustani E, Chemat F, Dangles O. 2009. Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols. *Phytochem. Anal.*, 20: 408-415.
- Pan X, Niu G, Liu H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42: 129-133.
- Pedrosa MM, Muzquiz M, García-Vallejo C, Burbano C, Cuadrado C, Ayet G, Robredo LM. 2000. Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 459-464.
- Sripad G, Prakash V, Narasinga Rao MS. 1982. Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *J. Biosci.*, 4(2): 145-152.
- Szydłowska-Czerniak A, Trokowski K, Szlyk E. 2011. Optimization of extraction conditions of antioxidants from sunflower shells (*Helianthus annuus* L.) before and after enzymatic treatment. *Industrial Crops and Products*, 33: 123-131.
- Taha FS, Wagdy SM, Hassanein MMM, Hamed SF. 2012. Evaluation of the biological activity of sunflower hull extracts. *Grasas y aceites*, 63(2): 184-192.
- Turkmen N, Sari F, Velioglu S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99(4): 835-841.
- Weisz GM, Kammerer DR, Carle R. 2009. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSⁿ. *Food Chemistry*, 115: 758-765.
- Žilic S, Maksimovic Dragišić J, Maksimovic V, Maksimovic M, Basic Z, Crevar M, Stankovic G. 2010. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel. *HELIA*, 33(52): 75-84.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la cooperación de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Chihuahua (UACH) y ANPCyT.