# Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Ingeniería y Tecnología

**Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**Córdoba, Argentina. 2009**

**Pablo Ribotta, Marcelo Rosmini y Miguel de Billerbeck**
**Editores**

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Ingeniería y Tecnología. Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Córdoba, Argentina. 2009.
279 p., 24,5x17 cm
ISBN: 978-987-24620-9-3
Ciencia y tecnología de los alimentos

## AUTORIDADES PROVINCIALES

**Gobernador de la Provincia de Córdoba**
Cr. Juan Schiaretti

**Ministro de Ciencia y Tecnología**
Ing. Tulio Abel Del Bono Verzura

**Ministro de Agricultura, Ganadería y Alimentos**
Don Carlos Mario Gutiérrez

**Ministro de Industria, Comercio y Trabajo**
Don Roberto Hugo Avalle

**Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología**
Dr. Carlos Walter Robledo

**Secretario de Alimentos, Ministerio de Agricultura - Ganadería y Alimentos**
Cr. Jose Luis Rovasio

**Secretario de Industria, Ministerio de Industria - Comercio y Trabajo**
Ing. Cesar Martinelli

**SubSecretaria de Coordinación Técnica y Administrativa - Ministerio de Ciencia y Tecnología**
Cra. Nancy Carrizo Aguilera

**Directora de Vinculación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología**
Dra. Victoria Rosati

**Directora de Innovación Tecnológica - Ministerio de Ciencia y Tecnología**
Dr. Mario Ignacio Buteler

PRESIDENCIA

**Coordinador:** Dr. Carlos Walter Robledo. Secretario de Innovación y Vinculación Tecnológica, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba (MINCYT Cba).

Cr. Jose Luis Rovasio. Secretario de Alimentos- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentos de la Provincia de Córdoba. (MAGyA Cba)

Ing. Cesar Martinelli. Secretario de Industria- Ministerio de Industria, Comercio y Trabajo de la Provincia de Córdoba. (MICyT Cba)

**COMITÉ ORGANIZADOR**

**Coordinadora:** Dra. Victoria Rosati. Directora de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Bioq. Marcelo Daniel Machado. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Mgter. Natalia Paola Masferrer. MINCYT Cba.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR, MINCYT Cba.

Lic. Carolina Pedreti. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

Ing. Manuel San Pedro. UVITEC - Unión Industrial Córdoba, Bolsa de Comercio y Cámara de Comercio Exterior.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba.

**COMITÉ CIENTIFICO**

**Coordinador:** Dr. Alberto Edel León. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dra. Analía Abraham. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. María Cristina Añón. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Rafael Borneo. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Pilar Buera. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Dra. Sofía Chulze. Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Dra. Concha Collar. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Miguel De Billerbeck. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.

Dr. Marie De Lamballerie-Anton. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Dra. Cristina Ferrero. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. John W. Finley. Louisana State University, USA.

Dr. Jurian Hoogewerff. University of East Anglia, United Kingdom.

Lic. Susana María Jiménez. Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Dr. Alain Le-BAIL. Ecole Nationale D´Ingénieurs des techniques des industries agricoles et alimentaires, Francia.

Mg. Mariane Lutz Riquelme. Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos Funcionales, Chile.

Dr. Rodolfo Mascheroni. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dr. Abel Guarda Moraga. Universidad de Santiago de Chile, Chile.

Dra. Mirtha Nassetta. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Mg. Sonia Olivarez Cortéz. Instituto de Nutricion y Tecnologia de los Alimentos, Chile.

Dr. Manuel Gómez Pallares. Universidad de Valladolid, España.

Bioq. Esp. Nancy Passalacqua. Subs. CEPROCOR - MINCYT Cba, Argentina.

Dra. Ruth Pedroza Islas. Universidad Iberoamericana, México.

Dra. Pilar Peral García. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Gabriela Pérez. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Pablo Daniel Ribotta. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Dra. Marta Rivas. Instituto Malbrán, Argentina.

Dra. Cristina Rosell. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Marcelo Rosmini. Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

Dra. Viviana Salvadori. CONICET - Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Dra. Carmen C. Tadini. Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Dr. Fidel Toldrá. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Daniel Ramón Vidal. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

Dr. Jorge Ricardo Wagner. Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.

Dr. Daniel Wunderlin. CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dr. Lorenzo Zacarías. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España.

**COMITÉ TECNOLOGICO**

**Coordinador:** Dr. Mario Ignacio Buteler. Director de Innovación Tecnológica. MINCYT Cba.

Cr. José Luis Rovasio. Secretaría de Alimentos, MAGyA Cba.
Ing. Cesar Martinelli. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Ing. Luis de La Cuesta. Secretaría de Industria, MICyT Cba.
Lic. Marta Domínguez. Gerencia de Legislación Alimentaria. ARCOR S.A.I.C.
Dr. Gabriel Raya Tonetti. Gerencia Corporativa de Innovación. ARCOR S.A.I.C.
Ing. Ricardo Cravero - Qinnova
Ing. Ivana Cavigliasso - Prodeman S.A.

**SECRETARÍA TÉCNICA**

**Coordinadora:** Mgter. Natalia Paola Masferrer. Dirección de Vinculación Tecnológica, MINCYT Cba.

Dipl. Verónica Amato. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Natalia Andretich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Gastón Dunayevich. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Marisol Gomez Rojas. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Maribel Gonzalez. Cooperacion Internacional, MINCYT Cba.
Lic. Daniel Moyano. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Tec. Mirta Neira. Gestión de Proyectos. MINCYT Cba.
Tec. Sergio Rubino. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Irene Schubel. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.
Lic. Mariana Victoria. Secretaria de Alimentos, MAGyA Cba.
Tec. Ramón Roque Zapata. Comunicacion y prensa, MINCYT Cba.

**SECRETARÍA ADMINISTRATIVA**

**Coordinadora:** Cra. Nancy Carrizo Aguilera. SubSecretaria Técnica y Administrativa, MINCYT Cba.

As. Guillermo Ferreyra. MINCYT Cba.
As. Maria Cecilia Collino. MINCYT Cba.

**SUBSECRETARÍA DE INFORMATICA Y TELECOMUNICACIONES**

**Coordinador:** As. Daniel Pastorino

As. Horacio Velasco Vocos

**PATROCINANTES**

Gobierno de la Provincia de Córdoba

Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica -Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

Third World Academy of Sciences

Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED

Sealed Air

Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina

**APOYO ECONÓMICO PARA ESTA EDICIÓN**

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**AUSPICIANTES**

Universidad Nacional de Córdoba

Universidad Católica de Córdoba

Universidad Blas Pascal

Universidad Empresarial Siglo 21

Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Córdoba, San Francisco y Villa María

Universidad Nacional de Río Cuarto

Universidad Nacional de Villa María

Instituto Universitario Aeronáutico

Instituto Nacional de Tecnología Industrial

INTI Córdoba

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – Consejo del Centro Regional Córdoba

Organización Panamericana de la Salud- Argentina

SENASA Argentina

Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Córdoba

Colegio de Nutricionistas de la Provincia de Córdoba

Asociación Argentina de Ingenieros Químicos

INDICE

Prólogo .....2
Aimaretti N. .....3
Andrich O. D. .....13
Andrich O. D. .....21
Baümler E. R. .....27
Bergamini C. V. .....41
Bianchi M. .....51
Brondi M. C. .....60
Cid A. G. .....69
de Escalada Pla M. F. .....76
Farías M. E. .....83
Fernández M. B. .....90
Ferrari C. C. .....97
Fiorentini C. .....107
González C. .....116
Mabellini A. .....126
Maroto B. .....135
Martínez L. M. .....142
Martos M. A. .....154
Messa M. M. .....160
Milesi M. M. .....165
Ohaco E. .....180
Peralta J. M. .....187
Ramallo L. A. .....192
Reinheimer M. A. .....203
Rodríguez M. M. .....209
Santos U. .....217
Schmalko M. E. .....223
Sologubik C. A. .....230
Torrez Irigoyen R. M. .....240
Tosi E. .....252
Tosi E. .....259

Vélez M. A. .....266
Mateos l. .....272

# PRÓLOGO

El esfuerzo de un grupo de personas y de las Instituciones involucradas en las ediciones 2004 y 2006 del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, junto a la fuerte tradición académica de Córdoba permitieron afianzar en la III edición del Congreso los logros alcanzados en las anteriores. Sin duda, la principal fuerza impulsora de estos logros fueron los grupos de investigación en ciencia y tecnología de alimentos de Argentina e Iberoamérica que participaron de las ediciones del CICyTAC.

Los organizadores han percibido un creciente interés en contribuir al desarrollo de nuevos alimentos y tecnologías en los procesos productivos asociados. La innovación en la industria de alimentos está dirigida a acrecentar la eficiencia de los métodos de producción, ampliar y asegurar las fuentes de materias primas e ingredientes, mejorar las propiedades nutricionales de los alimentos procesados y hacerlos más apetecibles, extender el período en que los alimentos permanecen sin cambios perceptibles en sus propiedades, incrementar la variedad de alimentos y con ello las posibilidades de dietas equilibradas nutricionalmente, desarrollar nuevos ingredientes y nuevos materiales para envases, incrementar la sustentabilidad de los procesos de producción y de los materiales que se utilizan. Vincular el sector productivo y los grupos de investigación que pueden aportar en estas áreas fue uno de los principales objetivos de esta última edición del Congreso. Con la intención de promover esta vinculación, resulta trascendente reunir en forma sistematizada parte de las ponencias que se presentaron en el III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. El presente volumen condensa los trabajos de los investigadores que aceptaron la invitación para publicar sus avances científicos en las áreas de ingeniería y tecnología de los alimentos.

Esperamos que este libro constituya una referencia actual y sea útil para aquellas personas involucradas en el estudio y en la aplicación de conocimientos para atender las nuevas demandas en la producción de alimentos.

Los editores

# Reciclado de aceites comestibles usados para la obtención de biocombustible

# Recycling of edible oils to biofuel production

Aimaretti N, Accoroni C, Ansaldi J, Balaban D, Clementz A, Intilengelo L, Pettinari N, Tokman G

Laboratorio de Investigaciones. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.
Pellegrini 1332. 2000 Rosario. email: naimaretti@ucel.edu.ar

## RESUMEN

Una alternativa para reciclar aceites es utilizarlos como materia prima de bajo costo para producir biodiesel. Así, se implementó un proceso de transesterificación con metanol supercrítico, que permitiría procesarlos sin un tratamiento previo y sin necesidad de un catalizador. Se combinaron diferentes relaciones molares para evaluar: agua, FFA, glicerol, metanol, metilésteres, viscosidad e Índice de iodo, a diferentes tiempos de reacción. Al utilizar aceite de soja refinado como materia prima se obtuvo 94-96 % de conversión en biodiesel de calidad aceptable y glicerol en cantidades despreciables. Esto es ventajoso ya que permite eliminar operaciones y reducir lavados, pero el biodiesel obtenido requiere de un refino simple para cumplir la especificación.

## ABSTRACT

An alternative to recycle oils is to use them as raw material of low cost to produce biodiesel. In this way, was implemented a process of transesterification with supercritical methanol, which would allow to process them without prior treatment and without catalyst.

Different molar ratios and times were combined to evaluate: water, FFA, glycerol, methanol, methyl ester, viscosity and iodine value.

In using refined soybean oil as a raw material it was obtained 94-96 % of conversion in biodiesel of acceptable quality and negligible amounts of glycerol. This is advantageous since it allows to eliminate operations and to reduce washes, but it requires a simple refining to fulfil the specification.

**PALABRAS CLAVE**: *biodiesel, metanol supercrítico, aceites reciclados.*

**KEYWORDS**: *Biodiesel, supercritical methanol, recycled oils.*

## INTRODUCCIÓN

Los aceites comestibles usados en los hogares, bares, restaurantes y en algunas industrias alimenticias, tales como frigoríficos, fábricas de snacks y prefritos congelados, son una amenaza para el medio ambiente, ya que si ocasionalmente terminan en vertederos de agua, acaban en los ríos y forman una película superficial que impide el normal intercambio de oxígeno, alterando el ecosistema. Además, pueden obstruir cañerías, servir de alimento a los roedores y causar la muerte de la flora y fauna acuática al llegar a los cauces fluviales.

Una alternativa propuesta para el tratamiento de estos residuos o efluentes ricos en grasas, es su transformación en un biocombustible de segunda generación, mediante un proceso de transesterificación con metanol, el cual tiene como resultado la producción de ésteres metílicos, conocidos como biodiesel (Kusdiana y Saka 2001).

En el caso particular de la producción de biodiesel, las materias primas indicadas son aquéllas que poseen en su composición una importante cantidad de lípidos, principalmente triglicéridos. En este sentido se han implementado procesos alimentados principalmente con aceites refinados de soja, colza y palma, aunque también se está investigando la producción integral de biodiesel a partir de cultivos de Jatropha (Wang *et al.* 2000, Saka *y* Kusdiana 2001*).*

La tecnología convencional globalmente utilizada para este proceso involucra una catálisis homogénea básica que no permite procesar materias primas de baja calidad, como lo son este tipo de aceites

residuales, debido a que contienen elevadas concentraciones de ácidos grasos libres (FFA), entre 5 y 30 %, que reaccionan con el álcali disolvente utilizado como catalizador (Sasaki *et al*. 2001*)*. Si a lo anterior se suma que poseen también un elevado contenido de agua, que a su vez aumenta el contenido de los FFA por ser una reacción de equilibrio y actúa envenenando el catalizador utilizado, se verifica claramente que no es posible procesarlos directamente. En consecuencia el uso de éstos en procesos convencionales obliga a agregar etapas previas de rectificación de la materia prima, generando un incremento en el costo del proceso (Srivastava y Prasad 2000).

En este contexto, la obtención de la materia prima requerida para producir la cantidad necesaria de biocombustibles, es posible únicamente a partir de un aumento en la producción de los cultivos y consecuentemente de las áreas sembradas. Esta situación obliga necesariamente a sacrificar grandes zonas de bosque primario o secundario, como ya ha ocurrido en Argentina, Paraguay y Brasil, en beneficio de los cultivos de soja y palma; pudiendo provocar consecuentemente un saldo neto negativo de dióxido de carbono (Pinnarat y Savage 2008, Wang *et at*., 2000).

En la búsqueda de una solución, investigadores japoneses han propuesto una alternativa para la producción de biodiesel (Stern *et al*. 1999, Kusdiana y Saka 2004, Warabi *et al*. 2004) que contempla la transesterificación con metanol en condiciones supercríticas, en ausencia de catalizador. El metanol logra su estado supercrítico encima de su presión y temperaturas críticas (Tc = 240 ° C), así la línea de separación de fases liquido-gas se desvanece, el fluido tiene las propiedades combinadas y se forma una fase homogénea, algo que no ocurre en los otros procesos convencionales. En estas condiciones se pudo observar que la reacción se distingue por las siguientes ventajas:

- Los glicéridos y ácidos grasos libres reaccionan con velocidades equivalentes (Demirbas 2002).
- La fase homogénea elimina los problemas difusivos (Stern *et al.* 1999).
- La ausencia de catalizador y la velocidad de reacción equivalente de los FFA generados, hacen al proceso tolerante a grandes porcentajes de agua en la materia prima (Plank y Lorbeer 1995), en contraposición con los procesos catalíticos que requieren la eliminación periódica del agua en la alimentación y/o en etapas intermedias, para prevenir la desactivación de catalizador.
- Se evita el paso de eliminación del catalizador.

Asimismo, se advierten algunos inconvenientes en el método supercrítico, a saber:

- Las altas temperaturas involucran altos costos de calefacción y refrigeración.
- El proceso funciona a muy altas presiones (20-40 MPa) (Warabi *et at*. 2004, Kusdiana y Saka 2004).
- La elevada relación molar (R) metanol:aceite, involucra altos costos para la evaporación del metanol que no reaccionó (Anistescu *et al.* 2008).

En todos los procesos industriales es importante considerar la calidad del biodiesel obtenido, puesto que define el tratamiento posterior de purificación, lo cual tiene incidencia directa en el costo de producción como así también en la inversión. Al mismo tiempo, independientemente de las operaciones involucradas, es necesario reducir al mínimo la cantidad de efluentes acuosos que se generan en el proceso a modo de evitar erosiones ambientales, lo que redunda en otros factores intervinientes en la formulación del costo del producto final. En este punto el proceso supercrítico se diferencia del convencional debido a que al eliminar etapas de lavado, se reduce ampliamente el volumen de efluentes generados.

Dentro de este contexto se ha planteado un proyecto de investigación cuyo objetivo general se centró en el estudio del proceso supercrítico a fin de determinar su posible utilización para la obtención de biodiesel a partir de materias primas de baja calidad, tal como las mencionadas anteriormente.

En una primer etapa se puso a punto dicha metodología, utilizando como materia prima, aceite refinado de soja a fin de definir los factores necesarios que permitirían analizar su factibilidad técnica y económica, como ser: rendimiento del proceso, calidad del producto de reacción y el consecuente proceso de refino necesario para obtener un biodiesel que cumpla las especificaciones de calidad indicadas por las normas internacionales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materias Primas

Aceite refinado de soja suministrado por BUNGE Argentina. Metanol (99.9 %) proporcionado por Dorwil. Algunas propiedades relevantes de las materias primas utilizadas se indican en la **Tabla 1**.

**Tabla 1**. Propiedades relevantes de las materias primas.

| Material | FFA (%) | Agua (%) | Índice de iodo |
|---|---|---|---|
| Aceite de soja | 0.21 | 0.03 | 134 |
| Metanol | 0.001 | 0.06 | -- |

## Reacción de transesterificación

Se utilizó un reactor tipo autoclave de acero inoxidable que se muestra en la **Figura 1**, cuyo volumen útil es de 50 $cm^3$. En la tapa del reactor se dispone de una vaina donde se coloca el termopar que lleva la señal al controlador de temperatura y un manómetro para medir la presión interior del recipiente. Este reactor se sitúa dentro de un horno calefaccionado que se ilustra a la derecha de la misma Figura mediante resistencia eléctrica accionada por un controlador de temperatura.

**Figura 1**. Equipo utilizado para la reacción de transesterificación con metanol supercrítico.

Se planteó un esquema sencillo de obtención de biodiesel que consiste en una reacción de una etapa en la que después de cargar el autoclave se purga con nitrógeno y se cierra. A continuación se calienta a 30 °C $min^{-1}$ hasta la temperatura final (280 °C) y se registran los valores de temperatura y presión, en forma similar a otras experiencias reportadas en la bibliografía (Demirbas 2002).

La relación molar entre las materias primas fue considerada una variable que se analizó en dos valores: R=15 y R=20. El tiempo de reacción también fue considerado una variable por lo que luego de trascurrido el mismo, según el caso, se retira el reactor del horno y se enfría bruscamente en un baño de hielo, con el fin de detener la reacción.

Una vez frío el reactor se pesa para evaluar posibles pérdidas de masa. Luego, se coloca nuevamente en el horno y se calienta hasta 110 °C, haciendo burbujear nitrógeno con el fin de eliminar el metanol no reaccionado. La temperatura y el gas de purga se mantienen durante 60 min y luego se lo deja enfriar. Posteriormente se abre, se descarga, se pesa el contenido y se lleva a una probeta donde se deja decantar durante 1h. Al producto obtenido se lo denominó biodiesel final.

## Análisis de biodiesel

Cada muestra de líquido fue analizada mediante las siguientes técnicas.

- Contenido de agua: valoración ponteciométrica de Karl-Fischer de acuerdo a las normas EN ISO 12937 y ASTM D 2709. Los reactivos de Karl-Fischer fueron suministrados por Merck y la titulación fue realizada con un equipo Altronix con un electrodo de vidrio.
- Contenido de FFA: valoración volumétrica con una solución de NaOH por medio del test ASTM D664.
- Viscosidad cinemática: método estándar ASTM D445 (Srivastava y Prasad 2000) mediante el empleo de un termostato a 40 °C, utilizando un viscosímetro Cannon–Fenske Routine (Cannon Instrument Co).
- Índice de yodo: evaluado por la técnica AOCS Cd 1-25.

- Concentración de glicerol, metanol, metilésteres de ácidos grasos (FAME), monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos: determinados por el método cromatográfico de Plank y Lorbeer (1995). Se utilizó piridina (Merck, 99.9 %) como solvente y catalizador de sililación de las muestras que luego fueron derivatizadas con N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamida (MSTFA, Aldrich). Como estándares internos se usó el 1,2,4-butanotriol (> 95 %, Fluka) y tricaprin (> 99 %, Fluka). Luego de 15 min a temperatura ambiente, las muestras sililadas se diluyeron en n-heptano (Merck, 99,5 %) y se inyectaron en un cromatógrafo gaseoso Varian Star 3400 CX equipado con una columna capilar Zebron ZB-5 (Phenomenex), de 25 m x 0.25 mm de diámetro interno y detector FID. Las muestras se inyectaron manualmente a una temperatura de 50 °C. Luego de un periodo isotérmico de 1 min se aumenta la temperatura a razón de 15 °C $min^{-1}$ hasta 180 °C, a 7 °C $min^{-1}$ hasta 230 °C y balísticamente hasta 300 °C sostenidos durante 20 min. Como gas carrier se utiliza nitrógeno con un caudal de 3 ml $min^{-1}$. La temperatura del detector fue 350 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una situación notoria que se advirtió en todas las muestras analizadas fue que no se observó la formación de glicerol como subproducto, lo cual se reflejó en la escasez o ausencia del mismo en el fondo del recipiente transparente de decantación. En principio se pensó que la reacción no había ocurrido debido a algún problema experimental, pero luego se descubrió que la concentración de metilésteres de ácidos grasos (FAME) producidos era elevada, logrando en algunos casos casi la conversión total.

El balance de masa específico para cada caso indicó que luego de la reacción de transesterificación con metanol supercrítico se verifica una pérdida de masa que depende fundamentalmente del tiempo de reacción y del valor de R utilizado. Esta pérdida consistió en todas las experiencias realizadas en 1-3 % de la masa total.

Por este motivo, se estableció una metodología de trabajo en la cual todas las variables estudiadas fueron analizadas a modo de establecer las interacciones correspondientes y graficadas para facilitar su observación. En tal sentido, en la **Figura 2** se muestran los resultados del contenido de agua en los productos de reacción para distintos tiempos de reacción y para distintos valores de R.

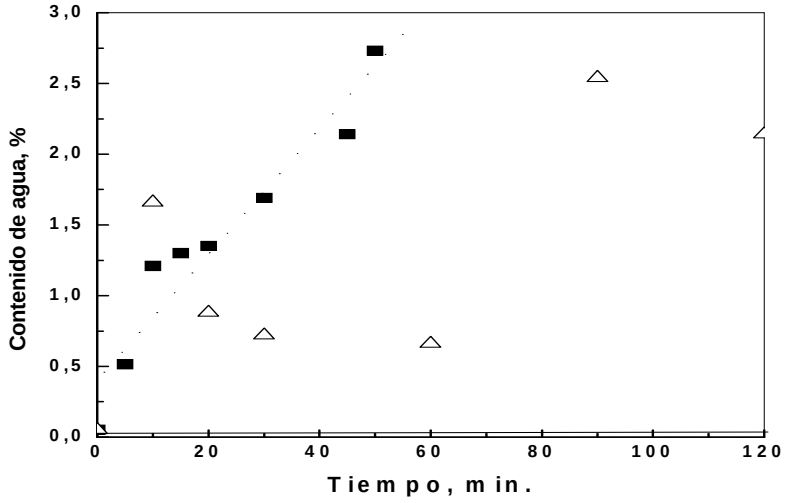


**Figura 2**. Contenido de agua en función del tiempo de reacción para los diferentes valores de R: ■ 15, Δ 20.

Considerando, que las materias primas utilizadas, aceite de soja refinado y metanol presentaban un contenido de agua inicial de 0,03 y 0,06 % respectivamente, se puede observar que en las condiciones de reacción se forma agua. Para una R=15, la formación de agua es directamente proporcional al tiempo de reacción, en tanto que para una R=20 el comportamiento es dispar. Sin embargo, en ambos casos y para mayores tiempos de reacción el contenido de agua aumenta hasta valores del 2-3 %.

Las normas ASTM 6751 y EN 14214 establecen un contenido de agua máximo en el biodiesel de 0,05 %, por lo que podemos concluir que la metodología supercrítica utilizada produce un biodiesel que, en

lo que a contenido de agua respecta, no cumple la especificación indicada por las normas y deberá someterse a un proceso adicional para eliminarla. Dado que esta pérdida se suma a la verificada en el punto anterior, podemos indicar que el proceso, para las condiciones de reacción estudiadas presentará un rendimiento de 94-96 %, lo que es menor al que se obtiene con la metodología alcalina convencional.

Tal como lo propusieron recientemente Anitescu *et al.* (2008), la aparición de agua entre los productos de reacción puede relacionarse con la desaparición del glicerol, ya que este grupo de investigadores también reportaron que no obtuvieron glicerol como subproducto en cantidades estequiométricas. Además postularon que el glicerol se descompone formando productos de menor peso molecular, lo cual redunda en la disminución del costo de separación del mismo. También, proponen que los productos de descomposición podrían ser directamente utilizados, simplificando enormemente el proceso de producción de biodiesel.

En este sentido, el glicerol puede reaccionar, produciendo agua como subproducto, de distintas maneras tal como se describen a continuación:

a) Descomposición: formando productos de menor peso molecular: acroleína, acetaldehído, ácido acético, etc. Algunos de estos productos pueden ser gaseosos a temperatura y presión ambiente, por lo que al abrir el reactor luego de la reacción se perderían ocasionando una disminución en la masa de productos de reacción.

b) Polimerización: con formación de poligliceroles (di y trigliceroles principalmente): a altas temperaturas, el glicerol puede polimerizar y los poligliceroles formados afectar negativamente las propiedades del biodiesel, ya que aumentaría la viscosidad.

c) Eterificación con metanol para producir éteres del glicerol: esta reacción podría producir metilglicerol, dimetilglicerol, y trimetilglicerol en función del grado de reactividad, los cuales han sido recientemente reportados como componentes benéficos del biodiesel (Hillion *et al*. 2007). Si bien, como indicaron Arredondo *et al.* (2007); Karinen y Krause (2006) la eterificación del metanol supercrítico usualmente requiere de una catálisis ácida, el metanol en su estado supercrítico pierde los enlaces puente de hidrógeno y entonces puede producir un ataque nucleofílico sobre el carbono del enlace C-O del glicerol sin necesidad de un catalizador. La presencia de estos éteres en el producto final podría afectar positivamente la viscosidad y el punto de niebla del combustible. Además, al incorporar oxígeno se mejorarían las propiedades de quemado del combustible y se reducirían las emisiones de material particulado. (Hillion *et al.* 2007, Klepáčová *et al*. 2007).

Analizando las tres posibilidades descriptas, puede apreciarse que de ellas, la formación de poligliceroles (b) o de éteres de glicerol (c), no implica una pérdida de peso, pero además la opción b implicaría obtener una fase separada, puesto que la solubilidad de los poligliceroles en biodiesel es menor que la del glicerol y ese fenómeno no se observa. Por este motivo se podría pensar que el glicerol está desapareciendo debido a la reacción a fundamentalmente o bien a una combinación ente a y c.

La concentración de equilibrio del glicerol en la fase biodiesel a la salida de un reactor de transesterificación de catálisis alcalina depende fundamentalmente del contenido de metanol residual, puesto que el mismo actúa como cosolvente (Kimmel 2004, Negi *et al.* 2006). Cuando el metanol es eliminado, la solubilidad del glicerol depende solamente de la temperatura, siendo 0,2 % a 25 °C y se incrementa linealmente a mayores temperaturas. Las normas ASTM D6751 y EN 14214 establecen un máximo de glicerol total (libre y combinado) de 0,24 % y un máximo de 0,02 % de glicerol libre, por lo que la eliminación de glicerol y glicéridos (*MG*, *DG*, y *TG*) a través del lavado del biodiesel es un paso importante del proceso convencional.

*Karaosmanoglu et al.* (1996) concluyeron que se requiere de un mínimo de 3-5 gramos de agua por gramo de biodiesel a una temperatura de 50 ºC, para eliminar eficientemente las impurezas del combustible. Este volumen de agua es considerable e influye de manera negativa sobre la economía del proceso y por tanto en el costo final del combustible. En sentido el proceso supercrítico los requerimientos de lavado son reducidos o eliminados completamente, debido a que el glicerol presente en el biodiesel es mucho menor.

En la **Tabla 2** se presentan datos de contenido de glicerol libre, glicerol combinado, metanol y agua, en muestras de biodiesel final a diferentes tiempos de reacción. En la misma se observa que, en todos los casos, el procedimiento utilizado para eliminar el metanol residual mediante barrido con gas de arrastre a 110 °C es efectivo para reducir el contenido de metanol a valores menores a los establecidos

por las normas de calidad (EN 14214: 0,2 %). Durante el barrido, el agua también se elimina, así los resultados de la mencionada Tabla muestran que el contenido de agua residual es inferior al indicado en la **Figura 2** y se aproxima a los limites de calidad establecidos.

**Tabla 2**. Concentración de Glicerol libre, glicerol combinado, agua y metanol en biodiesel producido mediante un proceso supercrítico de variada duración, para una R=15.

| Tiempo de reacción (min) | Glicerol libre (%) | Glicerol enlazado (%) | Metanol (%) | Agua (%) |
|---|---|---|---|---|
| 20 | --- | -- | 0.10 | -- |
| 30 | 0.054 | --- | 0.12 | -- |
| 60 | 0.040 | -- | --- | -- |
| 90 | 0.031 | 1.89 | 0.05 | 0.04 |
| 120 | 0.024 | 0.70 | 0.08 | 0.05 |

También puede observarse que los valores de glicerol libre son muy bajos en todos los casos y disminuyen a medida que aumenta el tiempo de reacción. Para un tiempo de reacción de 120 min se obtiene un valor de glicerol libre muy cercano al especificado por las normas que es de 0.02 %. Sin embargo puede notarse que el contenido de glicerol combinado aumenta en el comienzo y finalmente disminuye a prolongados tiempos de residencia. Estos valores podrían ser indicativos de que el glicerol combinado podría producirse a partir de glicerol libre y de ácidos grasos libres, en determinadas circunstancias.

De los resultados expuestos anteriormente puede concluirse que utilizando la metodología supercrítica se puede obtener un biodiesel que cumple con los requerimientos de contenido de glicerol libre, simplificando enormemente la metodología de purificación posterior, la cual puede realizarse utilizando sólidos adsorbentes, tal como reportan Yori et al. (2007), sin necesidad de recurrir a costosas etapas de lavados sucesivos. De este modo el proceso se convertiría en un llamado proceso de emisión prácticamente cero de efluentes líquidos.

Los resultados de acidez libre en el biodiesel final para distintos tiempos de reacción y para distintos valores de R se muestran en la **Figura 3**. Tomando como referencia la **Tabla 1** puede observarse que en las condiciones de reacción utilizadas se forman FFA como productos de reacción. Así, para ambas relaciones molares se observan comportamientos similares: la acidez aumenta inicialmente produciéndose un valor máximo entre los 15-20 min de reacción pero luego disminuye, alcanzando recién a los 90 min valores cercanos a 0,7 %.

En todos los casos en los que se utilizó aceite de soja refinado se verificó un aumento en los valores de acidez y contenido de agua de la mezcla de reacción. Sin embargo en ensayos preliminares realizados con materias grasas con alto contenido de acidez, tal como efluentes de un frigorífico de pollo, se evidencia una disminución y se estabiliza en valores similares: 22,3 % acides inicial, 4,4 % luego 15 min para R=15.

Las normas ASTM 6751 y EN 14214 establecen un contenido de acidez libre máximo en el biodiesel de 0,25 y 0,40 % respectivamente. Este límite puede ser obtenido extrapolando la gráfica de la **Figura 3,** así para alcanzar el 0,3 %, se indica un tiempo de reacción de 120 min. Si se utilizan menores tiempos de reacción, en estas mismas condiciones, el biodiesel obtenido no cumple con los requerimientos de FFA indicados por normas y en consecuencia deberá someterse a un proceso adicional de neutralización o remoción de ácidos grasos a la salida del reactor.

La evolución de la acidez libre en función del tiempo es típica de una reacción en serie donde los ácidos grasos libres son un producto intermedio. En este sentido, la secuencia de reacción sería la

siguiente: el agua formada por alguna de las reacciones en las que puede intervenir el glicerol hidroliza los triglicéridos formando FFA y glicerol (Minami y Saka 2006). Esta hipótesis permite explicar porqué a bajos tiempos de reacción la acidez libre aumenta. Posteriormente los ácidos grasos libres recientemente formados reaccionan con metanol para dar metilésteres y en consecuencia disminuye la concentración de los mismos dentro de la mezcla de productos de reacción.

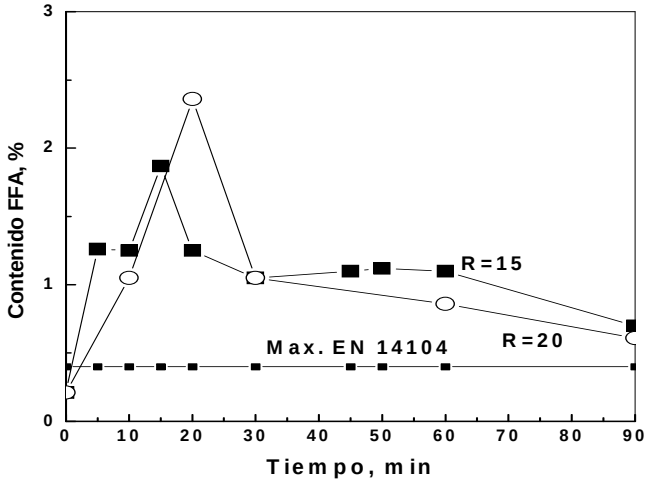


**Figura 3**. Contenido de ácidos grasos libres en biodiesel en función del tiempo de reacción para diferentes valores de R.

Como puede observarse en la **Figura 3**, para ambas relaciones molares y a tiempos de reacción mayores a 90 min, los valores de acidez del biodiesel final superan los especificados por las normas.
Los procesos de producción de biodiesel requieren lograr combustibles cuya especificación de viscosidad cinemática sea 1.9 – 6.0 cSt según la norma ASTM D6751 y entre 3.5 – 5.0 cSt según EN 14214. La **Figura 4** es un ploteo de los valores de viscosidad cinemática en función del tiempo de residencia en el reactor. En la misma puede observarse que a medida que procede la reacción y la conversión se incrementa, la viscosidad de la mezcla se reduce debido, principalmente, a la transformación de los triglicéridos en metilésteres de ácidos grasos. Tal como es de esperar, la velocidad con la que se lleva a cabo esta disminución se incrementa cuanto mayor es la relación molar metanol:aceite, logrando a los 60 min que el valor de viscosidad se aproxime a los valores especificados en las normas de calidad. Sin embargo no se advierte ningún comportamiento que implique el posible incremento de la viscosidad debido a las pequeñas cantidades de poligliceroles (reacción b).

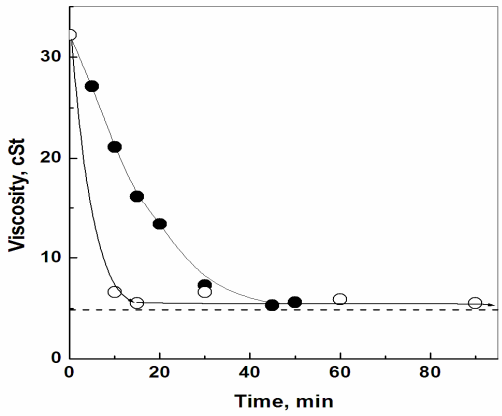


**Figura 4**. Viscosidad Cinemática del biodiesel a 40 °C en función del tiempo de reacción a diferentes R: (●) R=15. (○) R = 20. La línea de base representa el máximo contenido establecido por ISO 3104.

Un gráfico de distribución de los valores del índice de iodo (I.I.) del biodiesel final en función del tiempo de residencia en el rector, para dos relaciones molares diferentes (R=15 y R=20) se muestra en la **Figura 5**. El mencionado gráfico muestra que cuando R=15 el valor del índice de iodo no se modifica durante la reacción y su valor coincide con el de la materia prima utilizada (aceite de soja refinado, I.I.=134). Por el contrario, cuando R=20 el valor del índice de iodo permanece constante sólo hasta los 60 min de reacción y luego disminuye conforme aumenta el tiempo de residencia en el reactor. En efecto, puede observarse una disminución de 15 puntos cuando el tiempo de reacción alcanza los 120 min.

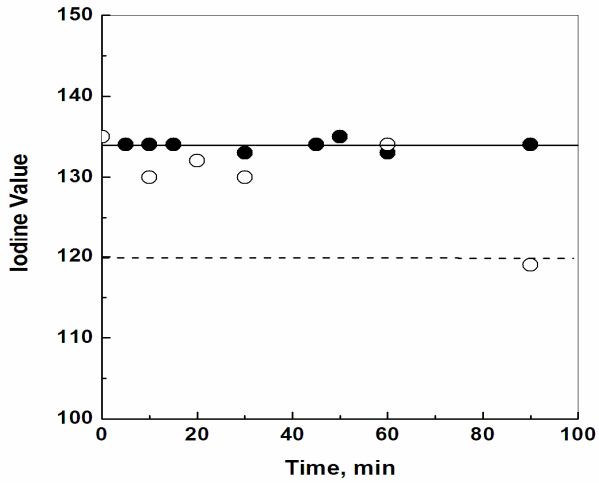


**Figura 5**. Valor del índice de iodo del biodiesel en función del tiempo de reacción a diferentes valores de R: (●) R=15. (○) R = 20. La línea de puntos representa el valor máximo establecido por la norma EN 14111.

Considerando que el valor del índice de iodo es estrictamente proporcional al número de insaturaciones existentes en los ácidos grasos que conforman la materia prima, la reducción del mismo podría en primera instancia atribuirse a dos causas diferentes. Por un lado puede postularse la metoxilación de las cadenas acílicas por un ataque sobre los dobles enlaces, lo cual no es muy probable debido a la naturaleza nucleofílica de la fracción reactiva del carboxilo del metanol supercrítico y el ambiente rico en electrones de los enlaces olefínicos. Por otro lado, la disminución en el I.I. podría deberse, con mayor probabilidad, a la formación de nuevos compuestos saturados conformados por enlaces olefínicos no reactivos. Esta observación coincide con lo recientemente reportado por He *et al.* (2007), quienes observaron que los FAME insaturados se pierden a temperaturas de reacción superiores a los 300 °C y a tiempos de residencia en el reactor superior a 30 min.

## CONCLUSIONES

El proceso de producción de biodiesel por reacción de aceites con metanol supercrítico permitiría el uso de aceites comestibles usados así como también otras materias primas de baja calidad. Además no produce glicerol en cantidades apreciables como subproducto, lo cual simplifica enormemente el tratamiento posterior de purificación y el problema del destino responsable del mismo. Por otro lado, se logra la simplificación del proceso, al eliminar la etapa de decantación y separación de fases y además reducir (o eliminar directamente) los lavados posteriores con agua para llegar a un producto que se ajuste a la calidad que demandan las normas. Esto implica una reducción directa en los costos de producción y en la inversión inicial requerida.

El glicerol se descompone formando posiblemente productos de menor peso molecular y agua. Esta agua reacciona con los triglicéridos aumentando la acidez libre del biodiesel en una primera etapa. A mayores tiempos de reacción los FFA reaccionan con el metanol produciendo más metilésteres, lo que implica a su vez un aumento en el consumo específico de metanol comparado con el proceso

convencional. Luego del recupero de los FFA y los glicéridos el rendimiento del proceso puede ser del 94-96 %.
De acuerdo al análisis de propiedades estudiadas, el biodiesel obtenido puede requerir una etapa final de refino que podría llevarse a cabo utilizando sólidos adsorbentes para reducir glicerol libre, glicerol combinado, y acidez libre (Yori *et al*. 2007). Con esto, la propuesta se convertiría en un proceso de emisión prácticamente cero de efluentes líquidos y se estaría participando en forma activa de la producción de energías limpias o alternativas, al tiempo que se colaboraría con el aporte de una solución al tratamiento de este tipo de residuos, logrando también disminuir el costo final de los biocombustibles.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos manifestar nuestro agradecimiento a la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano (UCEL) que mediante su financiamiento ha permitido ejecutar los proyectos de investigación ALI 115 y ALI 116.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anitescu G, Deshpande A, Tavlarides L. 2008. Integrated Technology for Supercritical Biodiesel Production and Power Cogeneration. Energy & Fuels, 22 (2): 1391-1399.

Arredondo V, Back D, Carrigan P, Krenzer D, Cearley A. 2007. The Procter & Gamble Company Intellectual Property Division - West Bldg. Processes for converting glycerol to glycerol ethers. US Patent Applicattion 20070238905.

Demirbas A. 2002. Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. Energy Conversion and Management, 43 (17): 2349-2356.

He H, Wang T, Zhu S. 2007. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using supercritical methanol process. Fuel, 86(3): 442-447.

Hillion G, Delfort B, Durand I, Millen White Zelano & Branigan. 2008. Method For Producing Biofuels, Transforming Triglycerides Into At Least Two Biofuel Families: Fatty Acid Monoesters And Ethers And/Or Soluble Glycerol Acetals. US Patent Application 20070283619.

Karaosmanoglu F, Cıgızoglu K, Tuter M, Ertekin S. 1996. Investigation of the Refining Step of Biodiesel Production. Energy & Fuels, 10 (4): 890–895.

Karinen R, Krause A. 2006. New biocomponents from glycerol. Applied Catalysis. A: General, 306 (7): 128-133.

Kimmel T. 2004. Doctoral Thesis, Technischen Universität Berlin.

Klepáčová K, Mravec D, Kaszonji A, Bajus M. 2007. Etherification of glycerol and ethylene glycol by isobutylene. Applied Catalysis. A: General, 328 (1): 1-13.

Kusdiana D, Saka S. 2004. Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. Bioresource Technology, 91 (3): 289-295.

Kusdiana D, Saka S. 2001. Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol. Fuel, 80: 693-698.

Negi D, Sobotka F, Kimmel T, Wozny G, Schomäcker R. 2006. Liquid−Liquid Phase Equilibrium in Glycerol−Methanol−Methyl Oleate and Glycerol−Monoolein−Methyl Oleate Ternary Systems. Industrial & Engineering Chemistry Research, 45 (10): 3693–3696.

Minami E, Saka S. 2006. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. Fuel, 85 (17-18): 2479-2483.

Pinnarat T, Savage P. 2008. Assessment of Noncatalytic Biodiesel Synthesis Using Supercritical Reaction Conditions. Industrial & Engineering Chemistry Research, 47 (18): 6801–6808.

Plank C, Lorbeer E. 1995. Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography A, 697 (1-2): 461-468.

Saka S, Kusdiana D. 2001. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol methanol. Fuel, 80( 2): 225-231

Sasaki T, Susuki T, Okada F. (2001). Method for preparing fatty acid esters and fuel comprising fatty acid esters. United States Patent 6,187,939.

Stern R, Hillion G, Rouxel J, Leporq S. 1999. Institut Francais du Petrole, Rueil-Malmaison. Process for the Production of Esters from Vegetable Oils or Animal Oils Alcohols, U.S. Patent 5,908,946.

Srivastava A, Prasad R. 2000. Triglycerides-based diesel fuels. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 4 (2): 111-133.

Wang W, Lyons D, Clark N, Gautam M, Norton P.2003. Emissions from Nine Heavy Trucks Fueled by Diesel and Biodiesel Blend without Engine Modification. Environmental Science & Technology, 34:933-939.

Warabi Y, Kusdiana D, Saka S. 2004. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. Bioresource Technology, 91(3): 283-287.

Yori J, D´Ippolito S, Pieck C, Vera C. 2007. Deglycerolization of Biodiesel Streams by Adsorption Over Silica Beds. Energy Fuels, 21 (1): 347–353.

# Actividad de una enzima pectinasa sobre los polisacáridos insolubles de soja

# Activity of a pectinase enzyme on insoluble soy polysaccharides

Andrich OD, Aríngoli EE

Instituto de Tecnología de Alimentos – Fac. de Ingeniería Química – Universidad. Nac. del Litoral
oandrich@unl.edu.ar

## RESUMEN

La mayor parte de los métodos de obtención de leche de soja y el proceso de extracción acuosa simultánea de aceite y proteínas presentan etapas iniciales comunes de extracción y separación sólido / líquido, que se cumplen en condiciones prácticamente iguales. En ambos casos se generan residuos con composición y características muy similares, constituidos por polisacáridos insolubles (celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas) y por proteínas de alto peso molecular, que retienen importantes proporciones de líquido (emulsión con el aceite como fase dispersa y una dispersión de proteínas, sacáridos y sales como fase acuosa continua), determinando rendimientos medianos y bajos de extracción y presentando problemas de conservación y/o disposición de los mismos por ser material húmedo altamente perecedero. Diversos autores han propuesto la hidrólisis enzimática de distintas materias primas oleaginosas (incluida la soja), fundamentalmente para aumentar el rendimiento de extracción de aceite, con resultados variables. En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad de una pectinasa con acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc) sobre los polisacáridos insolubles de soja, como paso inicial para establecer su potencial aplicación en los procesos extractivos mencionados. En primer lugar se determinaron las curvas de hidrólisis con la siguiente metodología experimental: remojo del poroto entero, escurrimiento, molienda húmeda en caliente, hidrólisis enzimática en distintas condiciones de pH y cantidad de enzima empleada. El seguimiento de la hidrólisis se realizó por determinación de los grupos reductores formados mediante el método del ácido 3,5 – dinitro salicílico. Las curvas obtenidas a pH 6,50 (natural) y 5,00 fueron de dos tipos: a) con crecimiento gradual, llegando a valores aproximadamente constantes a largo tiempo de reacción, el cual es un comportamiento típico de las reacciones enzimáticas; b) con un máximo a tiempos intermedios, que se atribuye a reacciones secundarias que consumen los grupos reductores (reformación de enlaces glicosídicos y reacción con grupos amino). También se estimaron las velocidades iniciales, las cuales resultaron crecientes con la disminución de pH y con la dosis de enzima. En segundo término se realizaron experiencias de extracción aplicando un diseño factorial $3^2$ en bloques, con una repetición. Los valores experimentales fueron ajustados con un modelo polinómico de segundo orden. La concentración de grupos reductores formados durante la hidrólisis resultó ser significativamente dependiente de la cantidad de enzima empleada y su cuadrado, pero no del pH ni de interacciones. El Análisis de Varianza Multifactorial mostró la diferencia significativa únicamente entre pH 5,00 y 6,50, pero la tendencia de los valores medios fue creciente con la disminución de pH, efecto que corresponde a la mayor actividad enzimática a pH medianamente ácido. Por otra parte se verificaron diferencias significativas entre los tres niveles de enzima ensayados, resultado conocido a bajas concentraciones enzimáticas y coincidentes con lo determinado en las curvas de hidrólisis.

## ABSTRACT

Most methods for obtaining soymilk and the process for aqueous extraction of oil and proteins share the initial steps of extraction and solid/liquid separation, also under similar conditions. Residues with similar composition and characteristics, composed of insoluble polysaccharides (cellulose, hemicellulose, pectic substances) and high molecular weight proteins, are produced in both cases. They retain significant proportions of liquid (emulsion with oil as a dispersed phase and a dispersion of proteins, saccharides and salts as a continuous aqueous phase), thus determining medium and low extraction yields and presenting problems of conservation and/or disposal since they are highly perishable wet materials. Several authors have proposed enzymatic hydrolysis of oilseed raw materials (including soy), mainly to increase oil extraction yield, with variable results. The objective

of this work was to evaluate the activity of a pectinase with multiple actions (polygalacturonase, methylpolygalacturonase, etc) on insoluble soy polysaccharides, as an initial step in establishing its potential application in the above mentioned extraction processes. Hydrolysis curves were determined with the following experimental methodology: soaking of soy beans, draining, hot wet milling, and enzymatic hydrolysis under different conditions of pH and enzyme dose. Hydrolysis progress was followed with 3.5-dinitro salicylic acid method by determination of reducing groups. Curves obtained at pH 6.50 (natural) and 5.00 showed two characteristics: a) those with gradual increase, reaching approximately constant values at long reaction time, which is a typical behavior of enzymatic reactions, b) those with a maximum at intermediate times, which is attributed to secondary reactions consuming reducing groups (reformation of glycosidic bonds and reaction with amino groups). Estimation of initial rates showed they increased with pH decrease and enzyme dose. Extraction experiences were performed applying a factorial design in blocks $3^2$, with one replication. Experimental values were adjusted with a second order polynomial model. The concentration of reducing groups formed during hydrolysis was significantly dependent on enzyme dose and its second power, but not on pH and the interactions. Multifactor ANOVA showed significant difference only between pH 5.00 and 6.50, but mean values tended to increase with pH decrease, an effect corresponding to a higher enzyme activity at moderately acid pH. Besides, there were significant differences among the three levels of enzyme, which is characteristic of low enzyme concentration and coincident with hydrolysis curve results.

**PALABRAS CLAVE**: *hidrólisis enzimática, polisacáridos, soja.*

**KEYWORDS**: *enzymatic hydrolysis, polysaccharides, soy.*

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los métodos de obtención de leche de soja y el proceso de extracción acuosa simultánea de aceite y proteínas presentan etapas iniciales comunes de extracción y separación sólido / líquido, que se cumplen en condiciones prácticamente iguales. En ambos casos se generan residuos con composición y características muy similares, constituidos por polisacáridos insolubles (celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas) y por proteínas de alto peso molecular, que retienen importantes proporciones de líquido (emulsión con el aceite como fase dispersa y una dispersión de proteínas, sacáridos y sales como fase acuosa continua), determinando rendimientos medianos y bajos de extracción y presentando problemas de conservación y/o disposición de los mismos por ser material húmedo altamente perecedero.

Hace décadas que se han propuesto tratamientos enzimáticos para mejorar la extracción sólido / líquido, con diversos objetivos: aumento de rendimiento de componentes extraíbles, mejores propiedades de los mismos, disminución de masa de residuo, reducción de efluentes y de sus costos de tratamiento, etc. Específicamente, Eriksen (1983) ensayó la hidrólisis enzimática en la elaboración de leche de soja a partir de harina entera tostada, empleando diversas enzimas (proteasas, pectinasa, beta glucanasa y una con acción combinada). Por otra parte, diversos autores han estudiado la acción enzimática sobre distintas materias primas oleaginosas (incluida la soja) para aumentar el rendimiento de extracción de aceite, con resultados variables (Domínguez *et al.* 1993, Domínguez *et al.* 1994, Rosenthal *et al.* 2001).

En tal sentido, el objetivo fue evaluar la actividad de una pectinasa con acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc) sobre los polisacáridos insolubles de soja, como paso inicial para establecer su potencial aplicación en los procesos extractivos mencionados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Porotos de soja [Glycine max (L)] limpios y seleccionados, de grado alimenticio. Humedad 6,38 %, Proteínas (N x 6,25) 34,0 %, Grasa 21,9 %, Cenizas 4,9 %.

Enzima pectinasa Klearzyme 150 (Gist Brocades) de acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc), con actividad entre 10 y 50 ºC y pH 3,0 y 6,0.

## Métodos

Determinación de curvas de hidrólisis: 1) Remojo de 20 ± 0,1 g de porotos enteros por 8 h; 2) Escurrimiento; 3) Molienda húmeda en caliente y ajuste de masa total a 200 ± 0,1 g (relación S/L 1/9); 4) Termostatización a 45 ºC y ajuste de pH; 5) Hidrólisis enzimática con toma de muestras en función del tiempo.

Preparación de leche de soja: Etapas 1 a 4 cumplidas según la descripción anterior, 5) Hidrólisis enzimática por 1 h; 6) Filtración por doble tela y toma de muestras.

## Análisis

Seguimiento de la hidrólisis: determinación de grupos reductores formados por el método del ácido 3,5-dinitro salicílico, modificado por Miller (1959).

## Análisis estadístico

Diseño estadístico de experiencias (preparación de leche de soja): diseño factorial en bloques de dos factores y tres niveles (cantidad de enzima 0 - 0,10 - 0,20 ml; pH 5,00 - 5,75 - 6,50), con una repetición; parámetros fijos (temperatura de reacción 45 ºC, tiempo de reacción 1 hora), ajuste con modelo polinómico de segundo orden. ANOVA del diseño experimental y ANOVA multifactorial de la respuesta (grupos reductores) al nivel de significación del 5 %. Procesamiento de datos mediante el programa STATGRAPHICS Plus 3.0.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Curvas de hidrólisis

A fin de conocer la actividad de la enzima Klearzyme 150 con los polisacáridos de soja como sustrato, se determinaron las curvas de hidrólisis a pH 6,50 (aproximadamente el valor promedio de la suspensión de soja una vez molida en la licuadora de laboratorio y termostatizada a 45 ºC) y pH 5,00 (como representativo del pH óptimo de la enzima), teniendo como referencia un control sin enzima. En ambos casos se trabajó a 45 ºC y con distintas cantidades de enzima.

1) Curvas de hidrólisis a pH 6,50 (**Figura 1**):

1.a) hay formación de grupos reductores en la curva de referencia (sin enzima), triplicándose la concentración de los mismos en el lapso de 4 hs;

1.b) las curvas con 0,1, 0,2 y 0,3 ml de enzima crecen gradualmente, llegando a valores aproximadamente constantes a largo tiempo de reacción (240 a 420 min);

1.c) con 0,5 ml de enzima se encuentra un máximo a 180 min y luego la curva decae hasta valores cercanos a la curva testigo.

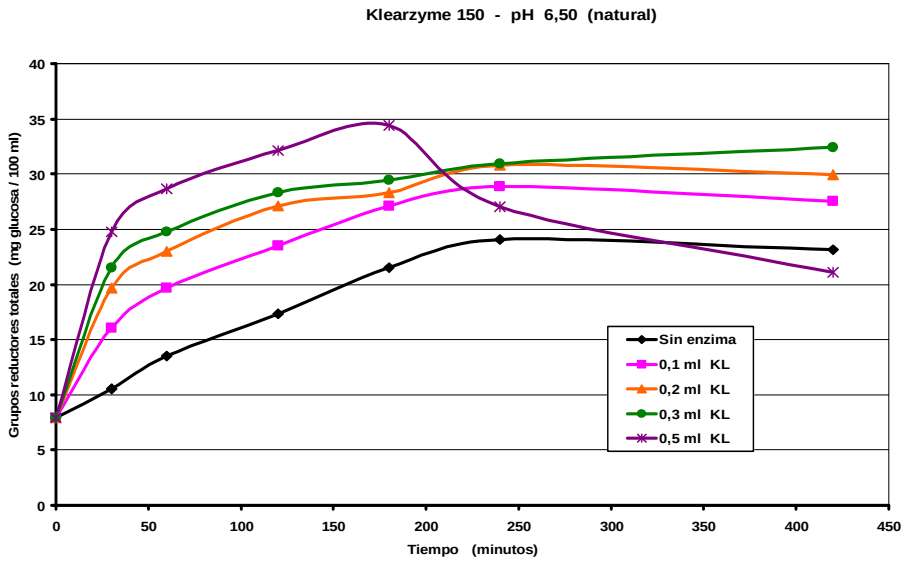


**Figura 1.** Curvas de hidrólisis a pH 6,50.

El tipo de curvas crecientes obtenido a pH 6,50 es típico de las reacciones enzimáticas. Es muy difícil comparar estos resultados con los informados por otros autores, dados los diferentes

procedimientos, enzimas y concentraciones empleados y los diferentes parámetros determinados. Sin embargo, si se transforman los valores mínimo y máximo obtenidos a miligramos de glucosa / gramo de materia seca:

Valor mínimo a 420 min = 21,117 mg / 100 ml mezcla = 2,43 mg / g mat. seca

Valor máximo a 420 min = 32,390 mg / 100 ml mezcla = 3,72 mg / g mat. seca

los mismos están en el orden de los valores determinados por Domínguez *et al* (1993) con una pectinasa (aproximadamente 1 mg / g mat. seca) y con otras enzimas (entre 3 y 12 mg / g mat. seca) a 6 h de hidrólisis.

2) Curvas de hidrólisis a pH 5,00 (**Figura 2**):

2.a) la curva testigo (sin enzima) a este pH es prácticamente coincidente con la determinada a pH 6,50, lo que permite concluir que no hay efecto de esta variable en los tiempos ensayados;

2.b) todas las curvas de hidrólisis enzimática presentan un máximo, con disminución a valores algo inferiores a la curva testigo a 420 min;

2.c) el tiempo en que se llega al máximo disminuye con el aumento de enzima utilizada, como se puede apreciar en la **Tabla 1**.

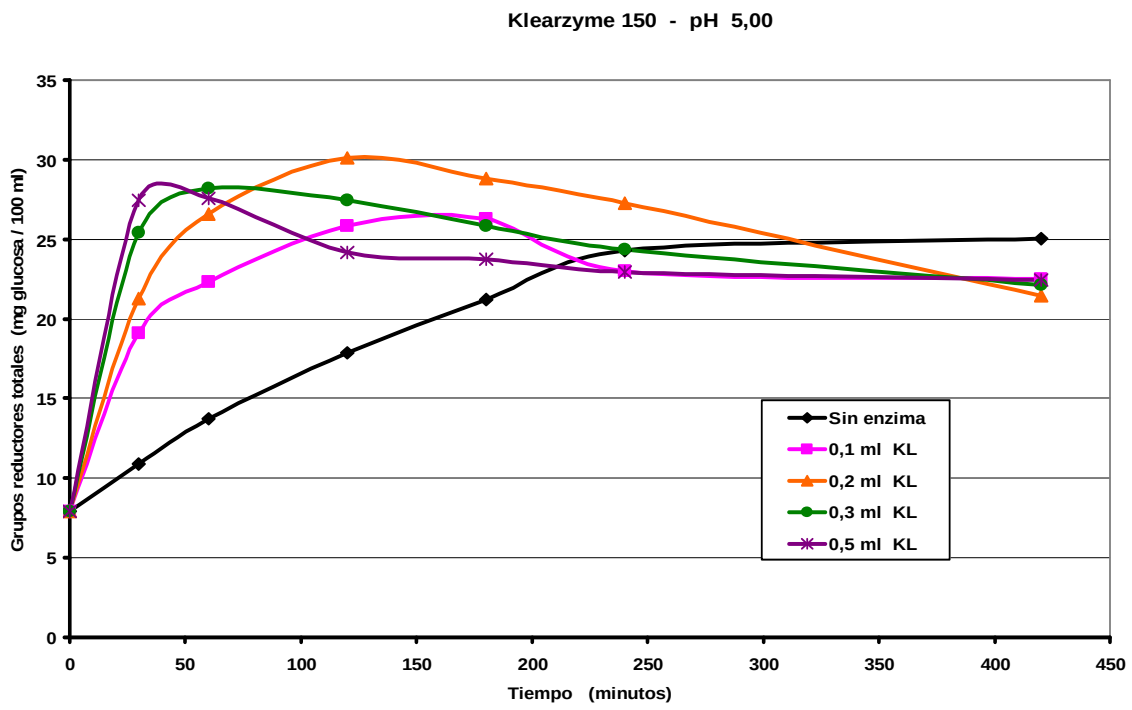


**Figura 2.** Curvas de hidrólisis a pH 5,00.

**Tabla 1.** Tiempos de reacción correspondientes a los valores máximos de grupos reductores (en las curvas de hidrólisis a pH 5,00).

| Cantidad de enzima (ml) | Tiempo del valor máximo (min) |
|---|---|
| 0,1 | 180 |
| 0,2 | 120 |
| 0,3 | 60 |
| 0,5 | 30 - 60 |

Este último comportamiento puede ser causado por reacciones secundarias que consumen los grupos reductores formados durante la hidrólisis, entre las que pueden citarse la reacción inversa de

glicosilación y la reacción entre grupos reductores y grupos amino (de las proteínas, péptidos y aminoácidos extraídos). En ambos casos la bibliografía menciona un cierto grado de catálisis ácida, lo que explicaría que el fenómeno sea más destacado a pH 5,00 que a pH 6,50 (solamente se presenta en la curva correspondiente a 0,5 ml de enzima). Así, se ha verificado la formación de "productos de reversión" (reformación de enlaces glicosídicos) durante la hidrólisis enzimática o ácida de oligo y polisacáridos y la formación de glicosilaminas N – sustituidas por reacción de carbohidratos reductores con grupos amino de aminoácidos, péptidos o proteínas, siempre que el medio no sea muy diluido ni muy ácido (Hodge y Osman 1976).
Por otra parte, en ambas figuras se verifica visualmente que la velocidad inicial de reacción aumenta con la cantidad de enzima utilizada. Además, al comparar las velocidades iniciales a iguales concentraciones enzimáticas resulta que los valores obtenidos a pH 5,00 en todos los casos son mayores a los correspondientes a pH 6,50. Para hacer una estimación numérica se tomó la pendiente de los segmentos determinados por el valor inicial (t = 0) y el correspondiente a 30 min como una aproximación de la velocidad inicial de hidrólisis, ya que el procedimiento adoptado no permitía tomar muestras y procesarlas con tiempos despreciables respecto al tiempo de reacción. En la **Figura 3** se pueden apreciar los valores puntuales de velocidad inicial estimada (expresada en miligramos de glucosa por 100 ml de mezcla y por minuto de reacción) en función de la cantidad de enzima. Es evidente que la velocidad inicial de hidrólisis está influenciada por la cantidad de enzima empleada y por el pH de reacción. El primer efecto es conocido dentro de la cinética enzimática cuando se trabaja con concentraciones de sustrato constantes o muy altas; al respecto, se puede suponer que en todas las experiencias hay aproximadamente igual concentración de polisacáridos en la mezcla, ya que se realizaron con igual cantidad de soja y agua y en idénticas condiciones de trabajo. Las mayores velocidades iniciales a pH 5,00 se explican al considerar que esta enzima tiene máxima actividad en el rango de pH entre 3,0 y 6,0 y que la mayoría de las polisacarasas presentan un óptimo a pH 4,5 - 5,0.

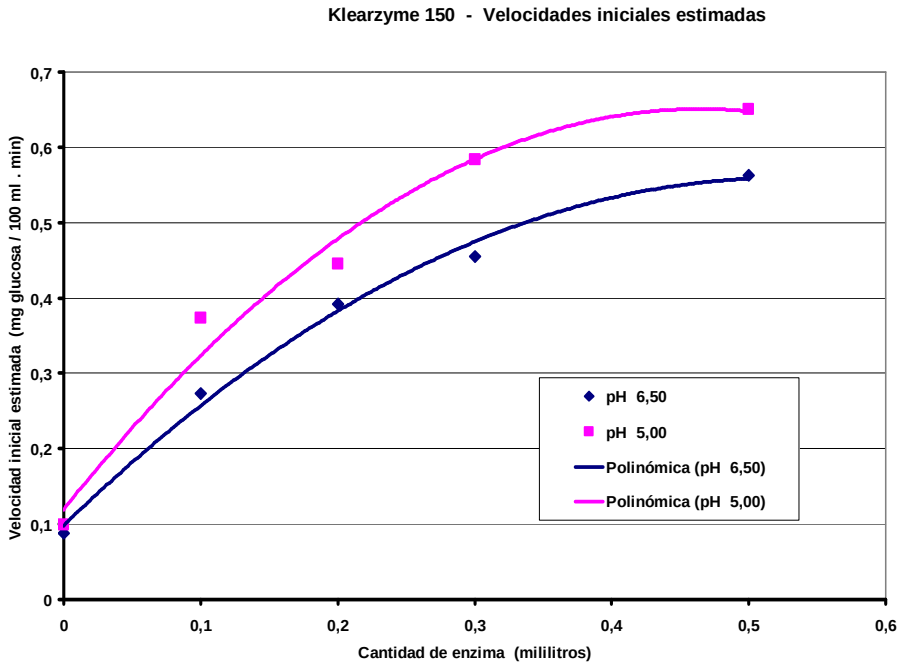


**Figura 3.** Velocidades iniciales estimadas de hidrólisis.

## Grado de hidrólisis en experiencias de extracción

A fin de estudiar la influencia de los factores seleccionados (cantidad de enzima y pH) se consideró la concentración de grupos reductores en fase líquida (extracto o leche de soja) como respuesta representativa del avance de la hidrólisis enzimática, En tal sentido, los resultados obtenidos como consecuencia de la aplicación del diseño de experiencias se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Resultados experimentales correspondientes a la preparación de leche de soja.

| Experiencias | Bloques | pH | C.Enz. | GRED.ext |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 6,50 | 0,2 | 25,04 |
| 2 | 1 | 5,00 | 0 | 16,67 |
| 3 | 1 | 5,75 | 0,1 | 23,44 |
| 4 | 2 | 6,50 | 0,1 | 22,93 |
| 5 | 2 | 5,75 | 0 | 16,34 |
| 6 | 2 | 5,00 | 0,2 | 28,06 |
| 7 | 3 | 5,75 | 0,2 | 26,59 |
| 8 | 3 | 5,00 | 0,1 | 23,60 |
| 9 | 3 | 6,50 | 0 | 12,94 |
| 10 | 4 | 6,50 | 0,2 | 23,16 |
| 11 | 4 | 5,00 | 0 | 14,46 |
| 12 | 4 | 5,75 | 0,1 | 21,04 |
| 13 | 5 | 6,50 | 0,1 | 22,58 |
| 14 | 5 | 5,75 | 0 | 14,76 |
| 15 | 5 | 5,00 | 0,2 | 27,73 |
| 16 | 6 | 5,75 | 0,2 | 29,21 |
| 17 | 6 | 5,00 | 0,1 | 24,41 |
| 18 | 6 | 6,50 | 0 | 14,87 |

Referencias:
Experiencias : número de orden de las corridas experimentales.
Bloques : número de orden de los bloques de corridas experimentales.
C.Enz. : cantidad de enzima utilizada (mililitros).
GRED.ext : concentración de grupos reductores del extracto (mg glucosa / 100 ml mezcla).

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente y la superficie de respuesta correspondiente se puede apreciar en la **Figura 4**.

**GRED.ext = - 4,68898 + 8,86148*pH + 78,8056*Con Enz - 0,934815*pH^2 + 3,98889*pH*Con Enz - 218,083*Con Enz^2**

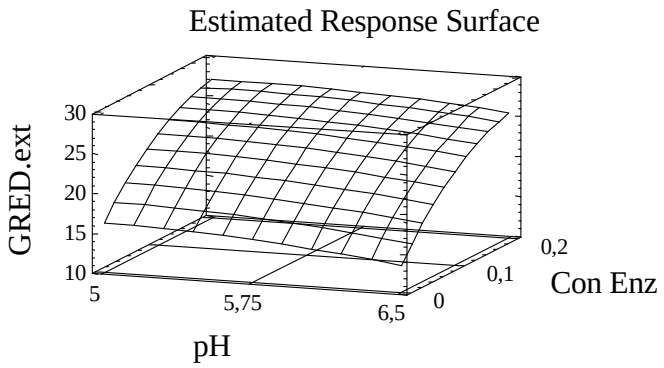


**Figura 4.** Superficie de respuesta correspondiente a la concentración de grupos reductores del extracto (mg glucosa / 100 ml mezcla).

Los valores de los estadísticos P-Valor y $R^2$ del análisis de varianza del diseño se resumen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Análisis de varianza del diseño.

| Respuesta | pH (A) | | Cant. Enzima (B) | | Interacción | Coef. $R^2$ ajustado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | $A^2$ | B | $B^2$ | AB | |
| Grupos Reductores | **0,2678**(1) | **0,1865**(1) | **0,0280**(1) | **0,0005**(1) | **0,4322**(1) | 98,8996 |

(1) **P-Valor** < 0,05 → Diferencia significativa.

En primer lugar se destaca que la concentración de grupos reductores formados por la actividad enzimática depende significativamente de la cantidad de enzima y su cuadrado, pero no hay influencia significativa del pH ni interacción de dichos factores.
El Análisis de Varianza Multifactorial de la concentración de grupos reductores en el extracto (**Tablas 4** y **5**) muestra:
- Gran variación de la respuesta con la cantidad de enzima, a tal punto que hay diferencias significativas entre los tres niveles de este factor. Este resultado es bien conocido a bajas concentraciones enzimáticas y ya fue destacado durante el análisis de las curvas de hidrólisis. Al respecto, hay buena coincidencia entre los valores promedio de grupos reductores medidos en estos ensayos con los determinados previamente al construir las curvas de hidrólisis, para iguales condiciones (pH 6,50 y 5,00, 60 min, sin enzima, con 0,1 y 0,2 ml de la misma).
- Dicha concentración es inversamente proporcional al pH, efecto que corresponde a la mayor actividad de la enzima al pasar de pH aproximadamente neutro a medianamente ácido (al respecto debe recordarse que el rango óptimo de pH es 3,0 - 6,0). A pesar de que sólo hay diferencia significativa entre las experiencias cumplidas a pH 6,50 y 5,00, resulta bastante clara la tendencia de los valores medios.

**Tabla 4.** Comparación de Medias. ANOVA Multifactorial en función de la cantidad de enzima.

| Cantidad de enzima | Grupos reductores del extracto Valores medios | |
|---|---|---|
| 0 ml | 15,0067 | a |
| 0,10 ml | 23,0000 | b |
| 0,20 ml | 26,6317 | c |

Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,05)

**Tabla 5.** Comparación de Medias**.** ANOVA Multifactorial en función del pH.

| pH | Grupos reductores del extracto Valores medios | |
|---|---|---|
| 5,00 | 22,4883 | a |
| 5,75 | 21,8967 | a b |
| 6,50 | 20,2533 | b |

Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0,05)

## CONCLUSIONES

La actividad de la enzima ensayada sobre los polisacáridos de soja se manifiesta claramente en las curvas de hidrólisis y en las experiencias de obtención de leche de soja, lo que permite considerarla como una alternativa tecnológica en procesos extractivos acuosos como la obtención de leche de soja o la extracción simultánea de aceite y proteínas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del Proyecto CAI + D 2005 "Obtención de leche de soja por hidrólisis enzimática de componentes insolubles" por parte de la Universidad Nacional del Litoral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Domínguez H, Núñez M J y Lema J M. 1993. Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables. Food Chemistry 46: 277 - 284.

Domínguez H, Núñez M J y Lema J M. 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. Food Chemistry 49 (3): 271 - 286.

Eriksen S. 1983. Application of enzymes in soy milk production to improve yield. Journal of Food Science 48: 445 - 447.

Hodge J E y Osman E M. 1976. Carbohydrates. En: Fennema O R, editor. Principles of food science. Part I. Food chemistry. 1ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc. pág 58 – 62.

Miller G L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31 (3): 426 - 428.

Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K, Gilmour S y Trinca L. 2001. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. Enzyme and Microbial Technology 28 (6): 449 - 509.

# Influencia de la hidrólisis enzimática de polisacáridos en la extracción acuosa de sólidos y proteínas de soja

# Effect of the enzymatic hydrolysis of polysaccharides on the aqueous extraction of soy solids and proteins

Andrich OD, Aríngoli EE

Instituto de Tecnología de Alimentos – Fac.de Ingeniería Química – Universidad Nac. del Litoral
oandrich@unl.edu.ar

## RESUMEN

Los métodos tradicionales de obtención de leche de soja y sus variantes consisten en un proceso extractivo acuoso de proteínas, aceite, carbohidratos solubles, sales y componentes menores, seguido de la separación fase líquida (extracto o leche de soja) - residuo húmedo (okara). Por otra parte, la "extracción simultánea" o "procesamiento acuoso" de materias primas oleaginosas se puede sintetizar como la obtención de aceite y proteínas en distintos puntos de un único esquema de proceso, cuyas etapas iniciales de extracción y centrifugación llevan a una fase acuosa, una emulsión y un residuo húmedo. En ambos casos se generan residuos con composición y características muy similares, constituidos por polisacáridos insolubles y proteínas de alto peso molecular, que retienen importantes proporciones de líquido, determinando rendimientos medianos y bajos de extracción y presentando problemas de conservación y/o disposición de los mismos por ser material húmedo altamente perecedero. En un trabajo previo se estudió la actividad de una pectinasa con acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc) sobre los polisacáridos insolubles de soja, la cual potencialmente podría aplicarse en los procesos extractivos mencionados. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la hidrólisis enzimática de los polisacáridos de soja sobre la etapa de extracción acuosa de sólidos en general y de proteínas en particular. Se realizaron experiencias de extracción con la siguiente metodología: remojo del poroto entero, escurrimiento, molienda húmeda en caliente, hidrólisis enzimática en distintas condiciones de pH y cantidad de enzima empleada, filtración. Se determinaron las concentraciones de sólidos totales y proteínas en el extracto y las masas de extracto (leche de soja) y residuo (okara). Se aplicó un diseño factorial $3^2$ en bloques, con una repetición. Los valores experimentales fueron ajustados con un modelo polinómico de segundo orden. Todas las respuestas fueron significativamente dependientes en forma cuadrática del pH, pero sin influencia significativa de la cantidad de enzima ni interacción de dichos factores. La comparación de medias por Análisis de Varianza Multifactorial mostró que las concentraciones de sólidos totales y proteínas del extracto, así como las masas de extracto y residuo presentaban diferencias significativas con los tres niveles de pH. Ello se debe al incremento de insolubilidad de las proteínas de soja a pH ácidos. A pesar de no ser un factor significativo, se pueden destacar varios efectos favorables de la acción enzimática: aumento de la concentración de proteínas del extracto, aumento de la masa de extracto, tendencia de aumento de la concentración de proteínas en base seca del extracto. Por lo tanto, la enzima ensayada debe utilizarse a pH aproximadamente neutro a fin de lograr los efectos positivos mencionados, ya que a pH ácidos los mismos son enmascarados por la insolubilización de las proteínas

## ABSTRACT

Traditional methods for obtaining soymilk and their derivatives consist in an aqueous step for extracting proteins, oil, soluble carbohydrates, salts and minor components, followed by the separation liquid phase (extract or soymilk) - wet residue (okara). "Simultaneous extraction" or "aqueous processing" of oilseed raw materials, on the other hand, may be summarized as the production of oil and proteins in different points of a unique process, whose initial extraction and centrifugation steps lead to an aqueous phase, an emulsion and a wet residue. Residues with very similar composition and characteristics, composed of insoluble polysaccharides and high molecular weight proteins, are produced in both cases. They retain important proportions of liquid, thus determining medium and

low extraction yields and presenting problems of conservation and/or disposal since they are highly perishable wet materials. In a previous work, the activity of a multiple action pectinase (polygalaturonase, methylpolygalacturonase, etc) on the insoluble soy polysaccharides was studied, which could potentially be applied in the above mentioned extractive processes. The objective of this work was, then, to evaluate the effect of the enzymatic hydrolysis of soy polysaccharides on the aqueous extraction of solids and proteins. Extraction experiences were performed with the following methodology: soaking of soy beans, draining, hot wet milling, enzymatic hydrolysis under different conditions of pH and enzyme dose, and filtration. Concentration of total solids and proteins in the extract and masses of extract (soymilk) and residue (okara) were determined. A factorial design in blocks $3^2$, with one replication, was applied. Experimental values were adjusted with a second order polynomial model. All responses were significantly dependent on pH and its second power, but not on enzyme dose and the interactions. Comparison of means by multifactor ANOVA showed that total solids and protein concentrations of the extract as well as extract and residue masses presented significant differences with the three levels of pH, due to a higher insolubility of soy proteins with acid pH. Although enzymatic action was not a significant factor, some positive effects can be pointed out: higher protein concentration of the extract, higher mass of the extract, and tendency to higher dry basis protein concentration of the extract. Therefore, in order to obtain the mentioned positive effects, the assayed enzyme must be applied near neutral pH since at acid pH they are obscured by protein insolubilization.

**PALABRAS CLAVE**: *hidrólisis enzimática, polisacáridos, extracción acuosa, soja.*

**KEYWORDS**: *enzymatic hydrolysis, polysaccharides, aqueous extraction, soy.*

## INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales de obtención de leche de soja y sus variantes consisten en un proceso extractivo acuoso de proteínas, aceite, carbohidratos solubles, sales y componentes menores, seguido de la separación fase líquida (extracto o leche de soja) - residuo húmedo (okara). Por otra parte, la "extracción simultánea" o "procesamiento acuoso" de materias primas oleaginosas se puede sintetizar como la obtención de aceite y proteínas en distintos puntos de un único esquema de proceso, cuyas etapas iniciales de extracción y centrifugación llevan a una fase acuosa, una emulsión y un residuo húmedo.

En ambos casos se generan residuos con composición y características muy similares, constituidos por polisacáridos insolubles y proteínas de alto peso molecular, que retienen importantes proporciones de líquido, determinando rendimientos medianos y bajos de extracción y presentando problemas de conservación y/o disposición de los mismos por ser material húmedo altamente perecedero.

La hidrólisis enzimática ha sido propuesta para mejorar la extracción sólido / líquido con diversos objetivos: aumento de rendimiento de componentes extraíbles, mejores propiedades de los mismos, disminución de masa de residuo, reducción de efluentes y de sus costos de tratamiento, etc. Específicamente Eriksen (1983) ensayó varias enzimas en la elaboración de leche de soja a partir de harina entera tostada, en tanto que diversos autores estudiaron la acción enzimática sobre distintas materias primas oleaginosas (incluida la soja) para aumentar el rendimiento de extracción de aceite, con resultados variables (Domínguez *et al.* 1993, Domínguez *et al.* 1994, Rosenthal *et al.* 2001).

En un trabajo previo se analizó la actividad de una pectinasa con acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc) sobre los polisacáridos insolubles de soja, la cual potencialmente podría aplicarse en los procesos extractivos mencionados. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la hidrólisis enzimática de los polisacáridos de soja sobre la etapa de extracción acuosa de sólidos en general y proteínas en particular.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Porotos de soja [Glycine max (L)] limpios y seleccionados, de grado alimenticio. Humedad 6,38 %, Proteínas (N x 6,25) 34,0 %, Grasa 21,9 %, Cenizas 4,9 %.

Enzima pectinasa Klearzyme 150 (Gist Brocades) de acción múltiple (poligalacturonasa, metilpoligalacturonasa, etc), con actividad entre 10 y 50 ºC y pH 3,0 y 6,0.

## Métodos

Preparación de leche de soja: 1) Remojo de 20 ± 0,1 g de porotos enteros por 8 h; 2) Escurrimiento; 3) Molienda húmeda en caliente y ajuste de masa total a 200 ± 0,1 g (relación S/L 1/9); 4) Termostatización a 45 ºC y ajuste de pH; 5) Hidrólisis enzimática por 1 hora; 6) Filtración por doble tela, pesado de leche y okara y toma de muestras.

## Determinaciones analíticas

Masas por pesada con precisión 0,01 g; sólidos totales por secado a 100 – 105 ºC durante 24 h; proteínas (N x 6,25) por macro Kjeldahl.

## Análisis estadístico

Diseño estadístico de experiencias (preparación de leche de soja): diseño factorial en bloques de dos factores y tres niveles (pH 5,00 - 5,75 - 6,50; cantidad de enzima 0 - 0,10 - 0,20 ml), con una repetición; parámetros fijos (temperatura de reacción 45 ºC, tiempo de reacción 1 h), ajuste con modelo polinómico de segundo orden. ANOVA del diseño experimental y ANOVA multifactorial de las respuestas (concentraciones de componentes y masas) al nivel de significación del 5 %. Procesamiento de datos mediante el programa STATGRAPHICS Plus 3.0.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A fin de estudiar la influencia de los factores seleccionados (cantidad de enzima y pH) sobre la extracción acuosa de soja se consideró la concentración de sólidos totales, de proteínas y de proteínas en base seca en fase líquida (extracto o leche de soja) y las masas de extracto y de residuo húmedo (okara) como respuestas representativas. Al respecto, los resultados obtenidos como consecuencia de la aplicación del diseño de experiencias se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Resultados experimentales correspondientes a la preparación de leche de soja.

| Experiencias | Bloques | pH | C.Enz. | STOT.ext | PROT.ext | PBS.ext | MAS.ext | MAS.res |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 6,50 | 0,2 | 6,448 | 3,032 | 47,0 | 174,33 | 24,23 |
| 2 | 1 | 5,00 | 0 | 2,706 | 0,831 | 30,7 | 145,57 | 45,95 |
| 3 | 1 | 5,75 | 0,1 | 5,767 | 2,613 | 45,3 | 162,92 | 33,00 |
| 4 | 2 | 6,50 | 0,1 | 6,696 | 2,850 | 42,6 | 173,59 | 23,61 |
| 5 | 2 | 5,75 | 0 | 5,344 | 2,392 | 44,8 | 157,29 | 37,20 |
| 6 | 2 | 5,00 | 0,2 | 2,592 | 0,758 | 29,2 | 145,89 | 47,91 |
| 7 | 3 | 5,75 | 0,2 | 5,750 | 2,658 | 46,2 | 164,80 | 29,88 |
| 8 | 3 | 5,00 | 0,1 | 2,529 | 0,787 | 31,1 | 146,79 | 45,53 |
| 9 | 3 | 6,50 | 0 | 6,587 | 2,686 | 40,8 | 172,90 | 24,99 |
| 10 | 4 | 6,50 | 0,2 | 6,666 | 3,020 | 45,3 | 172,35 | 23,99 |
| 11 | 4 | 5,00 | 0 | 2,778 | 0,852 | 30,7 | 138,09 | 48,26 |
| 12 | 4 | 5,75 | 0,1 | 6,026 | 2,705 | 44,9 | 167,10 | 29,20 |
| 13 | 5 | 6,50 | 0,1 | 6,745 | 3,039 | 45,1 | 172,78 | 23,57 |
| 14 | 5 | 5,75 | 0 | 5,375 | 2,371 | 44,1 | 162,88 | 34,95 |
| 15 | 5 | 5,00 | 0,2 | 2,698 | 0,830 | 30,8 | 147,28 | 48,09 |
| 16 | 6 | 5,75 | 0,2 | 5,995 | 2,690 | 44,9 | 166,84 | 28,98 |
| 17 | 6 | 5,00 | 0,1 | 2,757 | 0,813 | 29,5 | 149,19 | 46,07 |
| 18 | 6 | 6,50 | 0 | 6,511 | 2,843 | 43,7 | 172,74 | 25,46 |

Referencias:
Experiencias : número de orden de las corridas experimentales.
Bloques : número de orden de los bloques de corridas experimentales.
C.Enz. : cantidad de enzima utilizada (mililitros).
STOT.ext. : concentración de sólidos totales del extracto (%).
PROT.ext. : concentración de proteínas del extracto (%).
PBS.ext. : concentración de proteína en base seca del extracto (%).
MAS.ext. : masa de extracto (gramos).
MAS.res : masa de residuo (gramos).

Los valores de los estadísticos P-Valor y $R^2$ del análisis de varianza del diseño se resumen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2**. Análisis de varianza del diseño.

| Respuesta | pH (A) | | Cant. Enzima (B) | | Interacción | Coef. $R^2$ ajustado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | $A^2$ | B | $B^2$ | AB | |
| Sólidos Totales | **0,0000**(1) | **0,0000**(1) | **0,3758**(1) | **0,1990**(1) | **0,6249**(1) | 99,3278 |
| Proteínas | **0,0000**(1) | **0,0000**(1) | **0,7408**(1) | **0,1974**(1) | **0,3428**(1) | 99,6279 |
| Proteína en Base Seca | **0,0000**(1) | **0,0000**(1) | **0,1576**(1) | **0,8722**(1) | **0,1232**(1) | 98,3074 |
| Masa de Extracto | **0,0045**(1) | **0,0119**(1) | **0,2084**(1) | **0,1685**(1) | **0,4235**(1) | 97,3677 |
| Masa de Residuo | **0,0027**(1) | **0,0070**(1) | **0,9061**(1) | **0,1457**(1) | **0,6569**(1) | 98,0045 |

(1) **P-Valor** < 0,05 → Diferencia significativa.

El Análisis de Varianza del diseño experimental muestra que todas las respuestas determinadas dependen significativamente del pH y su cuadrado, sin influencia significativa de la cantidad de enzima ni de la interacción de factores. Al respecto, las superficies de respuesta correspondientes a la concentración de sólidos totales del extracto (**Figura 1**) y concentración de proteínas del extracto (**Figura 2**) son demostrativas de ello.

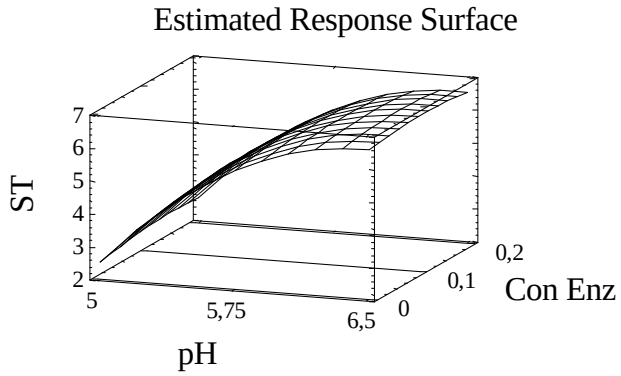


**Figura 1.** Superficie de respuesta correspondiente a la concentración de sólidos totales del extracto (%).

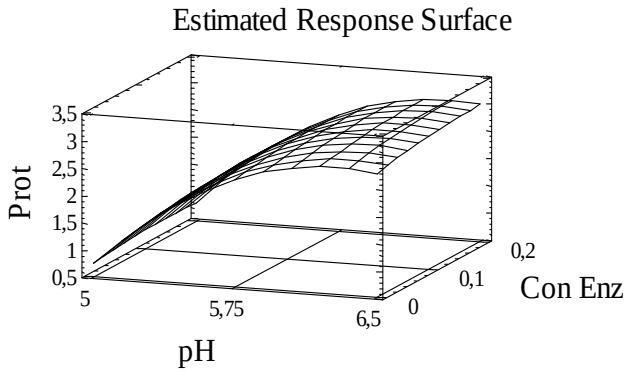


**Figura 2.** Superficie de respuesta correspondiente a la concentración de proteínas del extracto (%).

El Análisis de Varianza Multifactorial en función de la cantidad de enzima empleada y del pH se detalla en las **Tablas 3** y **4** respectivamente.

**Tabla 3.** Comparación de Medias. ANOVA Multifactorial en función de la cantidad de enzima.

| Cantidad de enzima | Sólidos totales del extracto Valores medios | Proteínas del extracto Valores medios | Proteínas en base seca Valores medios | Masa del extracto Valores medios | Masa del residuo Valores medios |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 ml | 4,8835 a | 1,9958 a | 39,1333 a | 158,245 a | 36,1350 a |
| 0,10 ml | 5,0867 a | 2,1345 b | 39,7500 a | 162,062 b | 33,4967 b |
| 0,20 ml | 5,0248 a | 2,1647 b | 40,5667 a | 161,915 b | 33,8467 a b |

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

**Tabla 4.** Comparación de Medias. ANOVA Multifactorial en función del pH.

| pH | Sólidos totales del extracto Valores medios | Proteínas del extracto Valores medios | Proteínas en base seca Valores medios | Masa del extracto Valores medios | Masa del residuo Valores medios |
|---|---|---|---|---|---|
| 5,00 | 2,6767 a | 0,8118 a | 30,3333 a | 145,468 a | 46,9683 a |
| 5,75 | 5,7095 b | 2,5715 b | 45,0333 b | 163,638 b | 32,2017 b |
| 6,50 | 6,6088 c | 2,9117 c | 44,0833 b | 173,115 c | 24,3083 c |

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Analizando cada respuesta por separado se puede destacar:

1) La concentración de sólidos totales extraídos en el plazo de 1 h prácticamente no está influenciada por la cantidad de enzima, ya que no hay diferencias significativas entre las medias. La interpretación de estos resultados es que el grado de hidrólisis alcanzado no se manifiesta en una mayor proporción de sólidos solubles y dispersos (incluido el aceite emulsionado).

Sin embargo, dicha concentración de sólidos disminuye marcadamente con el descenso de pH, siendo significativamente diferentes las tres medias comparadas. Como se analiza en el punto siguiente, la variación de la solubilidad de las proteínas con el pH es el factor principal que modifica la extracción total.

2) Se nota una mayor extracción proteica con los dos niveles de enzima ensayados (0,1 y 0,2 ml) en comparación con la experiencia sin enzima, pero no hay diferencia significativa entre dichos niveles.

Por otra parte, la disminución de la concentración de proteínas es muy marcada entre pH 5,75 y 5,00, siendo los tres promedios significativamente diferentes. Este comportamiento se explica al analizar la clásica curva de solubilidad de las proteínas de soja en función del pH (Wolf 1972), en la cual se observa aproximadamente el 80 % de solubilidad a pH 6,50, el 40 % a pH 5,75 y solamente el 12 % soluble a pH 5,00.

Aunque las condiciones de trabajo fueron distintas, Eriksen (1983) encontró efectos similares del pH (para harina entera tostada, proteasa neutra - beta glucanasa y pH entre 6,0 y 8,0) y de la dosis de una enzima experimental sobre el Índice de Solubilidad Proteica.

También Rosenthal *et al.* (2001) determinaron menores rendimientos de extracción proteica con celulasa (a pH 5,0) que en las experiencias sin enzima, justificando ello por la cercanía de dicho pH con el punto isoeléctrico de las proteínas de soja (pH aproximadamente 4,5).

3) A pesar de no haber diferencias significativas, se observa una tendencia creciente aproximadamente lineal de la concentración de proteínas en base seca con el agregado de enzima.

Esta concentración presenta diferencia significativa entre el valor medio de las experiencias realizadas a pH 5,00 (aproximadamente 30 % PBS) con las medias de los otros niveles (aproximadamente 44 – 45 % PBS). La marcada insolubilización de las proteínas de soja a pH 5,00 determina esta importante disminución en la relación Proteínas / Sólidos Totales, ya que a dicho pH se extrae todavía una

proporción importante de sólidos no proteicos. Por otra parte, la casi coincidencia de promedios y dispersiones a pH 6,50 y 5,75 significa que dicha relación se ha mantenido constante a pesar de haber disminuido ambas concentraciones por separado.

4) La masa de extracto aumenta levemente con el agregado de enzima (diferencia significativa entre las experiencias sin y con tratamiento enzimático), destacándose que los promedios y dispersiones son prácticamente coincidentes al comparar los agregados de 0,1 y 0,2 ml de enzima.

Además, dicha masa también disminuye con el descenso de pH, presentando diferencias significativas entre los tres niveles ensayados.

5) Con respecto a la masa de residuo húmedo, existe solamente diferencia significativa entre las experiencias sin enzima y con 0,1 ml. Sin embargo, la observación de las medias y sus dispersiones correspondientes permite destacar la tendencia de disminución de la masa de okara con el agregado de enzima.

Los tres valores medios de la masa de residuo son significativamente diferentes, aumentando con la disminución del pH. Dicho incremento se debe principalmente a la mayor cantidad de proteínas insolubles a medida que el pH se acerca al punto isoeléctrico, tal como se señaló previamente.

## CONCLUSIONES

A pesar de que la acción enzimática no es un factor significativo, se pueden destacar varios efectos favorables:

- aumento de la concentración de proteínas del extracto,
- aumento de la masa de extracto,
- tendencia de aumento de la concentración de proteínas en base seca del extracto,
- tendencia de disminución de la masa de residuo húmedo.

Sin embargo, la enzima ensayada debe utilizarse a pH aproximadamente neutro para lograr los efectos positivos mencionados, ya que a pH ácidos son enmascarados por la insolubilización de las proteínas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del Proyecto CAI + D 2005 “Obtención de leche de soja por hidrólisis enzimática de componentes insolubles” por parte de la Universidad Nacional del Litoral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Domínguez H, Núñez M J y Lema J M. 1993. Oil extractability from enzymatically treated soybean and sunflower: range of operational variables. Food Chemistry 46: 277 - 284.

Domínguez H, Núñez M J y Lema J M. 1994. Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. Food Chemistry 49 (3): 271 - 286.

Eriksen S. 1983. Application of enzymes in soy milk production to improve yield. Journal of Food Science 48: 445 – 447.

Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K, Gilmour S y Trinca L. 2001. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. Enzyme and Microbial Technology 28 (6): 449 - 509.

Wolf W J. 1972. Purification and properties of the proteins. En: Smith A K y Circle S J. Soybeans: chemistry and technology. Vol. 1. Proteins. 1ª ed. Westport: The AVI Publishing Company, Inc. pág 93 - 125.

# Estudio de la extracción de aceite de girasol y los compuestos minoritarios

# Study of the extraction of sunflower oil and minor compounds

Baümler ER, Crapiste GH, Carelli AA

PLAPIQUI - Universidad Nacional del Sur – CONICET
La Carrindanga Km 7, C.C. 717, 8000 - Bahía Blanca, Argentina.
ebaumler@plapiqui.edu.ar

## RESUMEN

La extracción de aceite es una operación de transferencia de masa en un sistema multicomponente, multifase y en estado transitorio. La composición del aceite cambia durante el proceso de extracción, siendo el extraído inicialmente de mayor calidad que la porción obtenida en las etapas finales. Cuando se pone en contacto la harina con solvente fresco tiene lugar el arrastre del aceite superficial por mecanismos no-difusivos, para tener en cuenta esta etapa inicial se propone la utilización de un modelo difusivo modificado. El mismo consistió en una modificación del modelo basado en la solución de la segunda ley de Fick de la difusión pura en estado no estacionario, donde intervienen los términos $M_t$ y $M_\infty$ que corresponden a las masas de sustancia que difunde en el tiempo t y tiempo infinito, los coeficientes del modelo involucran al coeficiente difusivo ($D_e$) y dependen de la forma geométrica de la partícula. En este trabajo se analizan algunos parámetros que influencian la velocidad de extracción de aceite y sus componentes minoritarios (fosfolípidos, tocoferoles y ceras) en expellers de girasol. Los ensayos cinéticos se realizaron en un reactor batch a 40, 50 y 60 °C, utilizando hexano como solvente. El aumento de la temperatura provocó un incremento en la velocidad de extracción del aceite, fosfolípidos, tocoferoles y ceras solubles y parcialmente solubles en el aceite (C34-C42). La difusividad aparente del aceite obtenida a partir de los parámetros del modelo modificado varió entre 1,36 $10^{-8}$ y 2,25 $10^{-8}$ $m^2/s$. Los fosfolípidos, en los ensayos realizados a 40 y 50 ºC, no presentaron la etapa de lavado, mientras que a 60 ºC esta etapa fue importante y la velocidad de extracción pudo ajustarse mediante el modelo difusivo modificado. Esto último puede ser debido al tratamiento térmico intensivo. Los valores de $D_e$ variaron entre 1,32 $10^{-9}$ y 4,23 $10^{-9}$ $m^2/s$. La extracción de los tocoferoles exhibe un comportamiento similar al aceite extrayéndose más rápidamente que los fosfolípidos. En efecto, el 99,5% de los tocoferoles y 66,5% de los fosfolípidos son removidos a 60 ºC y 30 minutos. Los valores de $D_e$ para los tocoferoles se hallaron entre 2,99 $10^{-9}$ y 1,24 $10^{-7}$ $m^2/s$. La velocidad de extracción de las ceras cristalizables (C44-C48) disminuye con el aumento de la temperatura. La curva cinética evidenció dos zonas, una rápida de absorción y una difusiva. Esta última se representó mediante el modelo difusivo modificado, los valores de $D_e$ estuvieron en los siguientes rangos: C44= 2,64 $10^{-9}$ - 8,86 $10^{-10}$ $m^2/s$, C46= 1,15 $10^{-8}$ – 6,48 $10^{-1}$0 y C48= 4,64 $10^{-9}$ - 8,82 $10^{-10}$ $m^2/s$.

## ABSTRACT

The oil extraction is a mass transference process that takes place in a multicomponent and multiphasic system that occurs in transitory state. The oil composition changes during the extraction process, showing the initially extracted portion major quality that the obtained in the final stages. When fresh solvent contacts the flour, the dragging of the superficial oil for non-diffusive mechanisms takes place. To keep in mind this initial stage, the utilization of a diffusive modified model was proposed. This model was a modification of the model based on the solution of the Fick's second law of the pure diffusion for non- stationary conditions. The terms $M_t$ and $M_\infty$ fit the masses of substance that spreads in the time t and infinite time. The coefficients of the model involve the diffusive coefficient ($D_e$) and depend on the geometric form of the particle. This work analyzes some parameters that influence the extraction of the oil and its minor compounds (phospholipids, tocopherols and waxes) in sunflower expellers. The kinetic essays were carried out at 40, 50 and 60°C, in a batch system, using hexane as solvent. The tocopherols extraction exhibits a similar behavior to the oil being extracted more rapidly than the phospholipids. In effect, 99.5 % of the tocopherols and 66.5 % of the phospholipids are removed at 60ºC and 30 minutes. A temperature increment caused a decrease in the extraction rate of

the crystallizable waxes (C44-C48). The kinetic curve evidenced two areas, a quick one of absorption and the other one of diffusion. The last one was represented by means of the diffusive modified model. The temperature rises caused an augment in the extraction rate of oil, phospholipids, tocopherols and soluble and partially-soluble waxes (C34-C42). The effective diffusivity coefficients ($D_e$) were between 1.36 $10^{-8}$ and 2.25 $10^{-8}$ $m^2/s$ for oil, 1.32 $10^{-9}$ and 4.23 $10^{-9}$ $m^2/s$ for phospholipids, 2.99 $10^{-9}$ and 1.24 $10^{-7}$ $m^2/s$ for tocopherols. For the waxes, this coefficients were between 2.64 $10^{-9}$ - 8.86 $10^{-10}$ $m^2/s$ for C44, 1.15 $10^{-8}$ - 6.48 $10^{-10}$ for C46 and 4.64 $10^{-9}$ - 8.82 $10^{-10}$ $m^2/s$ for C48.
When the phospholipids was considering, the essays carried out at 40ºC and 50ºC did not present a wash stage, whereas to 60ºC the modified model fitted better. The above mentioned can be due to the thermal intensive treatment.

**PALABRAS CLAVE**: *Aceite de girasol, extracción por solventes, tocoferoles, fosfolípidos, ceras.*

**KEYWORDS**: *sunflower oil, solvent extraction, tocopherols, phospholipids, waxes.*

## INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de la ingeniería, la extracción sólido-líquido es una operación de transferencia de masa en un sistema multicomponente, multifásico y en estado transitorio. El proceso involucra la transferencia de más de una especie química, soluto, desde un sólido hacia un solvente (Aguilera 2003).

El proceso de extracción puede ser afectado por muchas variables físicas y químicas, las cuales suelen ser difíciles de evaluar cuanti y cualitativamente (Xu y Diosady 2003). Numerosos investigadores han tratado de describir estos procesos usando modelos teóricos basados en la teoría de difusión. Para representar la velocidad de extracción también se han propuesto ecuaciones empíricas basadas en experiencias (Karnofsky 1986, Karnofsky 1987). De acuerdo a algunos autores (King *et al.* 1944) las ecuaciones teóricas fallan al tratar de explicar el fenómeno solamente por simple teoría de difusión. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos se aplican modelos basados en la solución de las ecuaciones de difusión para representar el proceso.

La calidad y estabilidad del aceite de girasol se ven afectadas por la presencia de algunos componentes minoritarios, como tocoferoles, ceras y fosfolípidos. Es notorio que los estudios de extracción por solvente han sido casi exclusivamente tendientes a obtener el máximo rendimiento del aceite, sin tener en cuenta la calidad del aceite obtenido. La composición del aceite extraído cambia durante el proceso de extracción, desde triglicéridos casi puros a fracciones conteniendo cantidades crecientes de material no glicérido levemente soluble. Por lo tanto, el aceite extraído inicialmente es de mayor calidad que la pequeña porción extraída en las etapas finales (Karnofsky 1949).

En este trabajo se estudia el fenómeno de transporte del proceso de extracción y se propone un modelo de extracción de aceite y sus componentes minoritarios (fosfolípidos, tocoferoles y ceras) en expellers de girasol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron expellers de girasol provistos por una empresa local. Se determinó el contenido de humedad y aceite según normas AOCS Ba 2b-82 y AOCS Ai 3-75 (AOCS 1993).

Se obtuvieron curvas de extracción de aceite de girasol en hexano a 40, 50 y 60 ºC mediante un sistema “batch” agitado. Se sometieron a extracción muestras de aproximadamente 8-10 g de “expeller” de girasol con 180 mL de hexano grado técnico. Se utilizó una relación mL de hexano/peso de sólido elevada para despreciar efectos de restricción de volumen.

El contenido de tocoferoles en las muestras de aceite se determinó mediante HPLC y detector de fluorescencia según normas IUPAC 2.432 (IUPAC 1992). El contenido y perfil de fosfolípidos se determinó por SPE-HPLC según el método propuesto por Carelli *et al.* (1997). El contenido de ceras se determinó por cromatografía gaseosa capilar previa separación de la fracción de ceras por cromatografía de columna de gel de sílice hidratado, basándose fundamentalmente en la norma para aceites de oliva (Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1993).

## Modelo matemático

La solución de la segunda ley de Fick de la difusión pura en estado no estacionario para partículas suspendidas en un medio homogéneo de concentración constante, sin restricción de volumen, puede expresarse como, (Crank 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} A_n \exp(-B_n t)$$

donde $M_t$, y $M_\infty$ representan la masa de sustancia que difunde en el tiempo t y en el tiempo infinito (kg de aceite/kg de sólido inerte), t es el tiempo de difusión (s), $A_n$ y $B_n$ son coeficientes del modelo que involucran al coeficiente difusivo y dependen de la forma geométrica de la partícula.

Cuando se pone en contacto la harina con el solvente fresco, que inicialmente no contiene aceite, tienen lugar una serie de fenómenos como el lavado o arrastre del aceite superficial. La saturación del solvente provoca una modificación de la estructura y el desplazamiento de parte de la miscela por mecanismos no-difusivos. Para tener en cuenta esta etapa inicial de lavado se propone la utilización del siguiente modelo difusivo modificado (Pérez 2002):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) \sum_{n=0}^{\infty} A_n \exp[-B_n (t - t_0)]$$

donde $M_0$ representa la masa de sustancia que difunde en la etapa de lavado y $t_0$ es el tiempo correspondiente a esa etapa.

Para tiempos suficientemente largos la solución se puede aproximar al primer término de la serie:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left(1 - \frac{M_0}{M_\infty}\right) A_1 \exp[-B_1 (t - t_0)]$$

$$A_1 = \frac{4}{R^2 \lambda_1^2}$$

$$B_1 = D_e \lambda_1^2$$

$$\lambda_1 = raices\ de\ J_0(R\,\lambda_1) = 0$$

Los valores de las constantes $A_1$, $B_1$ para cada temperatura fueron determinados utilizando un procedimiento de regresión no lineal, perteneciente a un programa de análisis gráfico estadístico Sigma Plot for Windows Version 8.01 (2002 SPSS Inc.).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Extracción de aceite

Para representar la velocidad de extracción se utilizó el modelo difusivo modificado propuesto por Pérez (2002). En la **Tabla 1** se muestran los coeficientes del ajuste para las distintas temperaturas. En la **Figura 1** se comparan los resultados experimentales de extracción con las curvas de ajuste para las distintas temperaturas de ensayo. Se observa que el modelo difusivo puro no representa adecuadamente el fenómeno de extracción. Tampoco se obtendría una mejora al utilizar un modelo de control mixto, dado que el grado de agitación usado permite despreciar la resistencia convectiva a la transferencia de masa. Al utilizar el modelo difusivo modificado los coeficientes de correlación mejoraron.

La extracción de los triglicéridos aumenta rápidamente al inicio, este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que la primera etapa corresponde al proceso de lavado del aceite superficial del expeller y de las estructuras celulares afectadas por los tratamientos previos. La velocidad de extracción más alta corresponde a las partículas que sufren la rotura completa de la pared celular, y la capa de citoplasma se encuentra expuesta directamente al solvente. Aguilera (2003) indica que esta etapa quita aproximadamente el 20% del soluto en forma casi instantánea. En cambio Pérez (2002), analizando la extracción de aceite de girasol, obtuvo que esta etapa remueve aproximadamente entre el

48 y 72% del soluto dependiendo de las relaciones solvente-harina, encontrando mayores valores cuando la proporción del solvente es superior. Los resultados obtenidos muestran que en magnitud la etapa inicial es más importante que la difusional, eliminando aproximadamente el 60% del aceite.
La segunda etapa se caracteriza por un aumento asintótico del rendimiento, luego la extracción prosigue por un mecanismo difusivo, que corresponde a la etapa lenta del proceso. Esta fase corresponde a la extracción del soluto desde las células intactas. En teoría, si todas las células se encontraran intactas las curvas comenzarían a partir de concentración cero, es decir que no habría etapa de lavado, y el tiempo necesario para lograr la remoción del soluto aumentaría considerablemente (Aguilera 2003).

**Tabla 1.** Ajuste de la ecuación del modelo difusivo puro y modificado aplicado a la cinética de extracción de aceite.

| Temperatura (ºC) | A | B | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| | | **Modelo Difusivo Puro** | |
| 40 | 0,6917 | $2{,}005\ 10^{-3}$ | 0,880 |
| 50 | 0,6917 | $2{,}468\ 10^{-3}$ | 0,874 |
| 60 | 0,6917 | $2{,}973\ 10^{-3}$ | 0,914 |
| | | **Modelo Difusivo Modificado** | |
| 40 | 0,455 | $8{,}794\ 10^{-4}$ | 0,994 |
| 50 | 0,436 | $1{,}090\ 10^{-3}$ | 0,995 |
| 60 | 0,413 | $1{,}460\ 10^{-3}$ | 0,992 |

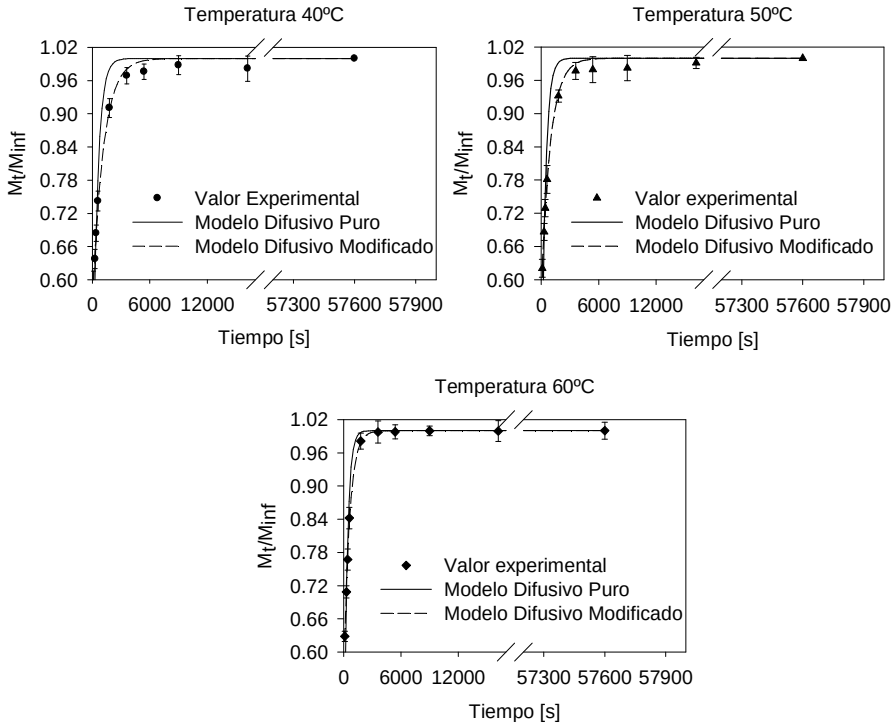


**Figura 1**. Cinética de la extracción del aceite de girasol.

Los valores de los coeficientes difusivos, determinados a partir de los modelos de ajuste fueron 1,36 $10^{-8}$, 1,68 $10^{-8}$, y 2,25 $10^{-8}$ $m^2/s$ a 40, 50 y 60 ºC, respectivamente. Estos coeficientes de difusividad efectiva para el aceite de girasol en expellers resultaron superiores a los reportados por Pérez (2002) para harinas de girasol cultivable y silvestre. Esto puede deberse a las estructuras diferentes que presentan las harinas y los expellers, y a la menor concentración de aceite presente en la miscela para

el caso de los expellers. Los valores difieren en órdenes de magnitud con aceites en otros solventes orgánicos, como por ejemplo 1,30 $10^{-11}$ $m^2/s$ para aceite de soja en ciclohexano a 27 ºC (Osburn y Katz 1944), 5,83 $10^{-10}$ $m^2/s$ para aceite de maíz en etanol a 68 ºC (Chien *et al.* 1990), y 2,38 $10^{-9}$ $m^2/s$ para el aceite de clavo de olor en etanol a 50 ºC (Myint *et al.* 1996). Las diferencias pueden estar asociadas no sólo al tipo de solvente sino también, como ha sido demostrado, a las condiciones experimentales, el tipo de partícula y los modelos utilizados para correlacionar los resultados.
El análisis estadístico realizado a los datos de $M_t/M_\infty$ indicó que hay diferencias significativas entre los ensayos realizados a las diferentes temperaturas (F=16,860, $F_c$=3,554), la velocidad de extracción aumentó con la temperatura. El solvente y la miscela circundante empapan al sólido y alcanzan el equilibrio más rápidamente a mayores temperaturas. Esto es debido a la disminución de la viscosidad del solvente y al aumento de la solubilidad de algunos componentes de los aceites crudos que son provocados por el aumento de temperatura (Bockisch 1998).

## Extracción de fosfolípidos

Los fosfolípidos son los principales componentes de las membranas celulares. Las membranas de las vacuolas, mitocondrias y las membranas citosólicas están compuestas por fosfolípidos, principalmente por, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI), (Salas *et al.* 2006). Evidencias previas indican que los fosfátidos se concentran en la última fracción de aceite extraída con hexano de semillas de soja (Nash y Frankel 1986). Este hecho sugiere que la cinética de extracción de fosfolípidos no presentaría una etapa de lavado tan marcada, pudiendo ser explicado el proceso de extracción mayoritariamente mediante el mecanismo difusivo puro. En la **Figura 2** se presentan las curvas de extracción resultantes.

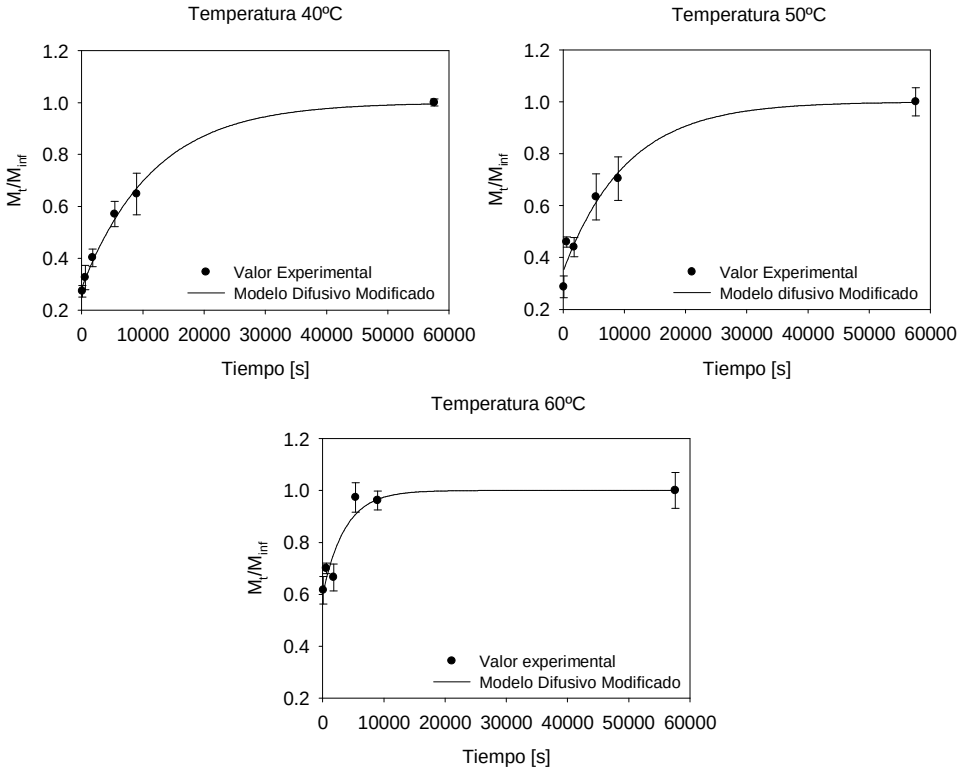


**Figura 2:** Cinética de la extracción de fosfolípidos.

El modelo difusivo fue aplicado para correlacionar los resultados de extracción para las condiciones de trabajo antes especificadas utilizando un programa de regresión no lineal, en la **Tabla 2** se muestran los coeficientes del ajuste obtenidos. Se observa que a 40 y 50 ºC el valor de A es similar al teórico de 0,6917, indicando que la fracción correspondiente a la etapa de lavado es relativamente chica y que el ajuste del modelo difusivo puro puede ser razonable. En cambio, para la curva realizada a 60 ºC la magnitud de la etapa inicial se incrementa significativamente. Esto puede deberse al efecto de la temperatura sobre las propiedades tales como solubilidad y viscosidad de los componentes involucrados.

**Tabla 2.** Ajuste de la ecuación del modelo difusivo aplicado a la cinética de extracción de fosfolípidos.

| Temperatura (ºC) | A | B | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| 40 | 0,7149 | 8,580 $10^{-5}$ | 0,9958 |
| 50 | 0,6541 | 9,712 $10^{-5}$ | 0,9636 |
| 60 | 0,4023 | 2,742 $10^{-4}$ | 0,9109 |

Los valores de los coeficientes difusivos, determinados a partir de los modelos de ajuste fueron 1,32 $10^{-9}$, 1,50 $10^{-9}$ y 4,23 $10^{-9}$ $m^2/s$ a las tres temperaturas estudiadas. El aumento de la temperatura provocó un aumento en la velocidad de extracción, en concordancia con lo obtenido para la extracción del aceite.

En la **Figura 3** se observan los resultados experimentales de la cinética de extracción de cada especie molecular de fosfolípidos (PE, PA, PI y PC). El análisis de la varianza para PI reveló que los valores de $M_t/M_\infty$ no presentan diferencias significativas entre temperaturas (F=4,031, $F_c$=4,103), lo contrario sucedió para el resto de las especies de fosfolípidos (F>4,103), aumentado la velocidad de extracción a medida que se incrementa la temperatura, siendo más evidente este comportamiento cuando se incrementa la temperatura de 50 a 60 ºC.

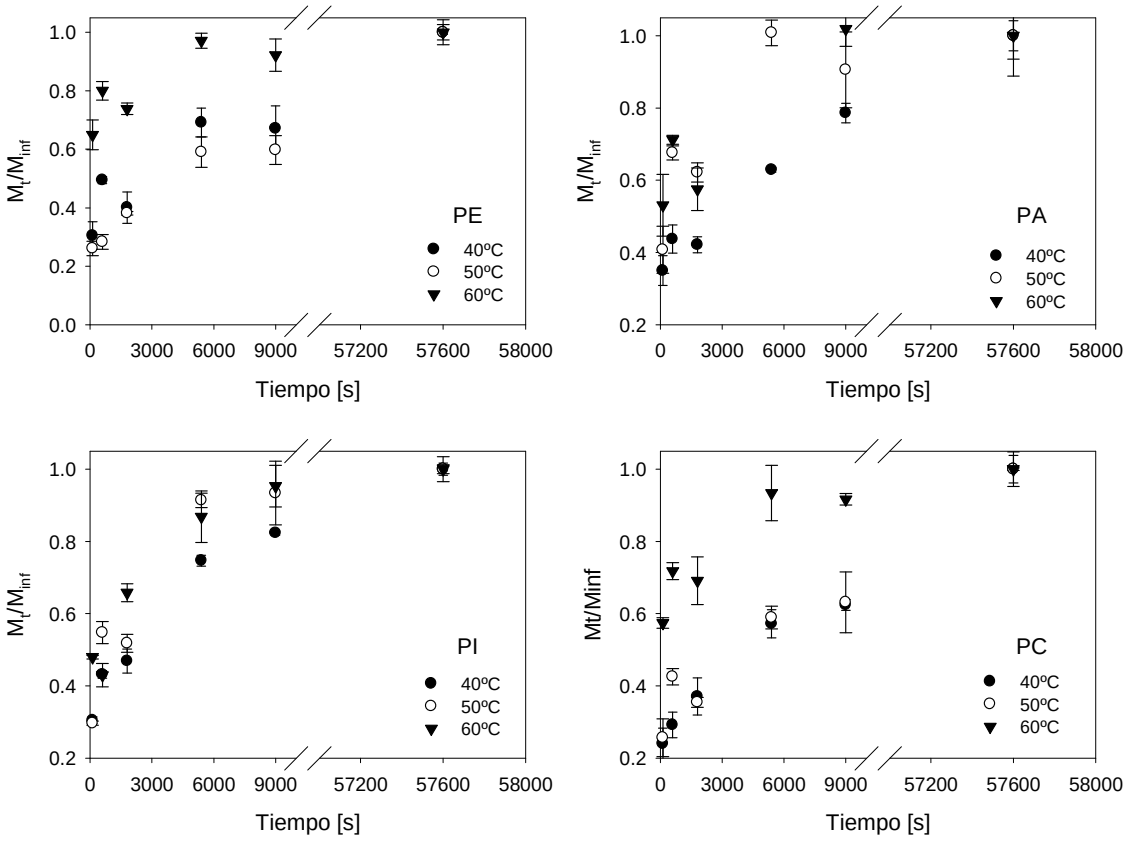


**Figura 3**. Extracción de los fosfolípidos individuales.

En la **Figura 4** se comparan las velocidades de extracción entre los diferentes fosfolípidos en ensayos realizados a igual temperatura. En el análisis realizado a 40 ºC se observó que el PI se extrajo más rápidamente que PA y PE, siendo PC el que presentó la menor velocidad de extracción; a 50 ºC el componente más afectado por el incremento de la temperatura fue PA, aumentando su velocidad de extracción con respecto a los ensayos a 40 ºC. A 60 ºC no se observaron diferencias apreciables entre los diferentes fosfolípidos. Sin embargo PC, componente mayoritario de los fosfolípidos en el aceite de girasol, experimenta un aumento importante en su velocidad de extracción, siendo el que mayor efecto produce sobre la extracción de los fosfolípidos totales.

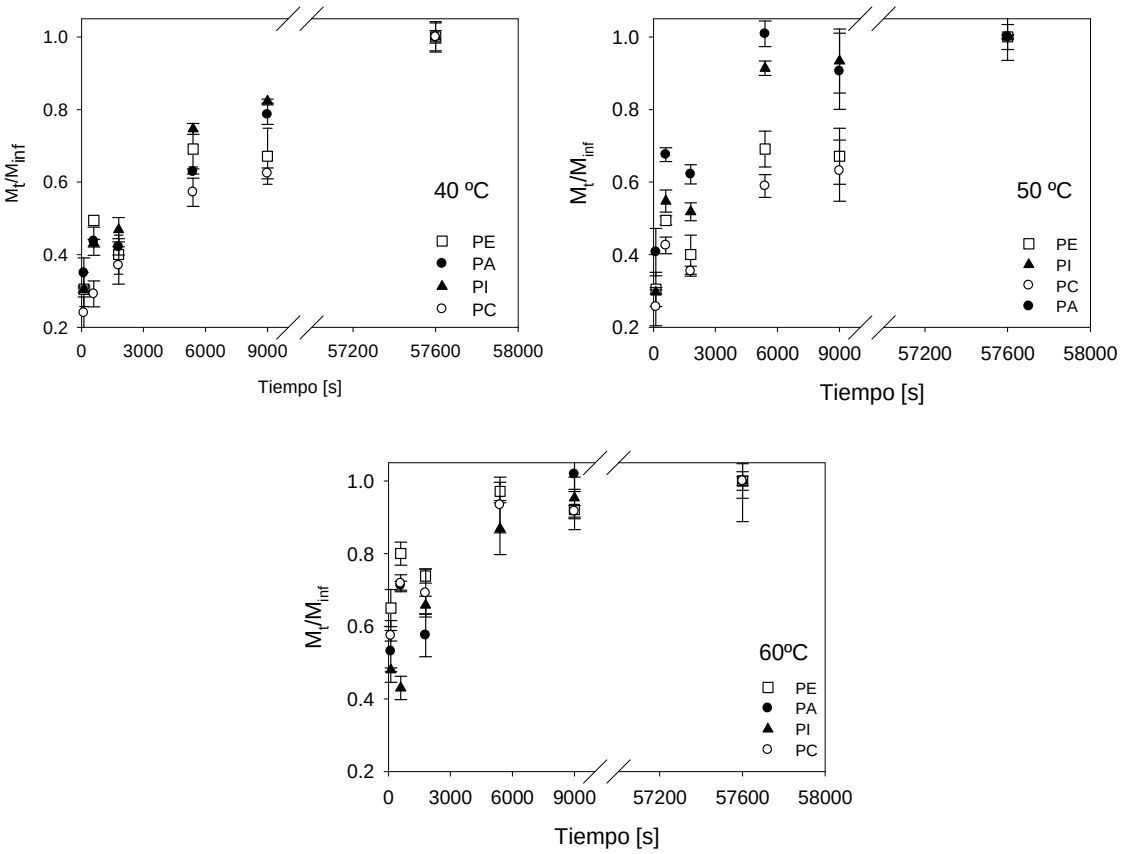


**Figura 4**. Velocidades de extracción de los diferentes fosfolípidos en ensayos realizados a igual temperatura.

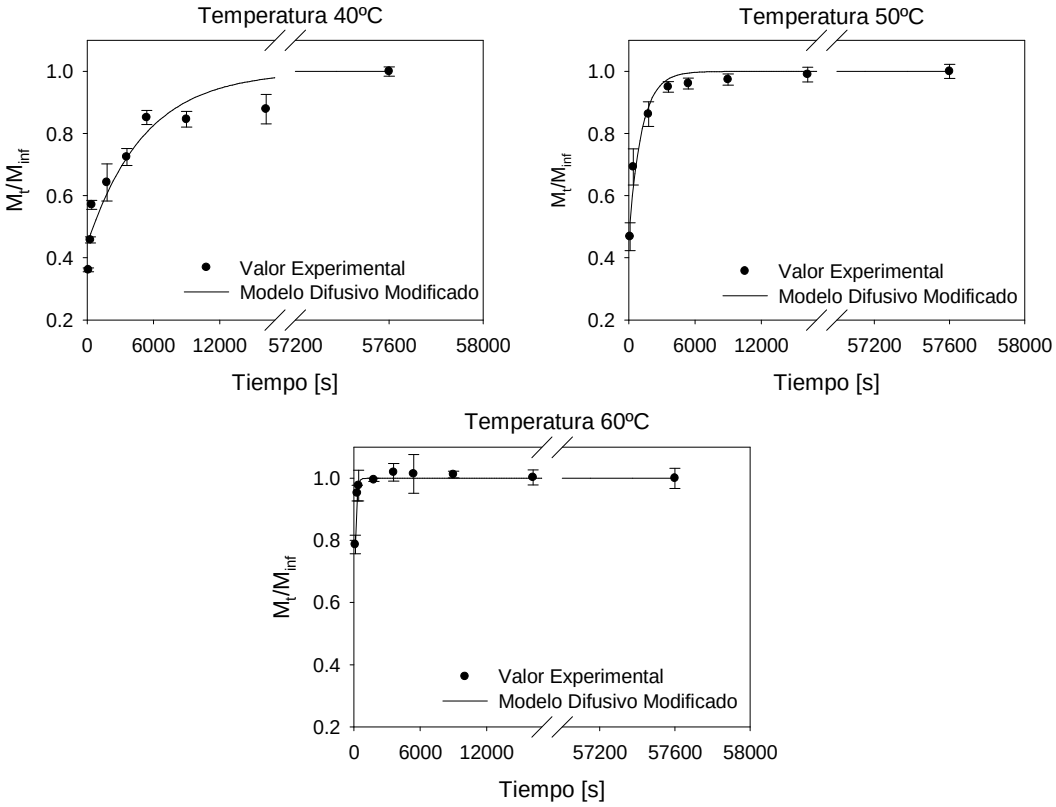


**Figura 5**. Resultados experimentales de extracción de tocoferoles y curvas de ajuste.

## Extracción de tocoferoles

Los alimentos contienen muchos componentes, siendo algunos solutos extraídos más rápidamente que otros. La difusividad de los componentes menores es, probablemente, mutuamente independiente, pero los solutos presentes en mayor concentración pueden cambiar la solubilidad del resto (Bressan *et al.* 1981). Entre los componentes menores presentes en las oleaginosas se encuentran los tocoferoles, estos están intrínsecamente asociados a las estructuras de los cuerpos aceitosos (Fisk *et al.* 2006).

En la **Figura 5** puede observarse que la extracción de los tocoferoles tiene un comportamiento similar al observado para el aceite de girasol, presentando en las curvas de extracción una primera etapa que corresponde al proceso de lavado y una segunda etapa que corresponde a la etapa lenta de difusión.

Para correlacionar los resultados de extracción en las condiciones de trabajo especificadas se utilizó el modelo difusivo modificado, este modelo fue aplicado utilizando un programa de regresión no lineal. En la **Tabla 3** se muestran los coeficientes del ajuste para las distintas temperaturas. Los valores de los coeficientes difusivos, determinados a partir de los modelos de ajuste fueron 2,99 $10^{-9}$, 1,33 $10^{-8}$ y 1,24 $10^{-7}$ $m^2/s$ a 40, 50 y 60 ºC respectivamente. El aumento de la temperatura provocó un importante aumento en la velocidad de extracción de estos compuestos. El análisis de la varianza de los valores experimentales indicó que existen diferencias significativas entre temperaturas (F=16,285, $F_c$=3,739).

**Tabla 3**. Ajuste de la ecuación del modelo difusivo aplicado a la cinética de extracción de tocoferoles.

| Temperatura (ºC) | A | B | $R^2$ |
|---|---|---|---|
| 40 | 0,558 | 1,938 $10^{-4}$ | 0,9099 |
| 50 | 0,540 | 8,642 $10^{-4}$ | 0,9606 |
| 60 | 0,559 | 8,045 $10^{-3}$ | 0,9813 |

## Extracción de ceras

Las ceras se clasificaron en solubles (C36-C38) y parcialmente solubles (C40-C42) en el aceite y cristalizables (C44-C48) debido al comportamiento diferente que presentó cada fracción.

La fracción de ceras solubles y las parcialmente solubles en el aceite presentaron un comportamiento similar a la curva de velocidad de extracción de aceite. El análisis estadístico indicó que los valores de $M_t/M_\infty$ no presentan diferencias significativas entre temperaturas para las ceras parcialmente solubles (F=0,0135, Fc=5,143), pero sí para las ceras solubles (F=7,360, Fc=5,143). Sin embargo no pudo establecerse una relación de la temperatura de los ensayos con los cambios en las velocidades de extracción, esto puede ser debido a diferentes contenidos de cáscara en las muestras utilizadas para cada ensayo. Los mismos fueron realizados con expellers de girasol sin desmenuzar y el contenido de cáscara de los mismos no fue determinado.

La calidad del aceite de girasol se ve afectada por la presencia de ceras que son poco solubles en los glicéridos a bajas temperaturas, cristalizan y producen turbidez en el aceite, aquellas ceras de más de 44 átomos de carbono son las que conforman la fracción de ceras cristalizables y se encuentran mayoritariamente en la cáscara de la semilla de girasol. Las curvas de extracción de esta fracción presentaron una primera etapa rápida de adsorción, y luego la etapa de difusión. Este comportamiento puede deberse a que cuando el solvente entra en contacto con las ceras cristalizables, ubicadas en la superficie de la cáscara, estas se disuelven y adsorben junto con el solvente en el interior de la partícula, luego, el solvente disuelve al aceite aún retenido en las células, formando la miscela y difunde hacia el exterior de la partícula conjuntamente con las ceras. La estructura del expeller también influye en este fenómeno al contener cáscara en su interior en proporciones no homogéneas.

En la **Figura 6** se presentan las curvas de extracción para cada una de las ceras que conforman la fracción de ceras cristalizables, C44, C46 y C48. La curva de extracción para la cera con 44 átomos de carbono a 40 ºC presenta la etapa de adsorción, etapa que no se observa para las temperaturas de 50 y 60 ºC, lo que puede ser consecuencia del aumento de la velocidad de penetración del hexano en la partícula. La velocidad a la que el solvente y la miscela circundante empapan al sólido y alcanzan el equilibrio aumenta con la temperatura, debido a la disminución de la viscosidad del solvente y al aumento de la solubilidad de algunos componentes de los aceites crudos.

La cera con 46 átomos de carbono, C46, presenta ambas zonas, el análisis estadístico de los datos reveló que no hay diferencias significativas entre las diferentes temperaturas (F=2,2537, $F_c$=4,4599).

La cera con 48 átomos de carbono, C48, también presentó ambas zonas; en este caso sí hay diferencias significativas entre los ensayos realizados a diferentes temperaturas (F=5,4524, $F_c$=4,4599). Esto puede ser debido a una penetración más rápida del solvente en la partícula a mayor temperatura, siendo la etapa de adsorción más acelerada.

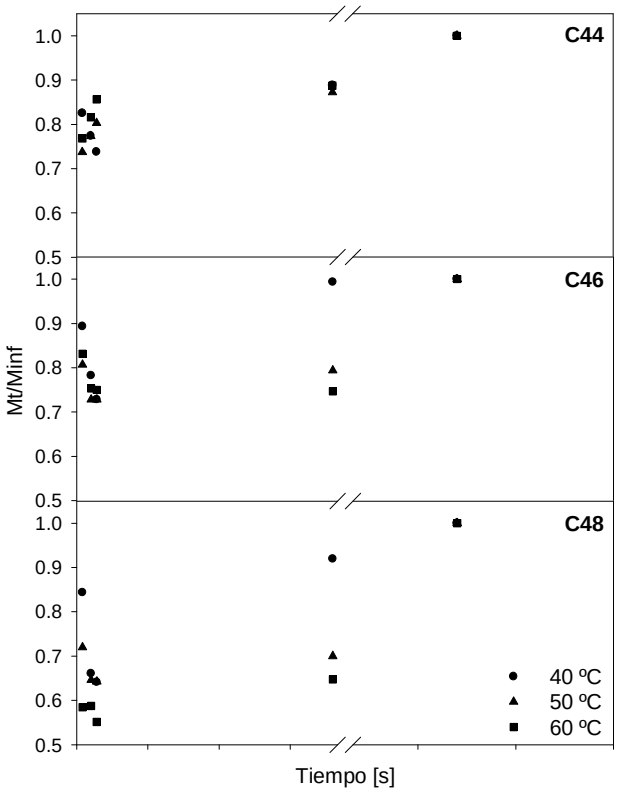


**Figura 6**. Curva de extracción de ceras cristalizables en función de la temperatura.

Para modelar los resultados de extracción las curvas de las ceras cristalizables se dividieron en dos zonas, como vimos anteriormente, una de adsorción y una de difusión desde el interior de la partícula hacia el interior de la fase fluida. Los valores experimentales de $M_t/M_\infty$ correspondientes a la etapa de adsorción para las ceras insolubles se analizaron mediante análisis de la varianza, observando que no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos considerados. Esto indica que el valor de $M_t/M_\infty$ correspondiente a esta etapa puede ser considerado constante, hasta que comienza la etapa difusiva, donde comienza a aumentar progresivamente, hasta alcanzar valor de equilibrio. Tampoco presentaron diferencias significativas en cuanto a la temperatura.

Para representar la zona difusiva se utilizó el modelo difusivo modificado utilizando un programa de regresión no lineal. En la **Tabla 4 - Figura 7** se muestran los ajustes obtenidos de los resultados experimentales para cada una de las ceras que conforman la fracción de ceras cristalizables, C44, C46 y C48.

El hecho de que en la zona difusiva hayan quedado involucrados pocos puntos experimentales incide en los altos valores de correlación obtenidos. En ensayos futuros sería aconsejable realizar extracciones a tiempos superiores a los 90 min para confirmar el buen ajuste de los datos.

Los valores de los coeficientes difusivos, determinados a partir de los modelos de ajuste fueron: 2,64 $10^{-9}$, 1,35 $10^{-9}$ y 8,86 $10^{-10}$ $m^2/s$ para C44, 1,15 $10^{-8}$, 9,46 $10^{-10}$ y 6,48 $10^{-10}$ $m^2/s$ para C46 y 4,64 $10^{-9}$, 7,95 $10^{-10}$ y 8,82 $10^{-10}$ $m^2/s$ para C48, en el rango de temperatura analizado. El aumento de la temperatura provocó una disminución en la velocidad de extracción de estos compuestos. Este comportamiento puede ser el resultado de varios factores, como ser cambios de la viscosidad del aceite y del solvente, o cambios de solubilidad que sufren las ceras amorfas con la temperatura.

**Tabla 4**. Ajuste de la ecuación del modelo difusivo aplicado a la cinética de extracción de las ceras cristalizables.

| Temperatura (ºC) | C44 | | |
|---|---|---|---|
| | **A** | **B** | **$R^2$** |
| 40 | 0,282 | $1,741\ 10^{-4}$ | 1 |
| 50 | 0,205 | $8,759\ 10^{-5}$ | 0,999 |
| 60 | 0,150 | $5,747\ 10^{-5}$ | 0,996 |
| | **C46** | | |
| | **A** | **B** | **$R^2$** |
| 40 | 0,372 | $7,486\ 10^{-4}$ | 1 |
| 50 | 0,282 | $6,136\ 10^{-5}$ | 0,998 |
| 60 | 0,278 | $4,204\ 10^{-5}$ | 0,949 |
| | **C48** | | |
| | **A** | **B** | **$R^2$** |
| 40 | 0,407 | $3,006\ 10^{-4}$ | 1 |
| 50 | 0,368 | $5,153\ 10^{-5}$ | 0,990 |
| 60 | 0,467 | $5,719\ 10^{-5}$ | 0,996 |

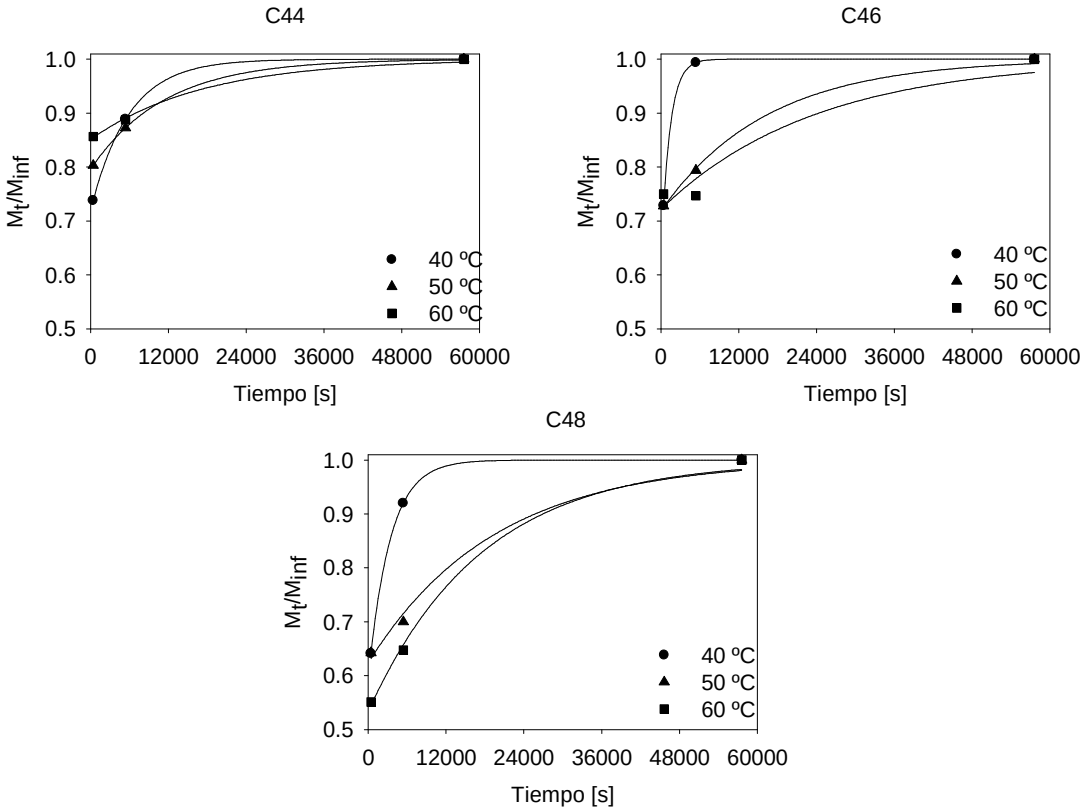


**Figura 7:** Resultados experimentales de extracción de ceras insolubles y curvas de ajuste.

## Comparación entre componentes

En la **Figura 8** se presentan el avance de las concentraciones de los compuestos minoritarios en el aceite durante la extracción. Puede observarse que, excepto a 60 ºC donde se manifiesta una dispersión de los valores iniciales, la concentración de fosfolípidos en el aceite extraído aumenta continuamente a

medida que transcurre el proceso de extracción. Esto se debe a que la influencia de la etapa de lavado en el caso de los fosfolípidos es mucho menor a la determinada en el aceite y a que su cinética de extracción también es más lenta, con coeficientes de difusión un orden de magnitud inferior a los del aceite.

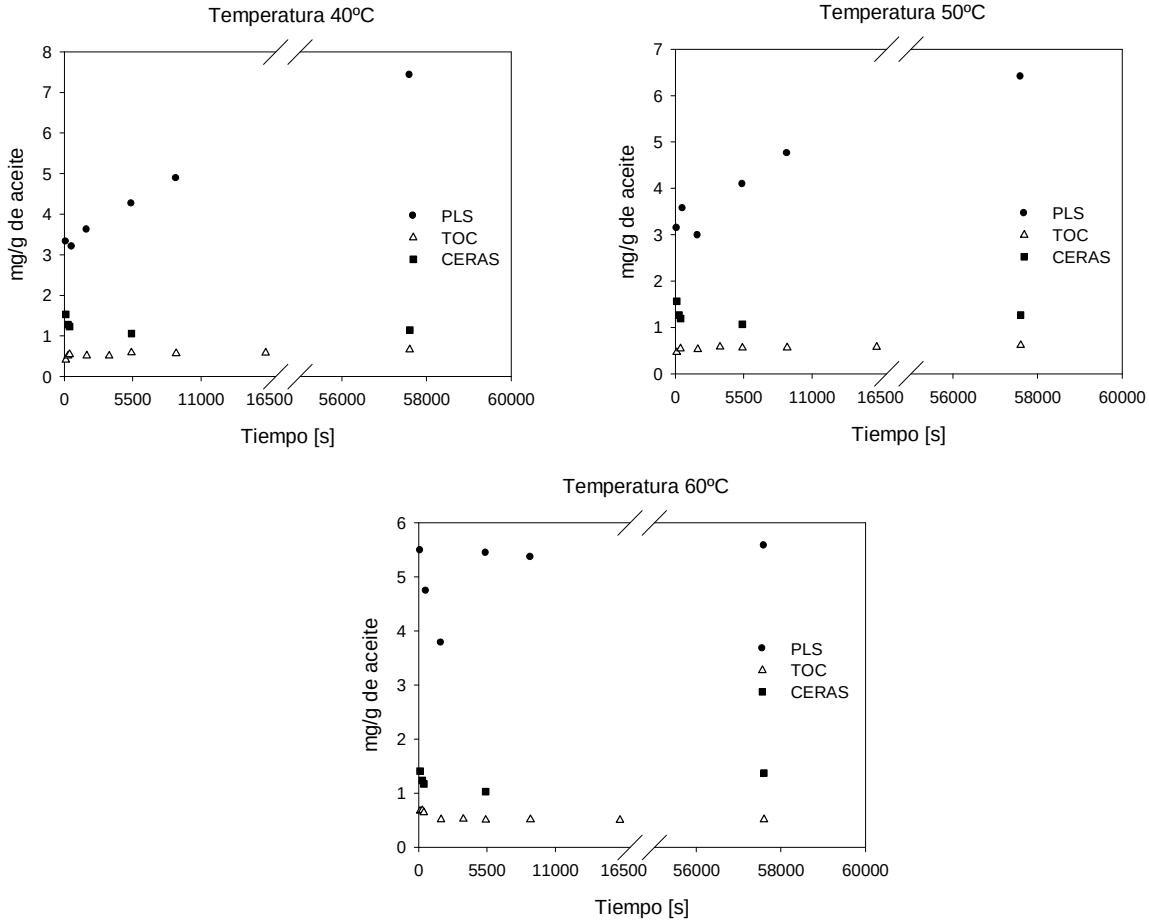


**Figura 8**. Concentraciones de los compuestos minoritarios en el aceite extraído.

La concentración de tocoferoles totales en el aceite extraído se mantuvo prácticamente constante, excepto al inicio de las experiencias. Esto se debe a que la extracción de los tocoferoles presentó un comportamiento similar al observado para el aceite, extrayéndose ambos compuestos en forma casi simultánea. Lo que es fundamentado por el hecho de que los tocoferoles se encuentran intrínsicamente asociados a las estructura de los cuerpos grasos (Fisk *et al.* 2006).

En cambio, la concentración de ceras en el aceite extraído presenta una disminución al inicio de la extracción y luego comienza a aumentar hacia un valor constante. Este hecho podría atribuirse a un efecto combinado de dilución inicial de las ceras presentes en la cáscara y que son eliminadas muy rápidamente por el solvente, provocado por el aceite perteneciente a la etapa de lavado, y del mecanismo de adsorción discutido.

En la **Figura 9** se comparan los datos experimentales de extracción de tocoferoles y fosfolípidos. Puede observarse que los tocoferoles se extraen más rápidamente que los fosfolípidos, por ej: el 99,5% de los tocoferoles y 66,5% de los fosfolípidos son removidos a 60 ºC y 30 minutos. Esto se corresponde con la magnitud de la etapa de lavado, que es mucho menor en el caso de los fosfolípidos, y con los valores obtenidos para los coeficientes difusivos $D_e$, que fueron significativamente superiores en el caso de los tocoferoles.

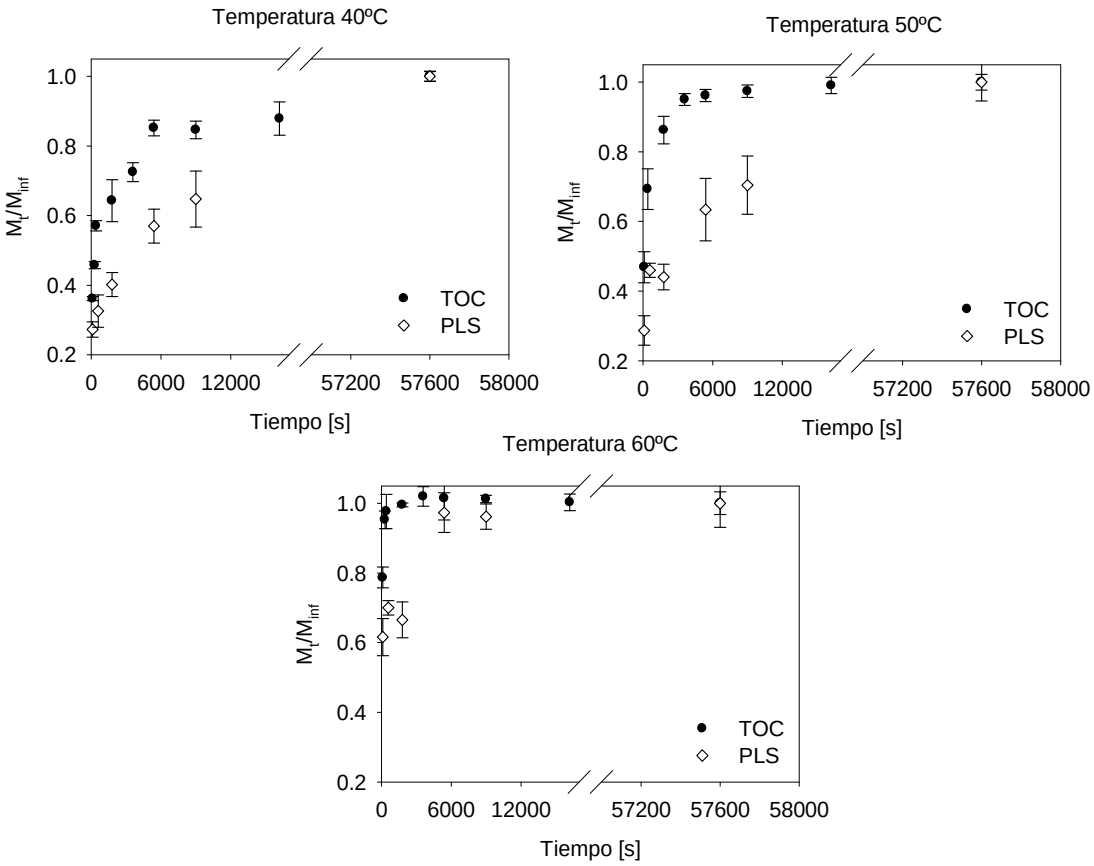


**Figura 9**. Comparación de las curvas de extracción de tocoferoles y fosfolípidos.

## CONCLUSIONES

Las materias grasas han sido utilizadas por los humanos desde épocas ancestrales. La obtención de aceites comenzó siendo un proceso muy artesanal, que se realizaba en el propio hogar; con el paso de los años esta práctica recobró importancia económica y se convirtió en una de las industrias primordiales sobre la economía mundial.

Se han realizado numerosos desarrollos que intentan explicar el fenómeno de extracción. El principal problema es tratar de interpretar todos los pasos involucrados en la difusión del soluto a través de una matriz sólida. La mayoría de estos estudios consideran al aceite como un solo componente, sin embargo algunos de los componentes presentes en el mismo poseen limitada solubilidad retrasando de alguna manera el proceso y afectado su rendimiento. Estos componentes menores, en algunos casos, son compuestos indeseables que luego del proceso de extracción deben ser eliminados del aceite para que éste sea aceptable como aceite comestible.

Este trabajo apunta a realizar un aporte en cuanto a los conocimientos de la cinética del proceso de extracción por solvente de aceites vegetales, teniendo en cuenta la influencia de los compuestos minoritarios. El modelo utilizado permitió representar la cinética de extracción de aceite de girasol, proveniente de expellers sin desmenuzar, como así también la cinética correspondiente a los compuestos minoritarios. Los resultados obtenidos demostraron que los tocoferoles se extraen más rápidamente que los fosfolípidos, siendo los tocoferoles extraídos en forma casi simultanea con el aceite, mientras que las ceras presentan una zona de adsorción previa a la difusión.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), FONCYT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) y la Universidad Nacional del Sur.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Aguilera JM. 2003. Solid-liquid extraction, en Tiza C. y Liadakis G. editores. Extraction Optimization in Food Engineering. New York: Basel. pag 35-56.

AOCS. 1993. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist´s Society, 4th ed. D. Champaign, IL: American Oil Chemists´ Society.

Bockisch M. 1998. Extraction of vegetable oils. En Bockisch M. Fats and Oils Handbook. Champaign, Illinois: AOCS Press. pag 344-445.

Bressan JA, Carroad PA, Merson RL, Dunkley WL. 1981. Modeling of isothermal diffusion of whey components from small curd cottage cheese during washing. Journal of Food Science, 47:84-88.

Carelli AA, Brevedan MIV, Crapiste GH. 1997. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 74:511-514.

Chien JT, Hoff JE, Lee MJ, Lin HM, Chen YJ, Chen LF.1990. Oil extraction of dried ground corn with ethanol. The Chemical Engineering Journal, 43:B103-B113.

Crank J. 1975. The Mathematics of Diffusion. 2ª ed. Oxford: Clarendon Press, pag 414.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas, Anexo 4. 1993. Determinación del contenido de ceras mediante cromatografía de capas con columna capilar. L22:61-65 (30.01.93).

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.

IUPAC. 1992. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fat and Derivates, 7th Edition. Oxford: C. Paquot y A. Hautffenne (eds.), International Union of Pure and Applied Chemistry, Blacwell Scientific Publications Inc.

Karnofsky G. 1949. The theory of solvent extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society 26(10):564-569.

Karnofsky G. 1986. Design of oilseed extractors I. Oil Extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society, 63(8):1011-1014.

Karnofsky G. 1987. Design of oilseed extractors I. Oil extraction (Supplement). Journal of the American Oil Chemists' Society. 64(11):1533-1536.

King CO, Katz DL, Brier JC. 1944. The solvent extraction of soybeans flakes. Transaction of the American Institute Chemical Engineering, 40:533-556.

Myint S, Daud WRW, Mohamad AB, Kadhum AAH. 1996. Temperature-dependent diffusion coefficient of soluble substances during ethanol extraction of clove. Journal of the American Oil Chemists' Society, 73(5):603-610.

Nash AM, Frankel EN. 1986. Limited extraction of soybeans with hexane. Journal of the American Oil Chemists' Society, 63(2):244-246.

Osburn JO, Katz DL, 1944. Structure as a variable in the application of diffusion theory to extraction. Transaction of the American Institute Chemical Engineering, 40:511-531.

Pérez E. 2002. Obtención y caracterización de aceites y harinas de girasol silvestre: Helianthus Petiolaris. Tesis de Doctorado en Ingeniería Química, Universidad Nacional del Sur.

Salas J, Martínez-Force E, Garcés R. 2006. Phospholipid molecular profiles in the seed kernel from different sunflower (Helianthus annuus) mutants. Lipids, 41:805-811.

Xu L, Diosady LL. 2003. Fats and oils from plant material, en Tiza C. y Liadakis G. editores. Extraction Optimization in Food Engineering. New York: Basel. pag 181-216.

# Caracterización de los compuestos producidos durante la maduración de quesos de oveja elaborados con dos tecnologías de desarrollo propio

# Characterization of compound produced during sheep cheese ripening obtained by two different methodologies

Bergamini CV, Wolf IV, Perotti MC, Zalazar CA

Instituto de Lactología Industrial, UNL-CONICET. 1º de mayo 3250, Santa Fe - Argentina.
cvberg@fiq.unl.edu.ar

## RESUMEN

La producción de leche ovina se ha incrementado en los últimos años en nuestro país, siendo su principal destino la elaboración de quesos. Esta producción, sin embargo, está actualmente poco estandarizada, ya que no existen protocolos definidos, ni productos bien caracterizados. En el presente trabajo se estudiaron la proteólisis, la lipólisis, y los compuestos volátiles de dos diferentes quesos de oveja obtenidos mediante tecnologías desarrolladas en nuestro Instituto. Para ello, se elaboraron quesos con *Streptococcus thermophilus*, corte de la cuajada hasta un tamaño medio, cocción hasta 43ºC y lavado de la cuajada (quesos S), y quesos con un fermento primario mixto de *S. thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus bulgaricus*, corte de la cuajada hasta un tamaño menor y cocción hasta 47ºC. Los quesos fueron analizados hasta los 180 d de maduración: los perfiles peptídicos y de aminoácidos libres (AAL) fueron estudiados por RP-HPLC; la cuantificación de los ácidos grasos libres (AGL) se realizó por GC, y para los compuestos de aroma se usó la técnica SPME-GC-FID. Los perfiles peptídicos de los quesos S se caracterizaron por un incremento del área y cantidad de picos de todo el cromatograma durante la maduración. En contraste, los quesos L mostraron un incremento solamente del área de los picos iniciales (compuestos más hidrofílicos) y luego una disminución de la mayoría de dichos picos, mientras que prácticamente no presentaron péptidos en la zona más hidrofóbica del cromatograma. Por otro lado, todos los AAL mostraron una concentración significativamente mayor en los quesos L que en los S, lo que fue evidente desde el inicio de la maduración. Se observó un incremento en los perfiles de lipólisis, representado por la concentración de 9 AGL, para los dos tipos de quesos al final de la maduración. Se encontraron concentraciones ligeramente superiores en los quesos L para los ácidos mirístico, palmítico y oleico, que son los que se encontraron en mayor proporción. También se observaron diferencias en los perfiles de aromas. Los quesos L se caracterizaron por presentar mayores niveles de aldehídos y cetonas, mientras que en los quesos S se encontraron ésteres y dentro del grupo de alcoholes sólo el etanol fue el compuesto más representativo. Ambos tipos de quesos presentaron niveles similares de los ácidos, aunque en los quesos L predominó el acético y butírico y en los S el caproico. Los resultados revelaron una importante diferencia en la profundidad y avance de la proteólisis entre ambos tipos de queso, debido a una mayor actividad peptidolítica de los lactobacilos utilizados en el fermento de los quesos L. El mayor nivel de ciertos AGL y algunas diferencias entre los perfiles de aromas distinguieron asimismo los quesos L de los S. Los productos desarrollados y caracterizados en el presente trabajo se están elaborando actualmente en una planta modelo de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de la UNL y han sido registrados con los nombres autóctonos de Arandu de humedad intermedia (S) y Arandu de humedad baja (L).

## ABSTRACT

In the last years, there was an increase in the production of sheep milk in our country, which is used mainly in cheese-making. This production is however, very little standardized because there are neither defined protocols nor well characterized products. In the present work, we studied proteolysis, lipolysis and volatile compounds for sheep cheeses obtained by two different methodologies developed in our Institute. For such purpose, cheeses with a starter of *Streptococcus thermophilus*, curd cut until corn size, washed and heated up to 43ºC (S cheeses) and cheeses with a mixed starter of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus bulgaricus*, curd cut until

smaller size, no washed and heated up to 47ºC (L cheeses) were manufactured. Cheeses were analysed during ripening until 180 d. Peptide profiles and free amino acids (FAA) were studied by RP-HPLC, free fatty acids (FFA) were quantified by GC, and compounds of flavours were analysed by SPME-GC-FID. Peptide profiles of S cheeses were characterized by an increase of area and quantity of chromatographic peaks during ripening. On the contrary, L cheeses showed only an increase for the area of initial peaks (compounds more hydrophilic), followed by a diminution of practically all peaks. A very few peaks were observed in the hydrophobic zone of chromatogram in L cheeses. On the other hand all FAA showed a significantly higher concentration in L cheeses than in S cheeses, which was evident from the beginning of the ripening. An increase of lipolysis profiles, represented as the concentration of 9 FFA, was observed for the two types of cheeses at the end of the ripening. Myristic, palmitic and oleic acids were the most FFA in both types of cheeses but they were slightly higher in L cheeses. Regarding volatile compounds, some differences were observed. Higher levels of aldehides and ketones characterized L cheeses, while S cheeses presented esters and ethanol as the representative compound of the alcohol group. Both types of cheeses showed similar levels of acids, but acetic and butyric were the most predominant in L cheeses while in S cheeses caproic acid was the prevailing acid. These results revealed a significant difference in the deepness and extension of proteolysis between both types of cheeses, due to a higher peptidolytic activity of lactobacilli used as starter in L cheeses. Also, some differences for certain FFA and favour compounds distinguished L from S cheeses. Both types of cheeses developed and characterized in the present work are being produced actually in a model plant of the Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de la UNL. These cheeses were registered with the autochthonous names of Arandu of medium humidity (S) and Arandu of low humidity (L).

**PALABRAS CLAVE**: *quesos de oveja, tecnología, caracterización de maduración.*

**KEYWORDS**: *sheep cheeses, technology, characterization of ripening.*

## INTRODUCCIÓN

En la región del Mediterráneo se concentra la mayor producción de leche de oveja y productos derivados de la misma. Es así como existen quesos muy populares que tienen denominación de origen protegido como el Roquefort (Francia), Feta y Teleme (Grecia), Pecorino (Italia), Idiazábal y Manchego (España) y Serra da Estrela (Portugal) (Kalantsopoulos 1992). Estos quesos y otros menos populares han sido caracterizados en diferentes trabajos de investigación (Raynal-Ljutovac *et al.* 2008).

En Argentina la elaboración de quesos de oveja ha tenido poca difusión hasta el momento, debido a que la cría de animales se realiza principalmente para la obtención de carne y lana. Esta situación da lugar a que los quesos se produzcan casi exclusivamente en forma artesanal en pequeñas fábricas sin protocolos estandarizados de elaboración y maduración, generando una falta de homogeneidad de la calidad del producto. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un incremento en la producción de leche en pequeños tambos, unido a un creciente interés de medianos productores por la producción a escala industrial (Mc Cormick y Lynch 2003). No obstante, esta actividad resulta complicada debido a que en nuestro país no se ha definido un perfil estándar para estos quesos, siendo así difícil establecer parámetros de calidad y seguridad.

Ante esta situación, en nuestro Instituto hemos puesto a punto el proceso de producción de dos tipos de quesos: quesos S con un starter de *Streptococcus thermophilus* y quesos L con un starter de *S. thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus bulgaricus*. En un trabajo previo se han descripto las características en cuanto a composición global, pH y proteólisis de dichos quesos, los cuales presentaron similar composición global y proteólisis primaria (electroforesis y fracción de nitrógeno soluble a pH 4,6). Sin embargo, los quesos presentaron diferencias en cuanto al pH y a la proteólisis secundaria (fracción de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 12% y en ácido fosfotúngstico al 2,5%), siendo los L más ácidos y más proteolizados que los S. Asimismo, se observó una gran disminución durante la maduración de la población de lactobacilos del fermento en los quesos L (Bergamini *et al.* 2008).

Durante la maduración se producen transformaciones bioquímicas que son responsables de las características finales de sabor, aroma y textura del queso. Los fermentos presentes juegan un rol muy

importante en todos estos cambios (Fox y McSweeney 2004). Precisamente, una de las metodologías utilizadas para incrementar el flavour o acelerar el proceso de maduración es la adición de fermentos adjuntos junto al fermento primario o el uso de cultivos starter atenuados (Law 2001). Asimismo, se considera que la capacidad lítica es una característica deseable de dichos fermentos, ya que permite liberar en la matriz del queso el pool de enzimas intracelulares que juega un rol importante durante la maduración (Lortal y Chapot-Chartier 2005, Kenny *et al.* 2006, Hannon *et al.* 2007). En este sentido, diferentes cepas de lactobacilos termófilos han demostrado capacidad autolítica junto con una actividad proteolítica intensa y una influencia positiva en las características organolépticas del producto (Drake *et al.* 1996, Madkor *et al.* 2000, Hannon *et al.* 2003, Kenny *et al.* 2006, Hannon *et al.* 2007).

En el presente trabajo se caracterizaron dos tipos de quesos de oveja, cuyo proceso de producción fue puesto a punto previamente, mediante un estudio exhaustivo de la proteólisis secundaria (perfiles peptídicos y aminoácidos libres), la lipólisis, y los compuestos volátiles producidos durante la maduración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Elaboraciones de quesos

La leche (4,15 ± 0,70% de materia grasa, 5,37 ± 0,35% de proteínas) para las elaboraciones fue provista por INTA, Anguil, La Pampa, Argentina, y transportada refrigerada a 4°C hasta la planta piloto del INLAIN, donde se realizaron las elaboraciones. Cada día de elaboración, 40 L de leche de oveja fueron pasteurizados en tina a 65°C durante 20 min, luego de lo cual se enfrió hasta 36°C y se agregó cloruro de calcio 0,02% p/v (Merck, Germany). La leche fue posteriormente dividida en dos tinas para elaboraciones de dos diferentes tipos de quesos.

En una primera tecnología (Quesos S) se utilizó un fermento liofilizado comercial de *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen), adicionado en una concentración de $10^6$ UFC $mL^{-1}$ en la leche de elaboración. Transcurridos 15 min, se adicionó 0,014 g $L^{-1}$ de quimosina (Maxiren® 150, France). Cuando el coágulo alcanzó la firmeza adecuada, se procedió al lirado hasta alcanzar el tamaño de granos de maíz. Se realizó un lavado de la cuajada mediante el reemplazo de 10% del suero por agua caliente, y un calentamiento (1ºC $min^{-1}$) y cocción de la misma a 43ºC, hasta obtener la humedad adecuada para un queso semiduro. Luego, la cuajada fue separada y puesta en moldes, y el suero remanente descartado.

En la segunda tecnología aplicada (Quesos L) se utilizó un fermento mixto compuesto de *S. thermophilus* (60%), *Lactobacillus helveticus* (20%) y *L. bulgaricus* (20%) (todos de Chr. Hansen), adicionado para alcanzar una concentración total de $10^6$ UFC $mL^{-1}$. Luego de 15 min de la adición de los fermentos, se agregó el coagulante en la misma proporción que en la tecnología anterior, pero no se realizó lavado de la cuajada, la cual se cortó a un tamaño menor, y el calentamiento y cocción se realizaron a una temperatura mayor (47°C), con la finalidad de obtener quesos con un menor contenido de humedad.

Para ambos protocolos se obtuvieron quesos de aproximadamente 700 g, que se prensaron durante 18 h y se salaron a 12ºC durante 7 h en salmuera (20% p/v; pH 5,4). La maduración se llevó a cabo a 12ºC y 80% de humedad relativa durante 6 meses.

Se realizaron un total de cuatro réplicas de las elaboraciones de cada tipo de queso entre los meses de noviembre y mayo de 2005.

### Muestreo y análisis realizados

Se tomaron muestras de los quesos durante un período de maduración de 180 d, en las que se estudiaron la proteólisis, la lipólisis y los compuestos volátiles.

El nivel de proteólisis se evaluó mediante el estudio de los perfiles peptídicos y aminoácidos libres. Los perfiles peptídicos fueron estudiados por análisis de la fracción soluble del queso en agua mediante HPLC en fase reversa (Bergamini *et al.* 2006) en las muestras de 2, 45, 90 y 180 d de maduración.

Los aminoácidos libres fueron determinados en extractos acuosos de las muestras de queso a los 3 y 180 d de maduración mediante cromatografía líquida utilizando un método de derivatización con 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (ACQ). Para la separación y cuantificación de los aminoácidos, se utilizó la metodología AccQ-Tag® (Waters Corp.) (Bergamini *et al.* 2009).

Los ácidos grasos libres (AGL) desde $C_{6:0}$ hasta $C_{18:2}$ presentes en los quesos al inicio y final de la maduración, se cuantificaron por cromatografía de gases (GC) previa derivatización a ésteres etílicos (Perotti *et al*. 2005).

El aislamiento de los compuestos volátiles se realizó por microextracción en fase sólida (SPME). Para ello, 5 g de muestra de queso se pesaron en viales de 30 mL, los cuales se colocaron en un baño de agua a 40±1ºC por 10 min. Luego se expuso una fibra DVB/CAR/PDMS 50/30µm en el espacio de cabeza de los viales por 30 min. La desorción de los compuestos retenidos en la fibra se realizó en el puerto de inyección de un GC por 5 min. La separación e identificación de los compuestos se efectuó por GC-FID y GC-MS, empleando una columna PE-Wax (polyetilene glicol, 60m x 0,25mm x 0,25µm). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: programa de temperaturas del horno 45°C (4 min), 5°C $min^{-1}$, 150°C (3 min), 8°C $min^{-1}$, 250°C (5 min), temperatura del inyector 250°C (modo splitless), temperatura del detector 275°C. Las condiciones operativas del GC-MS fueron: voltaje de ionización: 70eV; temperatura de la interfase: 260ºC; rango de masas escaneado: 42 a 300m/z; velocidad de escaneado: 250amu/seg. El análisis se efectuó con un cromatógrafo Perkin Elmer serie 9000 y software Turbocrom v4.0, equipado con inyector split-splitless, detector FID. Se obtuvieron datos semicuantitativos a partir de la integración de las áreas de los compuestos obtenidos por GC-FID (unidades arbitrarias).

### Análisis estadístico

Los resultados del contenido individual de AAL fueron procesados por ANOVA de una vía.

Los perfiles peptídicos y de AGL fueron analizados estadísticamente por análisis por componentes principales (ACP) con la finalidad de detectar grupos de muestras.

Para el procesamiento estadístico de los resultados se utilizó el software SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Perfiles peptídicos

Los perfiles peptídicos de los quesos S y L mostraron, mediante una comparación visual, grandes diferencias entre sí (**Figura 1**). Los quesos S en general mostraron un incremento paulatino de todos los picos en los cromatogramas durante la maduración. Por el contrario, en los perfiles de los quesos L se observó un incremento del área de los picos al inicio de la maduración pero luego una disminución de los mismos, excepto en la zona inicial donde se observó un incremento durante todo el período de maduración.

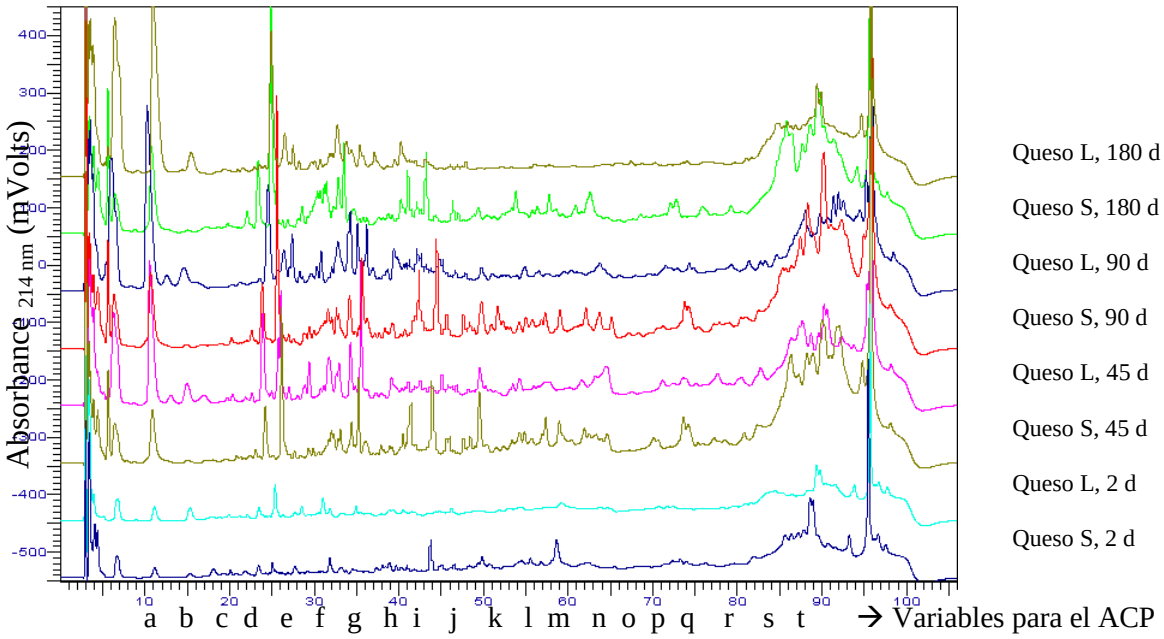


**Figura 1**. Perfiles peptídicos de las muestras de queso S y L durante la maduración. Las letras a hasta t corresponden a los siguientes tiempos de retención: 5,0-9,1-13,1-17,2-21,2-25,3-29,3-33,4-37,4-41,5-45,5-49,6-53,6-57,7-61,7-65,8-68,8-73,9-77,9-82,0.

Para un análisis más objetivo de los perfiles peptídicos se aplicó un ACP. Antes de este análisis, se realizó una pre-reducción del número de picos presentes en los cromatogramas empleando una metodología propuesta por Piraino *et al.* (2004). Los picos se dividieron en 20 grupos que se utilizaron como variables para el ACP, los que fueron nombrados de la **a** a la **t** por orden alfabético (**Figura 1)**. El ACP se aplicó sobre la matriz de covariancia, y se retuvieron aquellos componentes principales (CPs) con un *eigenvalue* mayor al promedio. De esta manera, se conservaron tres CPs, que extrajeron el 84,1% de la variancia del sistema. En el gráfico de scores para PC1 vs. PC2 (**Figura 2a**) se observó una gran similitud de quesos y réplicas al inicio de la maduración. A medida que dicho proceso avanzaba, se detectó una diferenciación entre ambos tipos de quesos y entre las muestras de distinto tiempo de maduración. En efecto, los quesos S y L se diferenciaron entre sí a lo largo del primer CP, que explicó más de la mitad de la variancia de los datos. Los quesos S se caracterizaron por los picos de mayores tiempos de retención, que corresponden a los péptidos más hidrofóbicos debido a su elución a alta concentración de acetonitrilo en la fase móvil. En cambio, los picos con menores tiempos de retención que se corresponden con los péptidos más hidrofílicos y algunos aminoácidos libres fueron típicos de los perfiles de quesos L (**Figura 2b**). Es de destacar que en el gráfico de scores se observó una cercanía de las muestras de quesos S al final de la maduración y las muestras de quesos L a los 45 d. Estos resultados sugieren una gran aceleración de la maduración en los quesos L en comparación con los quesos S. Las conclusiones obtenidas mediante este análisis coinciden con la observación visual de los perfiles peptídicos.

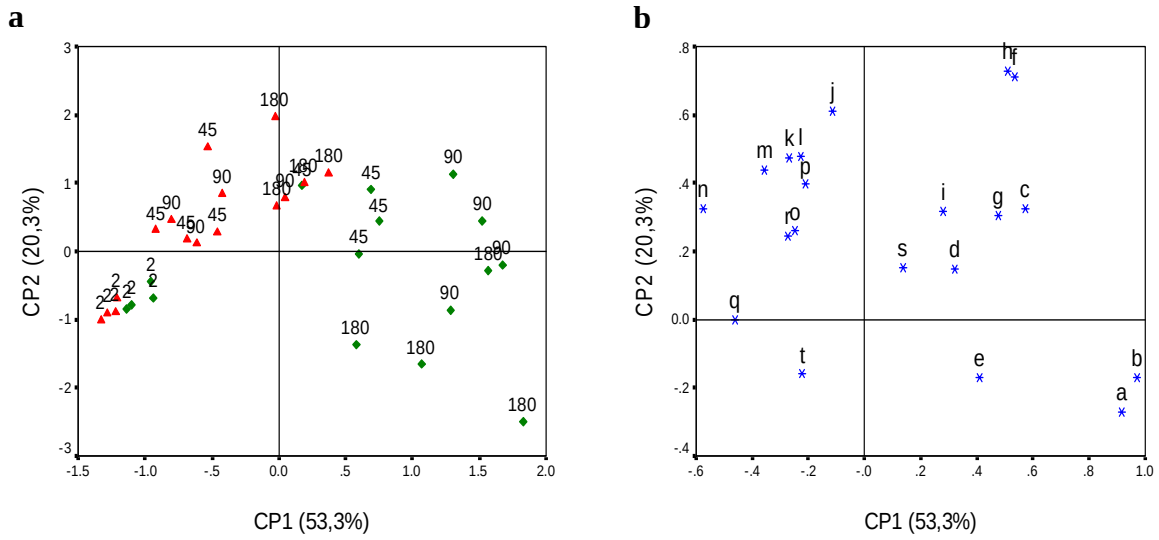


**Figura 2.** Análisis por componentes principales de los perfiles peptídicos. a) Gráfico de scores para PC1 vs. PC2. -▲- Quesos S; -♦- Quesos L. El rótulo de las muestras indica el tiempo de maduración. b) Gráfico de loading para PC1 vs. PC2. Las variables están rotuladas de la a a la t en orden alfabético de acuerdo a su tiempo de retención.

En síntesis, los quesos S se caracterizaron por una proteólisis secundaria moderada con incremento progresivo de péptidos hidrofóbicos e hidrofílicos durante todo el período de maduración. En cambio, los quesos L se caracterizaron por una proteólisis secundaria mucho más profunda, debido a que los péptidos producidos fueron posteriormente hidrolizados a péptidos más pequeños y aminoácidos libres. Similares resultados fueron obtenidos por Hannon *et al.* (2003) en un queso Cheddar por el uso de una cepa autolítica de *Lactobacillus helveticus* en comparación con quesos elaborados con *Lactococcus lactis* solamente o *Lc. lactis* y *L. helveticus*.

## Aminoácidos libres

Los quesos S presentaron niveles de aminoácidos libres totales de 49 y 627 mg/100g de queso a los 2 y 180 d de maduración, respectivamente, mientras que el nivel en los quesos L fue alrededor de cuatro veces mayor: 217 y 1949 mg/100 g de queso al inicio y al final de la maduración. En los gráficos estrella (**Figuras 3a y 2b**) se observan los niveles de los aminoácidos individuales en los quesos S y L a los 2 y 180 d, respectivamente. Los quesos L presentaron niveles significativamente ($p < 0,01$)

mayores que los quesos S de cada uno de los aminoácidos libres analizados, lo que se hizo notorio desde el inicio de la maduración. Las concentraciones de cada aminoácido en los quesos L fueron entre 2 y 8 veces mayores que en los quesos S. A pesar de las diferencias de concentración, los aminoácidos mayoritarios fueron Glu, Lys y Leu en los dos tipos de quesos a los 180 d.

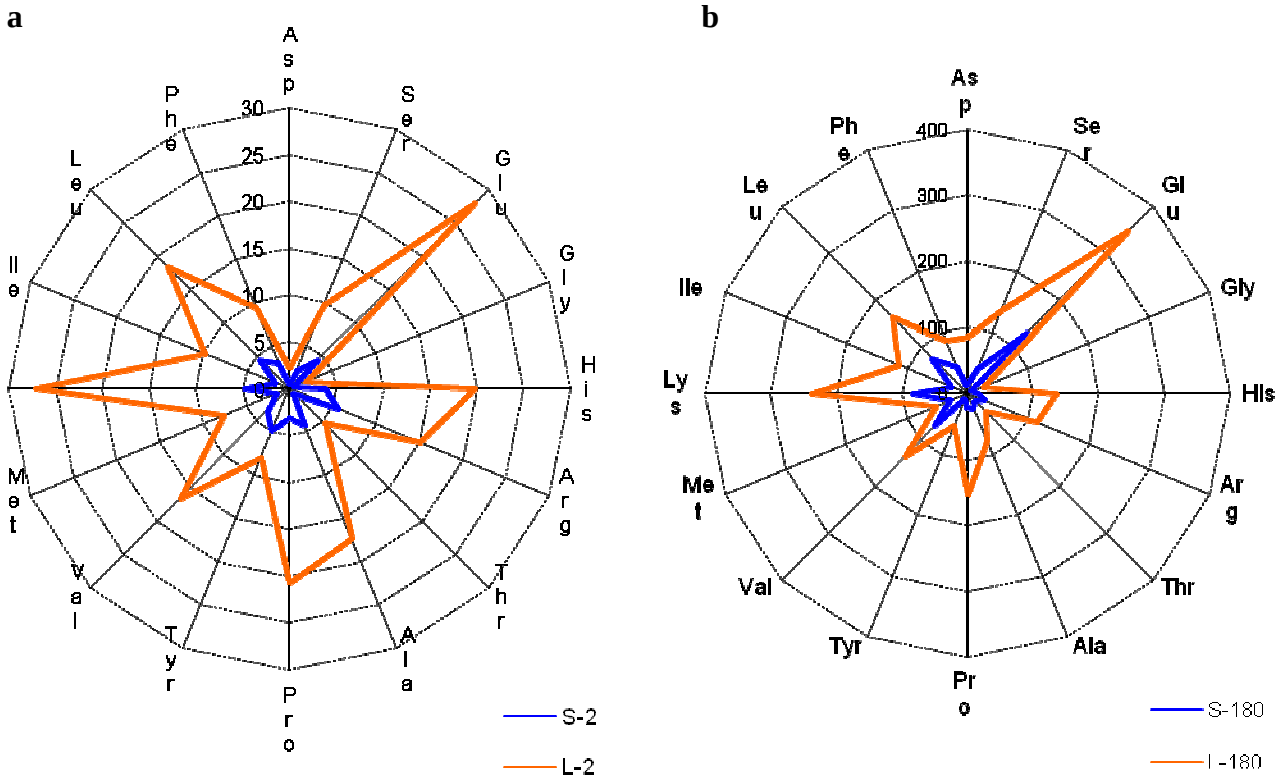


**Figura 3**. Niveles de aminoácidos libres (mg/100 g) en quesos S y L a los 2 (a) y 180 (b) d de maduración.

La lisis del starter durante la maduración ha demostrado ser un factor muy importante en el desarrollo del flavour del producto y la aceleración de la maduración debido a la liberación de enzimas intracelulares. A pesar de que esta característica es altamente cepa dependiente, es conocido que gran parte de las cepas de *L. helveticus* son autolíticas, mientras que un menor número de cepas de *S. thermophilus* poseen esta característica (Lortal y Chapot-Chartier 2005). Si bien en el presente trabajo no se ha estudiado la lisis del starter, los resultados obtenidos en cuanto a la gran disminución de la población de lactobacilos (Bergamini *et al.* 2008) y el gran incremento de los niveles de proteólisis sugiere la lisis de las cepas de lactobacilos empleadas y la consecuente liberación en la matriz del queso de todo el pool enzimático intracelular (Kenny *et al.* 2006). El aumento del nivel de proteólisis por el uso de lactobacilos termófilos y la disminución de su población ha sido también reportado por otros autores (Madkor *et al.* 2000, Kenny *et al.* 2006, Hannon *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos revelan una velocidad de proteólisis secundaria significativamente mayor en quesos de oveja por el uso de cepas de lactobacilos termófilos, las cuales probablemente son autolíticas.

## Ácidos Grasos Libres

Se cuantificaron nueve ácidos grasos en las muestras de quesos de 2 y 180 d de maduración.

Del análisis exploratorio inicial se observó que el valor promedio de lipólisis global (mg AGL totales/kg de queso) obtenido como la suma de las concentraciones de los ácidos grasos cuantificados, aumentó con el tiempo de maduración, lo que era previsible, encontrándose los valores más altos para los quesos L (**Figura 4**).

Al evaluar los AGL individuales se observaron resultados similares. Los perfiles promedio se incrementaron con el tiempo y los quesos L mostraron valores más acentuados que los quesos S,

especialmente para los ácidos que se encontraron en mayor proporción ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ y $C_{18:1}$) (**Figura 5**).

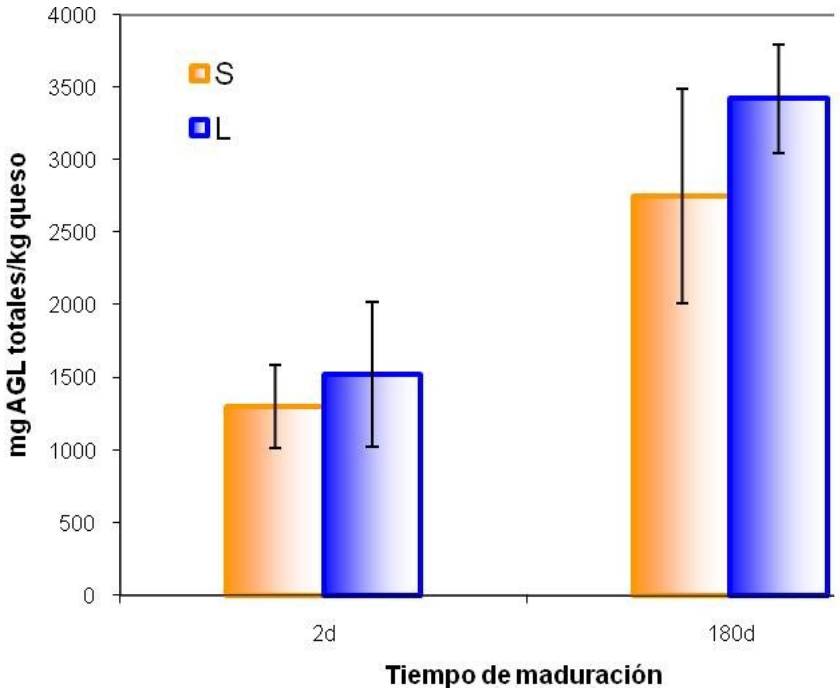


**Figura 4.** Concentraciones totales de AGL al inicio y final de la maduración en los quesos S y L (promedio y desviación estándar).

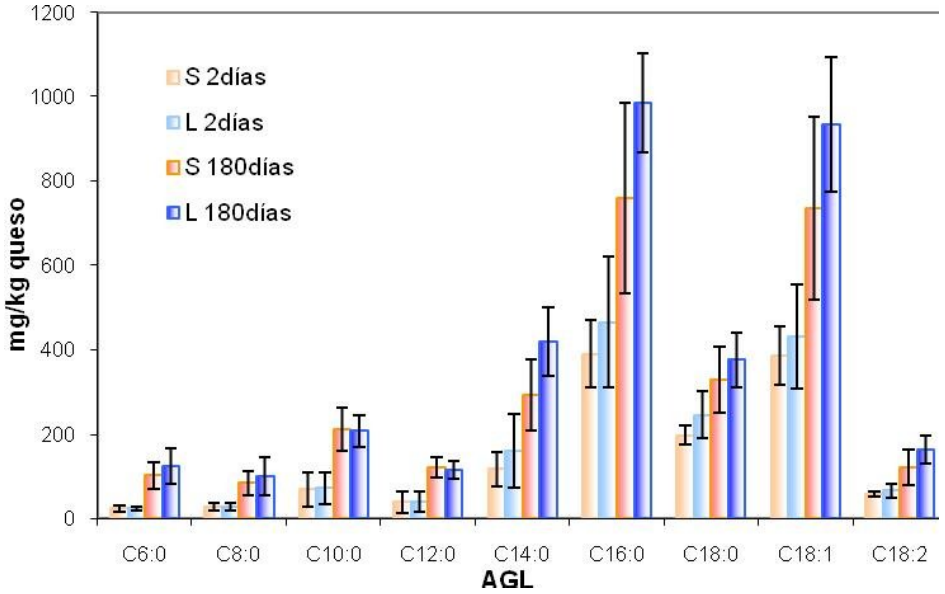


**Figura 5.** Concentraciones individuales de AGL al inicio y final de maduración en los quesos S y L (promedio y desviación estándar).

Posteriormente, los resultados fueron estudiados desde un punto de vista multivariado. Para ello se armó una matriz de 16 filas (muestras) y 9 variables (16x9) y se aplicó ACP. Para la extracción de los componentes o factores se empleó la matriz de correlación (centrado de datos y desviación estándar = 1), ya que de esta manera todas las variables tienen la misma posibilidad de aparición en los

componentes. Por lo indicado por el estadístico de Bartlet (0,71 > 0,5) la matriz puede ser factorizable. Los dos primeros componentes principales explicaron el 95% de la varianza total. Todos los AG fueron importantes en la separación de las muestras. Hubo diferencias marcadas con el tiempo y se observó una diferencia menos acentuada entre las muestras de los quesos S y L debido a la gran dispersión entre las 4 elaboraciones dentro de cada grupo de quesos (**Figura 6**).

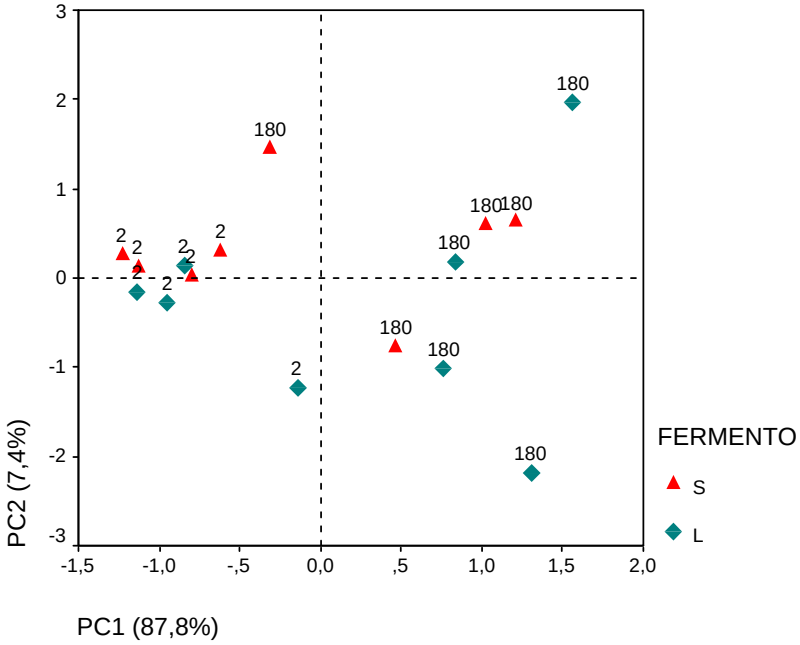


**Figura 6**. Gráfico de scores para PC1 vs PC2 de los perfiles de lipólisis al inicio y final de maduración para los quesos S y L. El rótulo de las muestras indica el tiempo de maduración.

## Compuestos volátiles

Se identificaron un total de 44 compuestos en los quesos S y L de 180 d de maduración.

Los perfiles de ambos fermentos fueron similares desde el punto de vista cualitativo, aunque se encontraron diferencias de tipo cuantitativo. Esto último se apreció en los valores de áreas totales de los compuestos, que fueron mayores para los quesos L.

Los compuestos volátiles se agruparon en seis familias químicas: C (cetonas), A (alcoholes), E (ésteres), Ald (aldehídos), Ac (ácidos) y O (otros compuestos).

Se calcularon el valor medio y la desviación estándar de las áreas (en unidades arbitrarias) de cada grupo de compuestos para cada tipo de queso (**Figuras 7** y **8**). Se observó que los quesos L se caracterizaron por presentar mayores valores de áreas para los aldehídos y cetonas, mientras que los quesos S tuvieron mayores áreas para los compuestos del grupo de los ésteres y de los alcoholes.

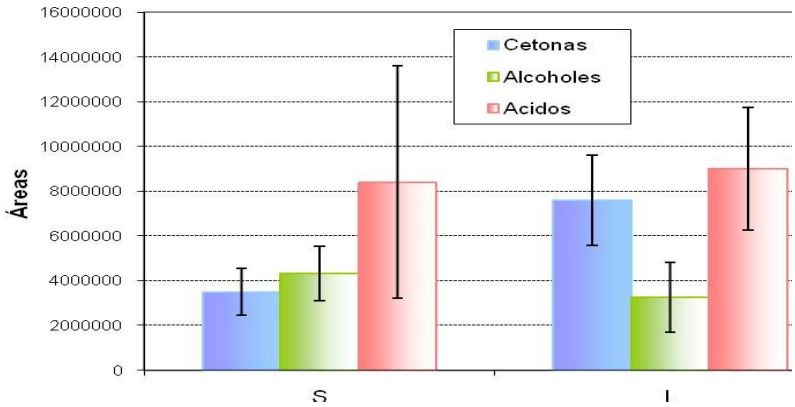


**Figura 7.** Áreas de los compuestos del grupo de las cetonas, alcoholes y ácidos identificados en los quesos S y L (promedio y desviación estándar).

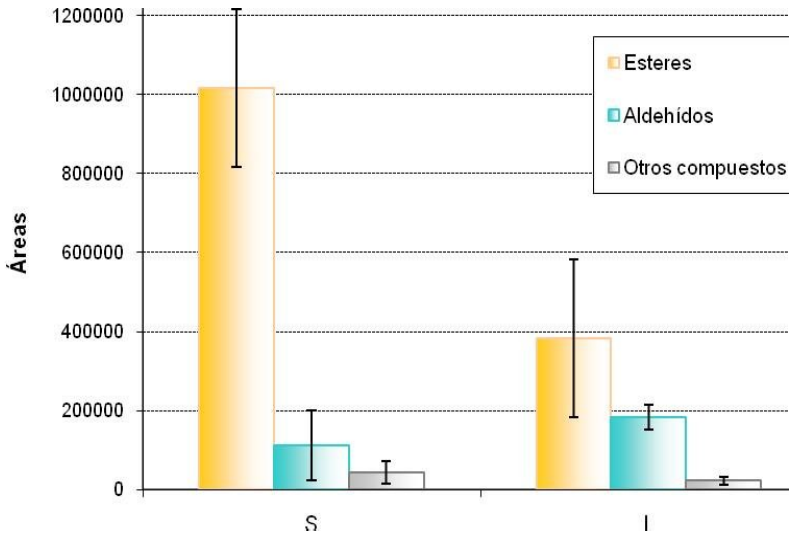


**Figura 8.** Áreas de los compuestos del grupo de los ésteres, aldehídos y otros compuestos identificados en los quesos S y L (promedio y desviación estándar).

Los compuestos que se encontraron en mayores proporciones para los dos tipos de quesos fueron la 2-pentanona+diacetilo, 2-heptanona y acetoína dentro del grupo de las cetonas, el etanol del grupo de los alcoholes, el butanoato de etilo y hexanoato de etilo**,** dentro del grupo de los ésteres, el acetaldehído del grupo de los aldehídos y los ácidos butanoico y hexanoico.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la caracterización del proceso de proteólisis y de lipólisis y se identificaron compuestos volátiles en quesos de oveja elaborados mediante tecnologías desarrolladas y estandarizadas en nuestro Instituto. Los resultados revelaron una importante diferencia en la profundidad de la proteólisis y ligeras diferencias en la lipólisis y en el perfil de compuestos volátiles entre ambos tipos de queso. Los quesos S se caracterizaron por una proteólisis moderada y una lipólisis menos acentuada. En cuanto al perfil de compuestos volátiles se observaron menores áreas totales y un predominio de ésteres y alcoholes. El uso de cepas de lactobacilos termófilos que mueren y probablemente lisan durante la maduración generó en los quesos L una profunda proteólisis secundaria, un incremento en los niveles de lipólisis y una mayor producción de compuestos volátiles, principalmente del grupo de los aldehídos y cetonas, lo que conduciría a una aceleración del proceso de maduración.

Los productos desarrollados y caracterizados en el presente trabajo se están elaborando actualmente en una planta modelo de la Escuela de Agricultura, Ganadería y Granja de la UNL y han sido registrados con los nombres autóctonos de Arandu de humedad intermedia (S) y Arandu de humedad baja (L).

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 5320, 2005) y la Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 2006 37-206).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Bergamini C, Meinardi C, Bernal S, Wolf I, Busetti M y Zalazar C. 2008. Design of two different technologies for the production of argentinean sheep cheeses. Special Issue of the International Dairy Federation, 0801/Part 3: 270-273.

Bergamini C, Hynes E y Zalazar C. 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. International Dairy Journal, 16: 856-866.

Bergamini C, Hynes E, Palma S, Sabbag N y Zalazar C. 2009. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. International Dairy Journal, 19: 467-475.

Drake MA, Boylston TD, Spence KD y Swanson BG. 1996. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in Cheddar cheese. Food Research International, 29 (3-4): 381-387.

Fox PF y McSweeney PHL. 2004. Cheese: an overview. En: Fox PF, McSweeney P, Cogan T, Guinee T). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology - Vol 1: General Aspects. 3º ed. Londres: Elsevier. pag 1-18.

Hannon JA, Kilcawley KN, Wilkinson MG, Delahunty CM y Beresford TP. 2007. Flavour precursor development in Cheddar cheese due to lactococcal starters and the presence and lysis of *Lactobacillus helveticus*. International Dairy Journal, 17: 316-327.

Hannon JA, Wilkinson MG, Delahunty CM, Wallace JM, Morrissey, PA y Beresford TP. 2003. Use of autolytic starter systems to accelerate the ripening of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 13: 313-323.

Kalantzopoulos GC. 1993. Cheeses from ewes´ and Goats´ milk. En: Fox PF, editor. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology - Vol 2: Major cheese group. 2º ed. Londres: Chapman and Hall. pag 507-543.

Kenny O, Fitzgerald RJ, O`Cuinn G, Beresford T y Jordan K. 2006. Autolysis of selected *Lactobacillus helveticus* adjunct strains during Cheddar cheese ripening. International Dairy Journal, 16: 797-804.

Law BA. 2001. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new thechnologies. International Dairy Journal, 11: 383-398.

Lortal S y Chapot-Chartier M-P. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. International Dairy Journal, 15: 857-871.

Madkor SA, Tong PS y El Soda M. 2000. Evaluation of comercial adjuncts for use in cheese ripening: 5. Effect of added freeze-shocked adjunct lactobacilli on proteolysis and sensory quality of reduced fat Cheddar cheese. Milchwissenchaft, 55 (7): 382-386.

Mc Cormick M y Lynch G. 2003. La lechería ovina en la Argentina. Tecnología Láctea Latinoamericana, 9: 12-15.

Perotti MC, Bernal SM, Meinardi CA y Zalazar CA. 2005. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. International Dairy Journal, 15: 1150-1155.

Piraino P, Parente E McSweeney PHL. 2004. Processing of chromatographic data for chemometric analysis of peptides from cheese extracts: A novel approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 6904-6911.

Raynal-Ljutovac K, Lagriffoul G, Paccard P, Guillet I y Chilliard Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. Small Rumiant and Research, 79: 57-72.

# Modelado y Simulación de procesos combinados de deshidratación osmótica y congelación de kiwi

# Modeling and simulation of combined processes of kiwi fruit osmotic dehydration and freezing

Bianchi M (2), Milisenda P (2), Guarnaschelli A (2), Mascheroni RH (1)

(1) CIDCA (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) (CONICET La Plata y UNLP). 47 y 116, 1900 La Plata, Argentina, y
MODIAL (Facultad de Ingeniería UNLP), La Plata, Argentina
(2) Facultad de Química, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano UCEL Avenida Pellegrini 1332, 2000 Rosario, Argentina
mjbianchi@gmail.com

## RESUMEN

Se estudió experimentalmente y se modeló numéricamente la deshidratación osmótica (DO) y posterior congelación (dehidrocongelación) en kiwis presentados en rodajas de 1 cm de espesor. El objetivo del presente trabajo fue poder relacionar las condiciones de operación con la velocidad de avance de los procesos. Se utilizaron métodos analíticos basados en la Ley de Difusión de Fick para predecir la difusión de agua y sólidos solubles (sacarosa) en la etapa de deshidratación osmótica y métodos numéricos de diferencias finitas (esquema explícito) para predecir la variación de temperatura durante la congelación. Para ello se generó software propio en el lenguaje MATLAB, tanto para la predicción de propiedades físicas como la solución numérica de los balances resultantes. En la faz experimental, se realizaron deshidrataciones bajo distintas concentraciones de solución y tiempo de contacto y se congelaron muestras con distinto tiempo de deshidratación. Los datos experimentales fueron utilizados también para validar las predicciones del modelo propuesto. Los modelos desarrollados permitieron predecir satisfactoriamente los perfiles de concentración de sólidos y de agua, y los parámetros cinéticos de deshidratación de la fruta, así como los perfiles de temperatura y el tiempo de proceso durante la congelación de kiwis parcialmente deshidratados.

## ABSTRACT

The osmotic dehydration and following freezing of kiwi presented in slices of one cm of thickness were experimentally studied and numerically modeled. The objective of the present work was to be able to relate the conditions of operation with the speed of advance of the process.

It were used analytical methods based on Fick´s law of diffusion to predict water diffusion and soluble solids (sucrose) in the phase of osmotic dehydration and numerical methods of finite difference (explicit scheme) to predict the variation of temperature during freezing. To fulfill this objective, specific software in MATLAB language was developed. This software was used to predict physical properties and also numerical solutions of the resulting balances.

In the experimental phase, dehydrations under different concentrations of solution and different time of contact were investigated and samples with different dehydration time were frozen. The experimental information obtained was used to validate the predictions of the proposed model.

The developed models allow predicting satisfactorily not only the profiles of solid and water concentration and kinetic parameters of dehydration of the fruit, but also the profiles of temperature and the process time during the freezing of kiwis partially dehydrated.

**PALABRAS CLAVE**: *dehidrocongelación, deshidratación osmótica, congelación, modelado, kiwi.*

**KEYWORDS**: *dehydrofreezing, osmotic dehydration, freezing, modeling, kiwi.*

## INTRODUCCIÓN

Durante la deshidratación osmótica, el alimento está en contacto con una solución de baja actividad de agua (en la mayoría de los casos soluciones concentradas de sales y/o azúcares) y se establecen dos mecanismos de transferencia de masa: i) el agua, que se transfiere desde el producto hacia la solución, frecuentemente acompañada por sustancias naturales (azúcares, vitaminas, pigmentos y componentes del sabor) y ii) en la dirección opuesta, el soluto se transfiere desde la solución hacia el alimento. Como consecuencia de este intercambio, el producto pierde peso y se encoge. Sin embargo, el producto deshidratado no es microbiológicamente estable, por lo que se requiere un tratamiento posterior para prolongar su vida útil. Varios tratamientos fueron estudiados hasta el momento: congelación (Flink 1975, Hawkes y Flink 1978) y secado convectivo (Islam y Flink 1982, Lenart y Lewicki 1988, Ponting 1973, Ponting *et al.* 1966) son los más típicos.

La deshidratación osmótica como deshidratación parcial de frutas y vegetales seguida de un proceso de congelación (osmo-dehidrocongelación) ofrece algunas ventajas, evitando muchas desventajas de cada proceso cuando se aplican separadamente. La principal ventaja no es sólo de calidad, también existen importantes ahorros en energía, *packaging* y costos de distribución debidos a la reducción de peso y tamaño en el producto, por lo que el proceso de dehidrocongelación representa una alternativa tecnológica considerable obteniéndose productos de alta calidad sensorial y nutricional, siendo más estables a la contaminación microbiológica y al deterioro químico (Torreggiani y Bertolo 2001).

El modelado y la simulación de la transferencia de calor y masa durante la osmo-dehidrocongelación es una difícil tarea debido a los dos fenómenos involucrados: transferencia de masa de sólidos y agua entre el producto y la solución osmótica, y luego, transferencia de calor durante la congelación.

En el presente trabajo, se estudió experimentalmente y se modeló numéricamente la congelación y dehidrocongelación de kiwis variedad Hayward presentados en rodajas de 1 cm de espesor. Se utilizaron métodos analíticos para predecir la difusión de agua y sacarosa y calcular los coeficientes de difusión aparentes en la etapa de deshidratación osmótica; y métodos numéricos de diferencias finitas (diferencias finitas explícitas) para predecir la variación de temperatura durante la congelación. Para ello se generó software propio en el lenguaje MATLAB, tanto para la predicción de propiedades físicas como la solución numérica de los balances resultantes.

Los resultados del modelo desarrollado fueron confirmados con los datos experimentales obtenidos con rodajas de kiwi, empleando como solución osmótica sacarosa de grado comercial a dos concentraciones (40º y 60 ºBrix), y luego congelados en un congelador de bandejas convectivo de flujo horizontal (aire a -35 ºC). Se obtuvo una validación satisfactoria entre los resultados experimentales y calculados para todo el proceso considerado, es decir, la deshidratación osmótica seguida de congelación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

**Materia prima**. Se utilizaron kiwis de la variedad Hayward comprados en la ciudad de La Plata, usando como criterio de selección: nivel de maduración, mismo tamaño y forma, para obtener muestras relativamente homogéneas.

**Agente deshidratante**. Se trabajó con sacarosa comercial (Ledesma – Buenos Aires – Argentina).

### Deshidratación Osmótica

Las frutas seleccionadas fueron lavadas en agua corriente para remoción de suciedad superficial. Luego, fueron peladas manualmente y cortadas en rodajas de 1 cm de espesor, utilizando cuchillo de acero inoxidable. Las muestras fueron pesadas y colocadas en vasos de precipitado con una solución deshidratante a 30 ºC.

Las dos concentraciones de sacarosa empleadas en el ensayo fueron de 40 y 60 ºBrix. La relación muestra:solución utilizada fue de 1:10 (p/p) para garantizar una concentración de solutos prácticamente constante durante todo el proceso.

Los ensayos de deshidratación osmótica fueron realizados en un baño termostático, marca FERCA, modelo TT 400 con agitación lineal (110 ciclos por minuto), durante 72 horas con extracción de muestras en tiempos sucesivos correspondientes a: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 72 horas de proceso.

Luego del tiempo de inmersión requerido, las muestras fueron drenadas, colocadas sobre papel absorbente para remoción de solución en exceso y pesadas nuevamente para la determinación de pérdida de peso en relación a la masa inicial del producto.
La evolución de la transferencia de masa durante el proceso fue monitoreada a través de la variación en el tiempo de la pérdida de peso (WR), contenido de sólidos totales (TS) y de sólidos solubles (ºBrix). La determinación de estos parámetros fue realizada por duplicado, utilizando las siguientes expresiones:
**Reducción de peso (WR)**. Fue calculada en una balanza semianalítica a partir de la diferencia de peso de la muestra antes y después de cada tiempo de tratamiento.

$$WR\ (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \qquad (1)$$

donde: WR: pérdida de peso de producto deshidratado (%); $m_i$: masa inicial de la muestra fresca y $m_f$: masa de muestra deshidratada osmóticamente a tiempo t.
**Sólidos totales (TS)**. Fueron determinados en una estufa de vacío a 70 ºC (AOAC, 2002) hasta alcanzar un peso constante.

$$TS\ (\%) = \left(\frac{m_s}{m_0}\right) \times 100 \qquad (2)$$

donde: $m_s$: peso de la muestra seca y $m_0$: peso de la muestra fresca.
**Contenido de sólidos solubles (°Brix)**. Fueron medidos en un refractómetro (Bellinham + Stanley Limited).
A partir de estos valores experimentales, se evaluaron los parámetros cinéticos del proceso de DO:
**Pérdida de agua**. Se calculó en términos porcentuales con la siguiente ecuación:

$$WL\ (\%) = \left(\frac{m_{wo} - m_{wf}}{m_{wo}}\right) \times 100 \qquad (3)$$

donde: WL = pérdida de agua del producto deshidratado (%); $m_{wo}$ = masa inicial de agua de la muestra (g) y $m_{wf}$ = masa final de agua de la muestra (g).
**Ganancia de sólidos**. La ganancia de sólidos, o incorporación de azúcares, fue calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$SG\ (\%) = WL - WR \qquad (4)$$

donde: SG = ganancia de sólidos (incorporación de azúcares) (%).

## Congelación

Luego del proceso de deshidratación osmótica, las muestras fueron congeladas en un congelador convectivo de bandejas con flujo de aire horizontal (-35 ºC). El progreso de la congelación fue monitoreado a través de mediciones de temperaturas con termocuplas de cobre-constantan situadas horizontalmente, hasta alcanzar una temperatura en el producto de -18 ºC.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Modelado del proceso

Cuando se quiere representar un modelo fenomenológico para procesos osmóticos a presión atmosférica, se emplea el modelo de Crank, que consiste en un grupo de soluciones de la ley de difusión de Fick para diferentes geometrías, condiciones límite y condiciones iniciales desarrollado por Crank (Crank 1975). Este modelo ha sido empleado por muchos autores ya que es el modelo fenomenológico más conocido para representar el mecanismo difusional (Ochoa-Martínez y Ayala-Aponte 2005).

El modelo desarrollado para la Deshidratación Osmótica está basado en la Ley de Difusión de Fick para estado no estacionario, que calcula la cantidad de agua que abandona la fruta y los sólidos solubles que difunden hacia la fruta, como una función del tiempo. Las siguientes suposiciones fueron usadas en el desarrollo del modelo: las rodajas de kiwi de 1 cm de espesor se consideraron placas infinitas; las concentraciones iniciales de agua y sólidos solubles en ambas frutas fueron uniformes; el proceso es isotérmico (30 ºC); el coeficiente de difusión aparente es constante ($D \neq f(C)$); flujos simultáneos en contra corriente: difusión de agua desde la fruta y difusión de azúcar hacia la fruta son solamente considerados, otros mecanismos de transferencia son despreciados; se considera que un film de solución de azúcar está adherido a la superficie de la fruta como una capa límite (se asume que este film está a la concentración de equilibrio y que el proceso procede directamente por difusión); se desprecia el encogimiento.
Este fenómeno, en difusión unidimensional puede describirse con la Ley de Fick para estado no estacionario dada por las siguientes expresiones:
Para agua:

$$\frac{\partial C^w}{\partial t} = D^w \frac{\partial^2 C^w}{\partial x^2} \quad (5)$$

Para sólidos solubles:

$$\frac{\partial C^s}{\partial t} = D^s \frac{\partial^2 C^s}{\partial x^2} \quad (6)$$

donde: C: concentración; D: coeficiente de difusión efectivo; t: tiempo; x: distancia desde el centro de la placa y los supraíndices: w: agua y s: sólidos solubles (sacarosa en este caso).
**Condiciones iniciales**
$C = C_0$ en $t = 0$ y $-L/2 < x < +L/2$
**Condiciones de contorno**
$C = C_1$ para $t > 0$; $x = \pm L/2$
donde $C_0$ y $C_1$ son las concentraciones inicial y global (promedio en todo el volumen de solución), respectivamente.
La solución de la ecuaciones (5) y (6) promediada en el volumen, considerando que hay algo de soluto inicialmente presente en el sólido, puede escribirse como:

$$(7) \quad \frac{W - W_\infty}{W_i - W_\infty} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left\{ -D^w (2n+1)^2 \frac{\pi^2}{4l^2} t \right\}$$

$$(8) \quad \frac{S - S_\infty}{S_0 - S_\infty} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left\{ -D^s (2n+1)^2 \frac{\pi^2}{4l^2} t \right\}$$

donde: $D^w$ y $D^s$: coeficientes de difusión efectivos para el agua y el azúcar respectivamente; l: medio espesor de la rodaja de fruta = L/2; W: contenido medio de agua en la fruta a tiempo t; $W_i$: contenido medio de agua en la fruta a tiempo t = 0 (contenido inicial de humedad); $W_\infty$: contenido medio de agua en la fruta a tiempo $t = \infty$ (concentración de equilibrio); S: contenido medio de sacarosa en la fruta a tiempo t; $S_0$: contenido medio de sacarosa en la fruta a tiempo t = 0 (concentración inicial) y $S_\infty$: contenido medio de sacarosa en la fruta a tiempo $t = \infty$ (concentración de equilibrio).
El resultado del modelo desarrollado se introduce luego para predecir los perfiles de temperatura que ocurren durante la congelación.
El fenómeno de congelación se encuentra fundado en la transferencia de energía entre la fruta y el medio refrigerante.

El modelo propuesto para la Congelación está basado en la ecuación diferencial de la 2º Ley de Fourier de conducción de calor, considerando el fenómeno de conducción térmica no estacionario para una placa infinita en una dimensión.
Se asume que: la distribución de la temperatura y de las propiedades físicas es simétrica; no hay transferencia de masa y evaporación durante la congelación (aunque existe un cambio de fase) y no hay generación de calor.
Se llega a la siguiente ecuación (9), considerando las hipótesis planteadas anteriormente:

$$\rho Cp\frac{\partial T}{\partial t} = \nabla k(\nabla T) = k\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \frac{\partial k}{\partial x}\frac{\partial T}{\partial x} \quad (9)$$

Donde: ρ = densidad de la fruta; k = conductividad térmica; T = temperatura; t = tiempo; x = distancia desde el centro de la placa; $C_p$ = capacidad calorífica.

**Condiciones iniciales**

$T(x,t) = T_0$ ; $t = 0$ ; $0 \leq x \leq L/2$

Donde: L/2 = distancia entre el centro y el borde de la placa

**Condiciones de contorno**

Centro: se asume que no hay flujo calórico debido a las condiciones de simetría

$$\left.\frac{\partial T}{\partial x}\right|_{x=0} = 0 \quad (10)$$

Superficie: no hay radiación ni evaporación

$$\left.\frac{\partial T}{\partial x}\right|_{x=L/2} = \alpha(T_S - T_a) \quad (11)$$

Donde: $T_s$ = temperatura en la superficie de la fruta; $T_a$ = temperatura del medio refrigerante (aire); α = difusividad térmica.
La ecuación (9) junto a las condiciones iniciales y de contorno forma un sistema de ecuaciones diferenciales parciales no lineales. Este sistema no tiene solución analítica, por lo que se recurre a una solución numérica.
Se utiliza el método numérico de diferencias finitas (se usó el esquema de diferencias finitas explícitas) para la resolución de los balances, y predecir la variación de temperatura y propiedades en la congelación, discretizando se obtienen las siguientes expresiones:
Para nodos interiores:

$$T_i^{n+1} = T_i^n + \frac{\Delta t k_i^n}{\Delta x^2 \rho_i^n Cp_i^n}(T_{i+1}^n - 2T_i^n + T_{i-1}^n) + \frac{\Delta t}{4\Delta x^2 \rho_i^n Cp_i^n}(k_{i+1}^n - k_{i-1}^n)(T_{i+1}^n - T_{i-1}^n) \quad (12)$$

Para el centro:

$$T_1^{n+1} = T_1^n + \frac{4\Delta t k_1^n}{\Delta x^2 \rho_1^n Cp_1}(T_2^n - 2T_1^n) \quad (13)$$

Para el contorno:

$$T_l^{n+1} = T_l^n + \frac{2\Delta t}{\Delta x^2 \rho_l^n Cp_l^n}(T_a - 2T_l^n + T_{l-1}^n) + \frac{\Delta t}{4\Delta x^2 \rho_l^n Cp_l^n}\left[(h\Delta x - k_{l-1}^n)(T_a - T_{l-1}^n)\right] \quad (14)$$

Cálculo de la temperatura de inicio de congelación (Tocci y Mascheroni, 2008):

$$T_{CR} = 129,37(W)^3 - 356,67(W)^2 + 326,11(W) - 100,55 \quad (15)$$

Donde: W=fracción en peso del contenido de agua

**Cálculo de las propiedades para temperaturas superiores al punto de congelación**
Capacidad calorífica, Cp (Mascheroni 1995):

$$\boxed{Cp = 1672 + 2508W} \quad (16)$$

Densidad, ρ (Choi y Okos 1986):

$$\boxed{\frac{1}{\rho} = \sum \frac{x_i}{\rho_i}} \quad (17)$$

$$\boxed{\rho_i = a_i + b_i T} \quad (18)$$

$$\boxed{\rho_a = 997,18 + 0,0031439T - 0,0037574T^2} \quad (19)$$

Donde: ρ = densidad de la fruta; $\rho_i$ = densidad de cada componente de la fruta; $x_i$ = fracción en peso de cada componente de la fruta; $\rho_a$ = Densidad del agua; T = temperatura; $a_i$ y $b_i$ = coeficientes individuales de los componente de la fruta.

Conductividad Térmica, k (Hermans 1979):

$$\boxed{k = 0,448W + 0,0005T} \quad (20)$$

Donde: k = coeficiente de conductividad térmica de la fruta; T = temperatura (ºK); W= fracción en peso del contenido de agua.
**Cálculo de las propiedades para temperaturas inferiores al punto de congelación:**
Capacidad calorífica, Cp (Mascheroni 1995):

$$\boxed{Cp = Cp_s\left(1 - W\right) + W(Cp_h - Cp_a)\left(1 - \frac{T_{CR}}{T}\right) + Cp_a W - \frac{LWT_{CR}}{T^2}} \quad (21)$$

donde: $Cp_s$= capacidad calorífica de sólidos; $Cp_h$= capacidad calorífica del hielo; $Cp_a$= capacidad calorífica del agua; L= 333.500 J/Kg
Densidad, ρ (Choi y Okos 1986):

$$\boxed{\rho = \frac{1}{\left[\frac{\gamma}{\rho_\gamma} + \frac{(1-\gamma)}{\rho_w}\right]W + \frac{(1-W)}{\rho_s}}} \quad (22)$$

Donde: ρ = densidad de la fruta; $\rho_\gamma$ = densidad del hielo; $\rho_s$ = densidad del sólido; $\rho_w$ = densidad del agua; W= contenido de agua; γ = contenido de hielo = 1 – (Tcr / T) (Mascheroni 1995)
Conductividad Térmica, k (Choi y Okos 1986):

$$\boxed{k = \left[\gamma k_\gamma + \left(1 - \gamma W\right) k_w\right] W + (1 - W)k_s} \quad (23)$$

Donde: γ = contenido de hielo = 1 – (Tcr / T); k = coeficiente de conductividad térmica de la fruta; W= contenido de agua; $k_w$ = coeficiente de conductividad térmica para el agua; $k_s$ = coeficiente de conductividad térmica para los sólidos; $k_\gamma$= coeficiente de conductividad térmica para el hielo.

Para ello se generó software propio en el lenguaje MATLAB, tanto para la predicción de propiedades físicas como la solución numérica de los balances resultantes.

## Resultados de las experiencias de DO

En las **Figuras 1** y **2** se observan las evoluciones de los parámetros: pérdida de agua y ganancia de sólidos, de las rodajas de kiwi durante las experiencias de DO, utilizando sacarosa como agente deshidratante a 40 y 60 ºBrix, respectivamente. Se observa que las muestras deshidratadas sufren una mayor velocidad de pérdida de agua (**Figura 1**) durante las 4 primeras horas de proceso en comparación con la pérdida de agua alcanzada en las 72 horas de deshidratación, principalmente en los ensayos realizados con sacarosa a 60 ºBrix, consecuencia de una mayor fuerza osmótica de deshidratación existente entre el alimento y la solución hipertónica al inicio del proceso.

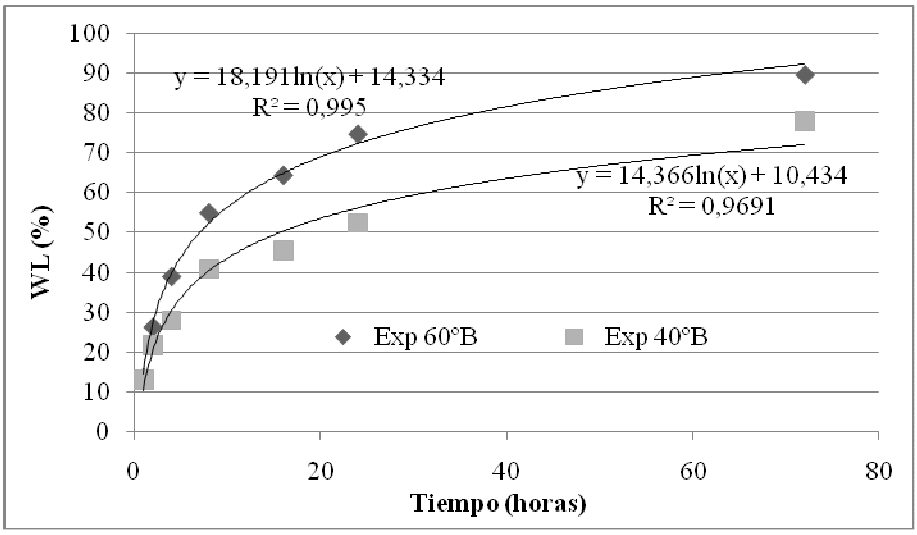


**Figura 1**. Pérdida de agua (Water Loss: WL) durante 72 horas de proceso para las 2 condiciones estudiadas.

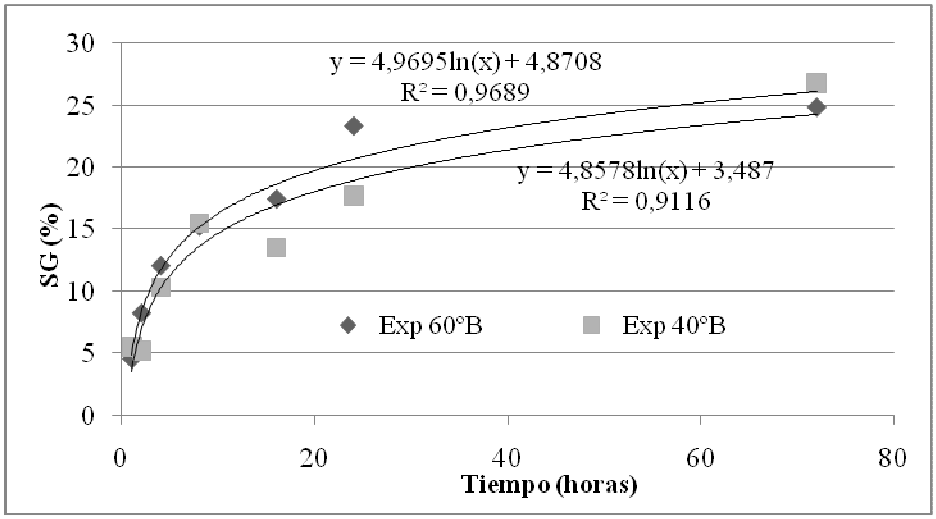


**Figura2.** Ganancia de sólidos (Solid Gain: SG) durante 72 horas de proceso para las 2 condiciones estudiadas

Además, en ambos ensayos, se observó una tendencia a la estabilización hacia las 72 horas de proceso, fundamentalmente debido a una aproximación a la condición de equilibrio.

Con relación a la ganancia de sólidos, en la **Figura 2**, se observa que un incremento en la concentración de sacarosa (solución 60 °Brix) no influyó significativamente en el ingreso de sólidos, comparado con la solución menos concentrada (solución 40 °Brix).

En la **Tabla 1**, se presentan los valores de los coeficientes de difusión aparentes durante la DO en ambas concentraciones, obtenidos graficando en escala logarítmica el valor de las concentraciones adimensionales vs tiempo y ajustando al primer término de las ecuaciones (7) y (8) (aproximación

para tiempos largos). Se observa que los coeficientes son claramente más altos para la solución de 60 °Brix, y además para sacarosa respecto de agua.

**Tabla 1**. Valores de los coeficientes de difusión aparentes durante la DO de kiwis.

| Fruta y condiciones | D Agua ($m^2/s$) | D Sacarosa ($m^2/s$) |
|---|---|---|
| Kiwi 40 ºBrix | 3,72 $10^{-09}$ ($R^2$ = 0,867) | 1,81 $10^{-08}$ ($R^2$ = 0,957) |
| Kiwi 60 ºBrix | 7,09 $10^{-09}$ ($R^2$ = 0,973) | 2,35 $10^{-08}$ ($R^2$ = 0,836) |

## Resultados de las experiencias de congelación

La **Figura 3** presenta un ejemplo de las historias térmicas experimentales y simuladas por el modelo numérico para las muestras deshidratadas, en este caso en solución de sacarosa de 60 °Brix. Se observa que – como es esperable - las muestras deshidratadas durante mayor tiempo presentan menor tiempo de congelación debido a la disminución del contenido de agua congelable.

Comparando las curvas experimentales y las simuladas teóricas, las historias térmicas predichas son concordantes – contemplando los posibles errores experimentales y además las limitaciones de los valores de propiedades térmicas usados - con las experimentales para las todas las muestras deshidratadas.

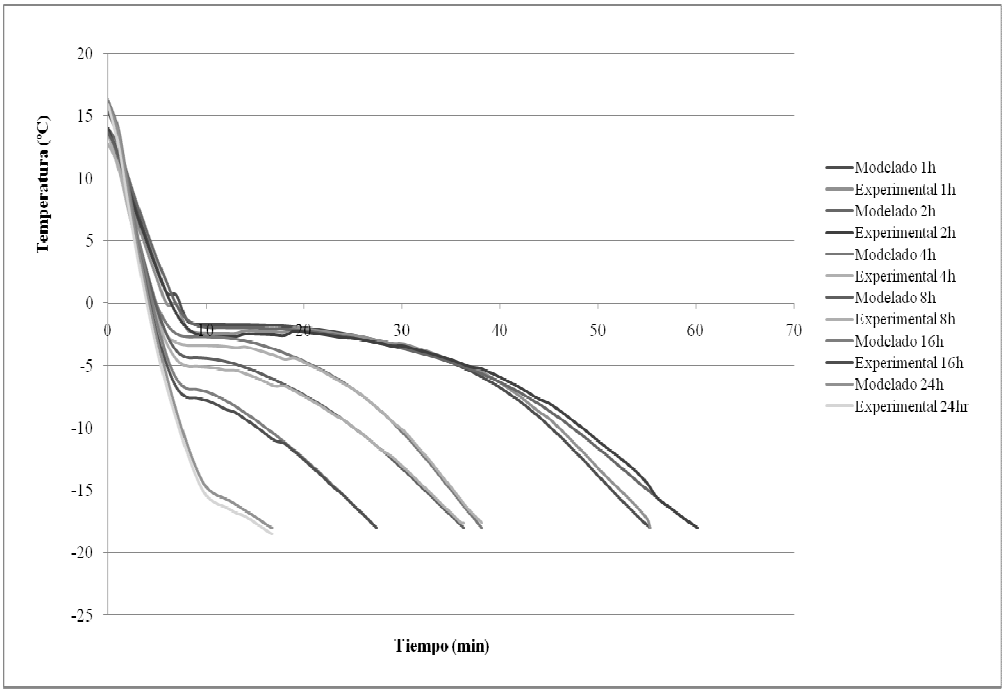


**Figura 3.** Historias térmicas durante la congelación de Kiwi previamente deshidratado con solución de sacarosa de 60 °B

## CONCLUSIONES

La simulación del proceso de dehidrocongelación (deshidratación osmótica y posterior congelación) abordada en el presente trabajo fue satisfactoriamente validada con los resultados experimentales obtenidos de rodajas de kiwi.

Por lo tanto, los modelos desarrollados permiten predecir los perfiles de concentración de sólidos y de agua, y los parámetros cinéticos de deshidratación de la fruta, así como los perfiles de temperatura y el tiempo de proceso durante la congelación de muestras parcialmente deshidratadas.

## AGRADECIMIENTOS
El presente trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Desarrollo de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS
Agnelli ME, Marani, CM and Mascheroni, RH. 2005. Modelling of heat and mass transfer during (osmo)dehydrofreezing of fruits. Journal of Food Engineering, 69, 415-424.

A.O.A.C. 2002. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., Ed. William Horwitz, Gaithersburg.

Choi Y, Okos MR. 1986. Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods. Food Engineering and Process Applications. 1, 93.

Crank J. 1975. The mathematics of diffusion. Oxford: Clarendon Press.

Flink JM. 1975. Process conditions for improved flavor quality of freeze dried foods. Journal of Agriculture & Food Chemistry, 19,1019–1026.

Hawkes J, Flink JM. 1978. Osmotic concentration of fruit slices prior to freeze dehydration. Journal of Food Processing Preservation, 2, 265–284.

Hermans F. 1979. Thesis, University of Leven, Holanda.

Islam MN, Flink JN. 1982. Dehydration of potato II. Osmotic concentration and its effect on air drying behaviour. Journal of Food Technology, 17, 387–403.

Lenart A, Lewicki PP. 1988. Osmotic preconcentration of carrot tissue followed by convection drying. In S. Bruin (Ed.), Preconcentration and drying of food materials (pp. 307 –308).

Mascheroni RH. 1995. Curso de Transferencia de Calor en Refrigeración, Congelación y Descongelación de Alimentos. Módulo Propiedades Térmicas, 55 pag.

Ochoa-Martínez CI, Ayala-Aponte A. 2005. Modelos matemáticos de transferencia de masa en deshidratación osmótica. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 4, (5), 330-342.

Ponting JD. 1973. Osmotic dehydration of fruits — Recent modifications and applications. Process Biochemistry, 8, 18–20.

Ponting JD, Walters GG, Forrey RR, Jackson R, Stanley WL. 1966. Osmotic dehydration of fruits. Food Technology, 20, 125–128.

Tocci AM, Mascheroni RH. 2008. Some thermal properties of fresh and osmotically dehydrated kiwifruit above and below initial freezing temperature. Journal of Food Engineering 88, 20-27.

Torreggiani D, Bertolo G. 2001. Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structural effects. Journal of Food Engineering, 49, 247-253.

# Efecto del tratamiento térmico de granos de soja sobre las propiedades de la harina

# Effect of soybean heating process on flour properties

Brondi MC (1), Martínez ML (1, 2), Marin MA (1), Ribotta PD (1, 2)

[1] Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC, Argentina. E-mail: ma.andrea.marin@gmail.com
[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina.

## RESUMEN

Los porotos de soja y sus derivados tienen gran riqueza en proteínas de elevado valor biológico y razonable digestibilidad, que los convierten en una fuente nitrogenada de reemplazo con costo sustancialmente inferior a las proteínas de origen animal. Sin embargo, la presencia de compuestos químicos, en el poroto de soja "crudo", tales como inhibidores de tripsina y de quimotripsina, lectinas, taninos, fitatos y saponinas, denominados genéricamente antinutrientes o factores antinutricionales disminuyen la eficiencia nutricional de dietas de soja respecto a lo que se podría esperar si sólo se tuviera en cuenta su composición química. El contenido de estos factores se reduce significativamente como consecuencia de un procesamiento térmico. Por esta razón es fundamental un correcto control de la temperatura durante el proceso de manufactura. Las temperaturas excesivamente altas y aplicadas por tiempos muy prolongados pueden dañar la calidad del poroto, principalmente sus proteínas cambiando su configuración y alterando su digestibilidad. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del procesamiento térmico de porotos de soja por lecho fluidizado sobre las propiedades de las harinas. Se utilizaron dos variedades de soja de semilleros argentinos. Los porotos fueron acondicionados para obtener dos contenidos de humedad para cada variedad (entre 0,1 y 0,2 kg agua/kg sólidos). Posteriormente fueron secados por 0; 2,5; 5 y 10 min en un secador de lecho fluidizado con aire caliente a 130 °C. Los porotos tratados se molieron y la harina se tamizó. Se determinó el contenido de humedad, la actividad ureásica, el color de las harinas y la solubilidad de proteínas. Las harinas tuvieron diferencias en los parámetros de color, la variedad RA 626 presentó menores valores de L (luminosidad) y a (tonalidad de verde a rojo), y mayores valores de b (tonalidad de azul a amarillo) que la variedad DM 5800. Ambas variedades de soja presentaron curvas de secado similares, no mostrando diferencias significativas en la velocidad de pérdida de agua ni en los perfiles de inactivación de la ureasa ni de pérdida de solubilidad de las proteínas. El contenido inicial de humedad afectó la inactivación de la ureasa, el cambio de color y la solubilidad de proteínas en ambas variedades. La velocidad de secado fue mayor en ambas variedades cuando fueron acondicionadas a altos contenidos de humedad, sin embargo, el contenido de humedad final alcanzado luego de 10 min de secado fue mayor en las muestras con alto contenido de humedad inicial. También se observó mayor grado de insolubilización de proteínas en las muestras con alto contenido de humedad inicial. Los resultados muestran que el tratamiento térmico de porotos de soja por lecho fluidizado permite reducir los factores antinutritivos en un corto tiempo de tratamiento ejerciendo un estricto control de los parámetros de proceso, y con baja influencia de la variedad de soja utilizada.

## ABSTRACT

Beans and soy products are rich in proteins of high biological value and reasonable digestibility, which makes them a source of nitrogen replacement with a substantially lower cost than the animal proteins. However, the presence of chemicals in "raw" soybeans such as inhibitors of trypsin and chymotrypsin, lectins, tannins, saponins and phytates, generically referred to as anti-nutritional factors decreases nutritional efficiency of soy diets with respect to what one might expect if its chemical composition is taken into account as a single parameter. The content of these factors is significantly reduced as a result of thermal processing. It is therefore essential to control a proper temperature during the manufacturing process. Excessively high temperatures during a very long time can damage the quality of beans, mainly its proteins, changing their shape and altering their digestibility. The aim of this work was to study the effect of thermal processing of soy beans using fluidized bed on the properties of

flour. We used two varieties of soybean seed from Argentina. The beans were put up for two moisture contents for each range (between 0.1 and 0.2 kg water / kg solids). They were then dried for 0, 2.5, 5 and 10 min in a fluidized bed dryer with hot air at 130 °C. The treated beans were grinded and flour was sieved. Moisture content, urease activity, the color of the flour and the solubility of proteins were determined. Flours showed differences in color parameters, the RA 626 variety had lower values of L (lightness) and a (redness-greenness), and higher values of b (yellowness-blueness) than the variety DM 5800. Both soybean varieties showed similar drying curves, showing no significant difference in the rate of water loss or the profiles of urease inactivation and loss of solubility of proteins. The initial moisture content affected the profile of drying and inactivation of urease, the change in color and solubility of proteins in both varieties. The drying rate was higher in both varieties when they were upgraded to high moisture content, however, the final moisture content reached after 10 min of drying was higher in samples with high initial moisture content. It was also noted greater insolubilisation of protein samples with high initial moisture content. The results show that the heat treatment of soybean by fluidized bed can reduce the anti-factors in a short time of treatment through tight control of process parameters. Soybean variety had a low influence on process parameters.

**PALABRAS CLAVE**: *soja, lecho fluidizado, tratamiento térmico, ureasa.*

**KEYWORDS**: *soybean, fluidized bed, heat treatment, urease.*

## INTRODUCCIÓN

La soja es utilizada tanto para la alimentación humana como para la animal debido a la facilidad en el manejo y el relativo bajo costo de la producción primaria, su alto valor nutricional y las posibilidades de desarrollo de productos derivados. Uno de los principales subproductos lo constituye la harina, que es una importante fuente de proteínas no sólo por su cantidad sino también por la calidad de las mismas. Las aplicaciones de la harina de soja integral incluyen usos tales como: la materia prima para la leche de soja, el tofu y otros alimentos especiales; así como, un producto económico para extender la leche en polvo descremada que se utiliza en bebidas (especialmente en países en vías de desarrollo). De igual manera, estos ingredientes encuentran usos en productos de panificación.

La soja y sus derivados poseen gran riqueza en proteínas de elevado valor biológico y buena digestibilidad, que los convierten en una fuente nitrogenada de reemplazo con costo inferior a las proteínas de origen animal. Sin embargo, la presencia de compuestos químicos tales como inhibidores de tripsina y de quimotripsina, lectinas, taninos, fitatos y saponinas, denominados genéricamente antinutrientes o factores antinutricionales, disminuyen la eficiencia nutricional de dietas de soja. Los inhibidores de las proteasas anulan la actividad de las enzimas proteolíticas en el aparato digestivo y constituyen casi un 6 % del contenido total de proteínas de la soja. Los principales componentes son los inhibidores termolábiles Kunitz de la tripsina y el inhibidor termolábil Bowman-Birk de la tripsina y la quimotripsina (Liener 1994, Martínez et al. 2008). Estos antinutrientes, son de naturaleza proteica y poseen diferente termoestabilidad, y deben ser inactivados mediante tratamientos térmicos habituales antes de su consumo. La temperatura, el tiempo de aplicación y las condiciones de humedad a las que se lleva a cabo el tratamiento deben ser rigurosamente controlados debido a que temperaturas excesivamente altas y aplicadas por tiempos muy prolongados pueden dañar la calidad del poroto, principalmente sus proteínas alterando su estructura y reduciendo el nivel y degestibilidad de algunos aminoácidos (Parson et al. 1992, Marsman et al. 1995, Zhu et al. 1996, Osella et al. 1997). La evaluación de la actividad ureásica residual en productos de soja es habitualmente empleada como indicador de la eficacia del tratamiento de inhibición practicado (Araba y Dale 1990).

En el secado por lecho fluidizado se produce una mezcla rigurosa entre los sólidos y el agente de secado, aire caliente, incrementando la transferencia de calor y masa. La importancia de la tecnología del lecho fluidizado radica en que las partículas son suspendidas y movidas aleatoriamente por el agente como si fueran un fluido (Wiriyaumpaiwong et al. 2004). Según Osella y otros (1997) y Soponronnarit y otros (2001), los secadores de lecho fluidizado constituyen una tecnología adecuada para conseguir simultáneamente el secado del poroto de soja y la inactivación tanto de la ureasa como del inhibidor de la tripsina, en tanto el rango de la temperatura de secado sea entre 120 y 140 ºC. La solubilidad de las proteínas disminuye como resultado del proceso de calentamiento, por lo que se

considera que el grano ha sido sobrecalentado si la diferencia de pH es inferior a 0,02 y cuando se observa una excesiva pérdida de solubilidad de las proteínas.
En un trabajo previo se estudió la optimización de los parámetros de secado de granos de soja por lecho fluidizado mediante un diseño de superficie de respuesta (Martínez et al. 2008). En este se concluyó que un tratamiento a 130,6 ºC durante 7,3 min para (humedad inicial de los granos 73 g/kg) fue una buena combinación para lograr la inactivación de la ureasa.
En el presente trabajo se estudió el efecto del procesamiento térmico de porotos de soja de dos variedades por lecho fluidizado, analizándose la cinética de secado y de inactivación de la ureasa y la calidad de las harinas obtenidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo las determinaciones se utilizaron dos variedades de soja de semilleros argentinos, RA 626 del criadero Santa Rosa y DM 5800 del criadero Asociados Don Mario S.A. La variedad RA 626 presenta forma esférica, tono del tegumento claro y el peso de 1000 semillas es 163,0 g; y la variedad DM 5800 presenta forma esférica, tono del tegumento intermedio y el peso de 1000 semillas es 143,5 g. El contenido de humedad inicial de los granos fue de 0,07 kg/kg.

### Acondicionamiento del material

2,500 kg de porotos "crudos" de cada variedad fueron hidratados para alcanzar dos contenidos de humedad: ~ 0,10 y 0,18 kg agua/kg sólidos (~ 10 y 18 %, respectivamente). Los lotes de porotos se colocaron en recipientes herméticamente cerrados y se almacenaron a una temperatura de entre 8 y 10 ºC por al menos 48 h, con mezclado periódico, para alcanzar el equilibrio y asegurar una distribución uniforme de la humedad en el grano. Antes del tratamiento, las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente hasta alcanzar esta temperatura.

### Tratamiento térmico por lecho fluidizado

Para cada tratamiento fueron utilizados 0,300 kg de material acondicionado, los cuales fueron sometidos a tratamiento térmico durante 0; 2,5; 5 y 10 min, en un secador de lecho fluidizado de escala piloto (modelo FT31, Armfield Limited, Inglaterra), con aire caliente a 130 °C. Luego de que los porotos tratados alcanzaron temperatura ambiente se molieron y, la harina resultante se tamizó para conseguir el tamaño de partícula deseado para llevar a cabo las determinaciones posteriores (malla estándar No. 40 US). Se realizaron duplicados por cada tratamiento térmico.

### Análisis de calidad de la harina

El contenido de humedad de la harina se determinó en una estufa a 105 ºC hasta alcanzar peso constante.
La actividad ureásica se determinó mediante el método AACC 22–90 (AACC 1995). Este consiste en medir el cambio de pH que resulta de la transformación de la urea en amoníaco por acción de la ureasa. El valor de la diferencia de pH se midió utilizando un pH metro CG 837 (Schott, Alemania). Los valores calculados para la actividad ureásica se expresaron como diferencias de pH.
El color de la harina tamizada se determinó con un espectrofotómetro Minolta 508d (Ramsey, EUA), utilizando una fuente de iluminación D65 y 10° de ángulo del observador. Se realizaron tres lecturas de cada muestra y se registraron como valores CIE-LAB, L (luminosidad), a (tonalidad de verde a rojo), y b (tonalidad de azul a amarillo). La diferencia total de color entre las harinas obtenidas de muestras procesadas térmicamente (por 2,5; 5 y 10 min) (L, a y b) y las no procesadas ($L_o$, $a_o$ y $b_o$) fue calculada según la siguiente ecuación (MacDougall 2002):

$$DTC = \sqrt{(L - Lo)^2 + (a - ao)^2 + (b - bo)^2}$$

La solubilidad de proteínas se determinó dispersando la harina de soja en un buffer fosfato 50 mM (pH 7, 0) durante 30 min con agitación ocasional. Luego las muestras fueron centrifugadas a 14000 g durante 10 min para precipitar el material insoluble. Se recuperó el sobrenadante y el contenido de proteínas presentes en él se determinó usando el procedimiento de Bradford.

### Análisis estadístico

Los análisis se realizaron por duplicado. Los resultados fueron expresados como: promedio de los duplicados ± DS. 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. El análisis estadístico se realizó mediante el programa Infostat (Infostat 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego del acondicionamiento de los granos, se obtuvieron los siguientes contenidos de humedad 0,117 y 0,202 kg de agua por kg de sólidos secos para la variedad DM 5800; y 0,125 y 0,1918 kg de agua por kg de sólidos secos para la variedad RA 626. Diferentes lotes de porotos fueron sometidos a tratamiento térmico en el secador de lecho fluidizado por distintos tiempos. En la **Figura 1** se presenta el efecto del tratamiento térmico del poroto de soja sobre su contenido de humedad final. Puede observarse que el contenido de humedad de los porotos disminuyó progresivamente durante todo el período de calentamiento, y la pérdida de humedad luego de 10 min de tratamiento térmico fue de 41,0 % y 45,4 % para la variedad DM 5800 con bajo y alto contenido de humedad inicial, respectivamente; y de 41,1 % y 43,1 % la variedad RA 626 con bajo y alto contenido de humedad inicial, respectivamente. Se observó que mientras mayor fue el contenido de humedad inicial de los porotos mayor fue la transferencia de agua hacia el medio calefactor y, en consecuencia, mayor velocidad de pérdida de agua durante el período de tratamiento térmico.

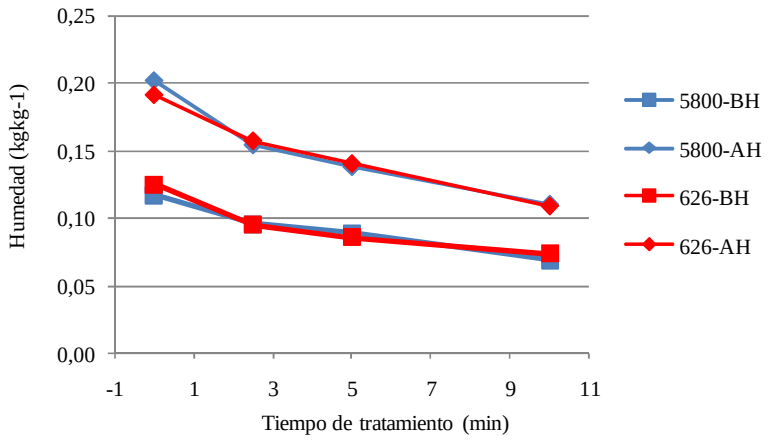


**Figura 1**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre el contenido de humedad final. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

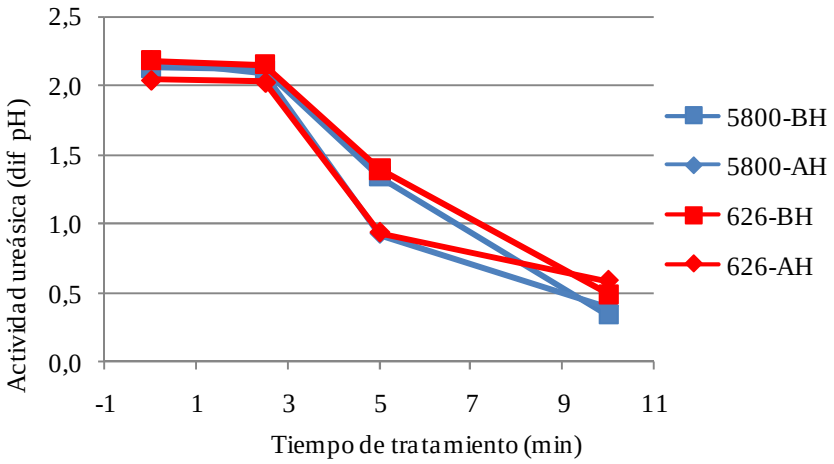


**Figura 2**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre la actividad ureásica (expresada como diferencia de pH). 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

La **Figura 2** muestra la variación de la actividad ureásica, medida como diferencia de pH, durante el tratamiento térmico. La actividad ureásica de los porotos de soja sin tratamiento varió entre 2,04 y 2,18 unidades de pH, y se redujo dramáticamente durante el tratamiento térmico. Los perfiles de inactivación de la ureasa de ambas variedades de soja fueron similares, sin embargo, entre 2,5 y 5 min de tratamiento los lotes acondicionados con alto contenido de humedad mostraron una mayor velocidad de pérdida de la actividad ureásica; y entre 5 y 10 min esta tendencia se invirtió. Con respecto al valor final de cambio de pH, luego de 10 min de calentamiento, la variedad DM 5800 presentó menores valores (0,34 ± 0,04 y 0,40 ± 0,00 para baja y alta humedad respectivamente) que la variedad RA 626 (0,50 ± 0,06 y 0,59 ± 0,02 para baja y alta humedad, respectivamente). El nivel máximo de actividad ureásica aceptado en la alimentación animal es variado, con valores aceptables entre 0,2 o menor (McNaughton 1980) hasta 0,5 unidades de cambio de pH (Waldroup et al. 1985). Por otro lado, Batal y otros (2000), encontraron una alta pérdida de rendimiento en la ganancia de peso en pollos sólo con actividades por arriba de 1,75 unidades de cambio de pH. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que sólo el lote de la variedad RA 626 acondicionada con alta humedad presentó valores mayores 0,5 unidades de cambio de pH luego de 10 min de tratamiento térmico.

Los parámetros de color de las harinas cambiaron según la variedad y el contenido de humedad de los porotos (**Tabla 1**). La variedad RA 626 presentó menores valores de L (luminosidad) y a (tonalidad de verde a rojo), y mayores valores de b (tonalidad de azul a amarillo) que la variedad DM 5800. También se encontró que las muestras con alto contenido de humedad (0,202 y 0,192 kg/kg para DM 5800 y RA 626 respectivamente), tuvieron mayores valores de los parámetros a y b y menor valor de L que las harinas con bajo contenido de humedad (0,117 y 0,125 % kg/kg para DM 5800 y RA 626 respectivamente).

**Tabla 1**. Evaluación del color de las harinas producidas a partir de los porotos acondicionados. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. L: luminosidad, a: equilibrio entre rojo y verde, y b: equilibrio entre amarillo y azul.

| | **5800-BH** | **5800-AH** | **626-BH** | **626-AH** |
|---|---|---|---|---|
| **L** | 86,06±0,60 | 80,89±0,64 | 85,92±0,75 | 78,39±0,31 |
| **b** | 20,41±0,45 | 22,14±0,52 | 23,07±0,57 | 25,12±0,80 |
| **a** | -0,49±0,18 | 0,46±0,23 | -1,32±0,29 | -0,38±0,16 |

Las **Figuras 3** y **4** presenta el efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre los parámetros de color de las harinas. El tratamiento térmico de los porotos de soja afectó significativamente la luminosidad y el equilibrio entre azul y amarillo de las harinas. En todos los casos evaluados, L aumentó, mientras que b disminuyó con el incremento del tiempo de residencia en el secador de lecho fluidizado. Estos resultados muestran la influencia significativa que el contenido de agua tuvo sobre los parámetros de color.

La diferencia total de color (DTC) describe el desarrollo total de color. La medida del color por reflexión provee información sobre el desarrollo total de color como es visualmente observado (Rufian-Henares et al. 2009). La **Figura 5** presenta la diferencia total de color obtenida como consecuencia del tratamiento térmico. La DTC de las harinas incrementó con el tiempo de tratamiento térmico de los porotos de soja, indicando un aumento total del color como consecuencia del calentamiento. El oscurecimiento de los alimentos es producido, generalmente, por reacciones no enzimáticas, como las reacciones de Maillard y de caramelización. Las reacciones de Maillard son favorecidas en alimentos con altos contenidos de proteínas y carbohidratos, y un contenido de humedad intermedio a temperaturas superiores a 50 ºC y a valores de pH entre 4 y 7. Mientras que la caramelización ocurre por degradación de azúcares y necesita condiciones más drásticas como temperaturas mayores a 120 ºC, valores de pH menores a 3 o mayores a 9 y baja actividad acuosa (Kroh 1994).

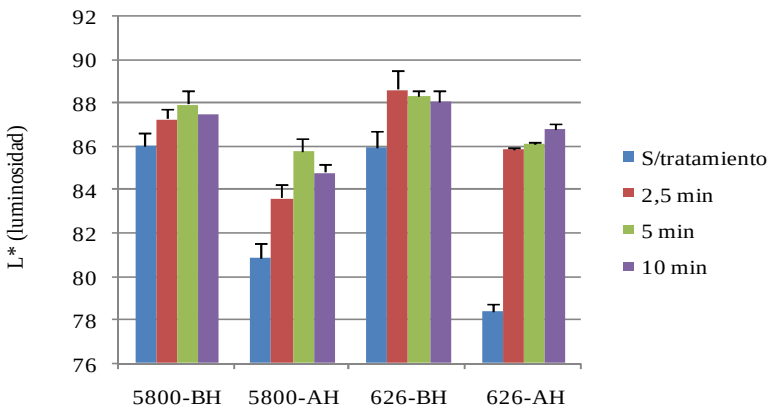


**Figura 3**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre el parámetro de luminosidad (reflectancia) de las harinas. S/tratamiento: muestra no calentada. 2,5 min, 5 min y 10 min: muestras tratadas térmicamente por 2,5; 5 y 10 min respectivamente. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

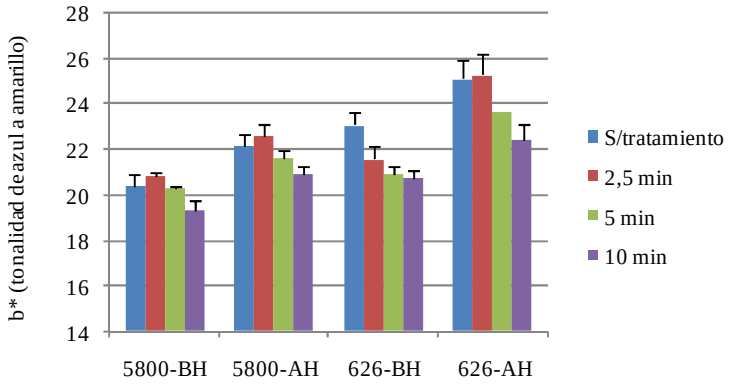


**Figura 4**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre el parámetro b (tonalidad de azul a amarillo) de las harinas. S/tratamiento: muestra no calentada. 2,5 min, 5 min y 10 min: muestras tratadas térmicamente por 2,5; 5 y 10 min respectivamente. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

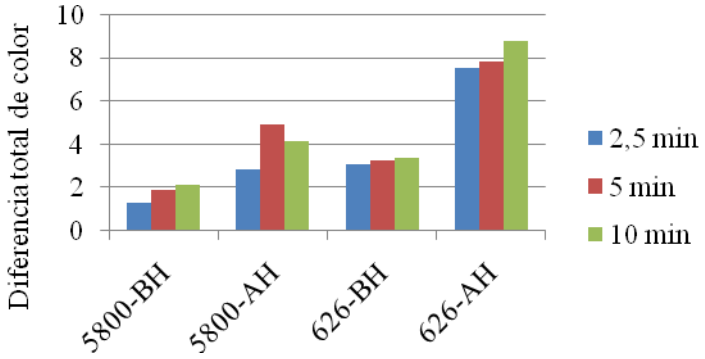


**Figura 5**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre la diferencia total de color (DTC) de las harinas. 2,5 min, 5 min y 10 min: muestras tratadas térmicamente por 2,5; 5 y 10 min respectivamente. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

Del mismo modo que se calculó la DTC entre las harinas de muestras que fueron tratadas térmicamente y las no procesadas (para cada contenido inicial de agua), se obtuvo la DTC entre harinas con alta y baja humedad no procesadas térmicamente. Se obtuvo un valor de DTC de 5,53 y 7,86 para la variedad DM 5800 y RA 626, respectivamente. Lo que confirma el efecto del contenido de agua de las harinas en la percepción del color.

Junto a la actividad ureásica, la solubilidad de las proteínas es también un parámetro importante en la caracterización de la calidad proteica. Durante el calentamiento de la soja se produce una pérdida de solubilidad de las proteínas relacionada con su agregación, como fue informado por Ribotta y otros (2004). Los cambios estructurales producidos como consecuencia de la agregación de las proteínas producen modificaciones negativas en las propiedades funcionales y nutricionales, por lo tanto el estricto control del proceso térmico es importante en la calidad final de los derivados de soja tratados térmicamente. La magnitud de la reducción de solubilidad depende del proceso de calentamiento, de la tecnología usada y las condiciones de diseño, es decir, la temperatura y el tiempo. La **Figura 6** muestra el efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre la solubilidad de proteínas. Se observó una disminución gradual de la solubilidad de las proteínas con el incremento del tiempo en el secador. En ambas variedades, un mayor contenido de humedad inicial se relacionó con una mayor pérdida de solubilidad de proteínas, alcanzando valores del 74 y 76 % para muestras con alto contenido de humedad y valores de 61 y 68 % para muestras con bajo contenido de humedad. Estos resultados muestran la misma tendencia que la velocidad de pérdida de agua descripta anteriormente, mientras mayor fue el contenido de humedad inicial de los porotos mayor fue el efecto sobre las proteínas, posiblemente relacionado con una mayor transferencia de calor desde el medio calefactor.

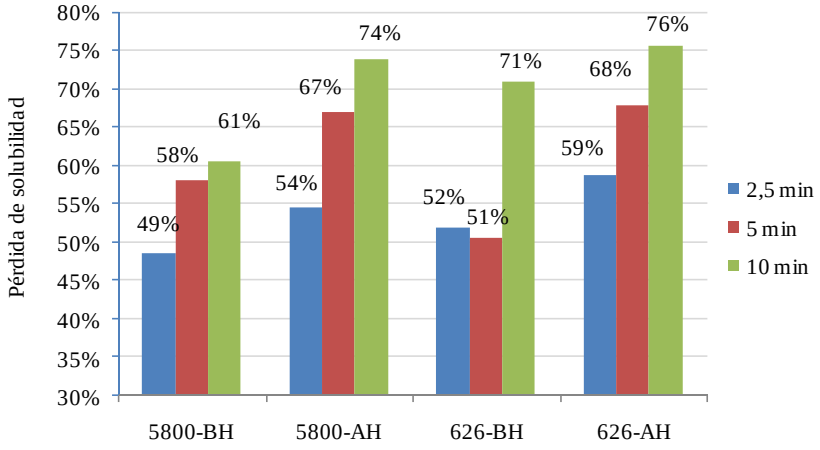


**Figura 6**. Efecto del tratamiento térmico del poroto de soja en el secador de lecho fluidizado sobre la pérdida de solubilidad de proteínas con respecto a la muestra no tratada. 5800-BH y 5800-AH: variedad DM 5800 con humedad inicial de 0,117 y 0,202 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente. 626-BH y 626-AH: variedad RA 626 con humedad inicial de 0,125 y 0,192 kg/kg (agua/sólidos secos), respectivamente.

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el tratamiento térmico por lecho fluidizado de porotos de soja con bajo y alto contenido de humedad permitió reducir simultáneamente los factores antinutritivos y la humedad inicial en un corto tiempo, en una sola operación y ejerciendo un estricto control de los parámetros de proceso.

El contenido inicial de humedad de los porotos afectó la inactivación de la ureasa, el color de las harinas y la solubilidad de proteínas en ambas variedades, mientras que la variedad de soja utilizada mostró tener poca influencia en las variables analizadas durante el proceso.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC (1995) Approved methods of the AACC. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, USA.

Araba M, Dale NM. 1990. Evaluation of protein solubility as an indicator of underprocessing of soybean meal. Poultry Science, 69: 1749-1752.

Batal AB, Douglas MW, Engram AE, Parsons CM. 2000. Protein dispersibility index as an indicator of adequately processed soybean meal. Poultry Science, 79: 1592-1596.

Ferreira S, Bruns R, Ferreira H, Matos G, David J, Brandao G, da Silva E, Portugal L, dos Reis P, Souza A, dos Santos W. 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. Analytica Chimica Acta, 597: 179-186.

InfoStat. 2002. InfoStat/Profesional, versión 1.1. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Kroh LW. 1994. Caramelisation in food and beverages. Food Chemistry, 51: 373-379.

Liener IE. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 34: 31-67.

MacDougall DB. 2002. Colour in food. Cambridge, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC..

Marsman GJP, Gruppen H, van Zuilichem DJ, Resink JW, Voragen AGJ. 1995. The influences of screw configuration on the in vitro digestibility and protein solubility of soybean and rapeseed meals. Journal of Food Engineering, 26: 13–28.

Martínez ML, Marin MA, Brondi MC, Leonardi VV, Ribotta PD. 2008. Optimization of processing parameters for fluidized bed drying of soybeans. CIGR - International Conference of Agricultural Engineering. XXXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola. LR ISSN 1982-3797.

McNaughton J M, Reece FN, Deaton JW. 1981. Relationships between color, trypsin inhibitor contents, urease index of soybean meal and effects on broiler performance. Poultry Science, 60: 393–400.

Osella CA, Gordo NA, Gonzalez RJ, Tosi E, Re´ E. 1997. Soybean heat-treated using a fluidized bed. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology, 30: 676–680.

Parsons CM, Hashimoto K, Wedekind KJ, Baker DH. 1991. Soybean protein solubility in potassium hydroxide: an in vitro test of in vivo protein quality. Journal of Animal Science, 69: 2918-2924.

Prachayawarakorna S, Prachayawasina P, Soponronnarit S. 2006. Heating process of soybean using hot-air and superheated-steam fluidized-bed dryers. LWT, 39: 770-778.

Soponronnarit S, Swasdisevi T, Wetchacama S, Wutiwiwatchai W. 2001. Fluidised bed drying of soybean. Journal of Stored Products Research, 37: 133-151.

Ribotta PD, Ausar S, Morcillo M, Pérez GT, Beltramo DM, León AE. 2004. Production of Gluten Free Bread Using Soybean Flour. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 1969-1974.

Rufian-Henares JA, Delgado-Andrade C, Morales FJ. 2009. Assessing the Maillard reaction development during the toasting process of common flours employed by the cereal products industry. Food Chemistry, 114: 93-99.

Wiriyaumpaiwong S, Soponronnarit S, Prachayawarakorn S. 2004. Comparative study of heating processes for full-fat soybeans. Journal of Food Engineering, 65: 371-382.

Zhu S, Riaz MN, Lusas EW. 1996. Effect of different extrusion temperature and moisture content on lipoxygenase inactivation and protein solubility in soybean. Journal of Agricultural Food Chemistry, 44: 3315-3318.

Waldroup P W, Ramsey BE, Helwig HM, Smith NK. 1985. Optimum processing for soybean meal used in broiler diets. Poultry Science, 64: 2314–2320.

# Efecto de la fracción de compuestos de bajo peso molecular de vino tinto sobre la actividad y estabilidad de una ß-D-glucosidasa

# Effect of the low molecular weight fraction of red wine on a β-D-glucosidase activity and stability

Cid AG (1,2), Ellenrieder G (1)

(1) INIQUI. CONICET-UNSa
(2) Facultad de Ingeniería. UNSa
Av. Bolivia 5150, Salta Capital, Argentina
agcid@unsa.edu.ar

## RESUMEN

En la intensificación de aromas de vinos por glicosidasas exógenas, los componentes de esta bebida reducen fuertemente la velocidad inicial de hidrólisis y la estabilidad de las enzimas. El objetivo de este trabajo fue evaluar si usando enzimas confinadas por membranas semipermeables se pueden reducir estos efectos adversos. Se aislaron por ultrafiltración los compuestos de vino Tannat con peso molecular (PM) menor a 10 kDa (fracción de PM < 10kDa) y se estudió su efecto sobre una ß-D-glucosidasa en la hidrólisis de p-nitrofenilglucósido (pNPG). Se determinó la velocidad inicial de hidrólisis en buffer, en una dilución de vino al 50% en buffer y en una dilución al 50% de la fracción de bajo PM y la actividad de la enzima incubada en estos tres medios 28 días a 20°C. La velocidad inicial de hidrólisis de pNPG fue (12±1) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ en presencia de vino y (34±2) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ en presencia de la fracción de bajo PM, mientras que en buffer fue (120±10) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$. La actividad se redujo a 9,8±3,7% a los 20 días de incubación en presencia de vino y a 34,8±4,7% a los 28 días de incubación en presencia de la fracción de PM < 10kDa. Se concluye que, si bien en la fracción de PM < 10kDa persisten sustancias inhibidoras, la enzima presenta menor inhibición y mayor estabilidad en esta fracción que en el vino. Por otra parte se comparó el proceso de hidrólisis de pNPG por la enzima agregada al vino con el producido por la misma cantidad de enzima confinada en membranas de diálisis de distinto volumen (entre el 1 y el 5% del volumen de vino), introducidas en el vino. Al confinar la enzima en la membrana de diálisis dentro del vino, se alcanzó el mismo grado de hidrólisis que agregándola directamente al vino, pero en mayor tiempo; la velocidad inicial fue (3,4±0,1) x $10^{-4}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ cuando la enzima se agregó al vino y (2,0±0,1) x $10^{-4}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ con la enzima agregada dentro del tubo de diálisis. Esta diferencia se puede deber a una limitación de la velocidad del proceso por la etapa de difusión a través de la membrana pues se observó que al incrementar el volumen en el que se confinó la enzima, y por lo tanto el área de intercambio, la velocidad aumentó hasta igualar el primer valor

## ABSTRACT

During wine aroma enhancement using exogenous glycosidases, the compounds present in this beverage strongly reduce initial rate of hydrolysis and enzymes stability. The aim of this work was to estimate if these adverse effects can be diminished using enzymes confined in semipermeable membranes. The compounds with a molecular weight (MW) less than 10 kDa were isolated by ultrafiltration of Tannat wine (fraction with MW < 10 kDa) and its effect on a ß-D-glucosidase in the hydrolysis of p-nitrophenylglucoside (pNPG) was studied. Initial rates in buffer, in a dilution of 50 % of wine in buffer and in a dilution of 50 % of the ultrafiltrated fraction were determined, as well as the enzyme activity incubated in this three media for 28 days at 20 °C. Initial rate of pNPG hydrolysis was (12±1) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ in presence of wine and (34±2) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ in presence of the fraction of low MW, whereas in buffer it was (120±10) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$. Activity decreased to 9.8±3.7% after 20 days of incubation in presence of wine and to 34.8±4.7 % after 28 days of incubation in presence of the fraction with MW < 10 kDa. It is concluded that, even inhibitory substances persist in the ultrafiltrate of MW < 10 kDa, the enzyme is more stable and less inhibited in this fraction than in wine. Besides, the hydrolysis process of pNPG by the enzyme added to wine and that produced by the same amount of catalyst added to wine in dialysis membranes of different

volumes (between 1 and 5 % of wine volume) were compared. When the enzyme was confined in the dialysis membrane inside wine, the same degree of hydrolysis was reached as when the enzyme was directly added to wine, but in longer period of time; initial rates were (3.4±0.1) x $10^{-4}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ for the enzyme added to the wine and (2.0±0.1) x $10^{-4}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ for the enzyme added inside the dialysis membrane. This difference can be due to the limitation of the rate of the process, produced by the diffusion stage through the membrane, since it was observed that increasing the volume where the enzyme was confined, and therefore the exchange area, the rate increased until it equaled the first value.

**PALABRAS CLAVE**: *ß-glucosidasa, aroma, inhibición, estabilidad.*

**KEYWORDS**: *ß-glucosidasa, flavor, inhibition, stability.*

## INTRODUCCIÓN

Los jugos de frutas y mostos para la producción de vinos contienen pequeñas cantidades de una amplia variedad de glicósidos (Günata *et al.* 1988), los que son parcialmente hidrolizados durante la fermentación alcohólica por las enzimas de levaduras, liberando agliconas (Arévalo Villena *et al.* 2007), que incluyen monoterpenos, que son responsables de los aromas varietales de los vinos (Mateo y Jiménez 2000). Los glicósidos más importantes que presentan esta característica de precursores de aromas son: α-L-arabino-β-D-glucósidos, α-L-ramno-β-D-glucósidos y β-D-apio-β-D-glucósidos. Las agliconas son principalmente monoterpenos, C13-norisoprenoides y derivados bencénicos (Williams *et al.* 1982, Günata *et al.* 1985, Fernández-Gonzáles y Di Stefano 2004, Sarry y Günata 2004). La mayoría de las enzimas que hidrolizan los diglicósidos actúan secuencialmente; en un primer paso, α-L-ramnosidasa, α-L-arabinosidasa o β-D-apiosidasa liberan el correspondiente azúcar y un glicósido que es luego hidrolizado por β-glucosidasa. Como la hidrólisis es parcial, una gran proporción de los glicósidos permanecen en los vinos y su aroma puede ser incrementado añadiendo enzimas exógenas (Günata *el al.* 1994). Con este propósito se han empleado glicosidasas de plantas, levaduras y hongos (Sánchez Palomo *et al.* 2005, Palmeri y Spagna 2007). Las enzimas de origen fúngico, en la mayoría de los casos producidas por *Aspergillus niger*, son a menudo utilizadas por su alta actividad, estabilidad, disponibilidad y bajo costo (Tamborra *et al.* 2004). Independientemente de la adición de glicosidasas exógenas para realzar el aroma, se usan en el procesamiento de vinos pectinasas fúngicas para mejorar los procesos de extracción y clarificación de los mostos. Como estas pectinasas también contienen glicosidasas como β-glucosidasa, α-arabinosidasa y generalmente menores niveles de α-ramnosidasa y β-apiosidasa, los compuestos aromáticos pueden ser liberados en esta etapa de la elaboración de vinos (Cabaroglu *et al.* 2003).

Se han estudiado los efectos de la adición de glicosidasas exógenas en la liberación de aromas y la simultánea hidrólisis de glicósidos en varios vinos (Baek y Cadwallader 1995, Genovés *et al.* 2005, Sánchez Palomo *et al.* 2005, Arévalo Villena *et al.* 2007). Los métodos empleados permiten medir el efecto de las enzimas añadidas sobre precursores de aromas específicos y su velocidad de acción en los vinos (Gueguen *et al.* 1996). Frecuentemente se usan p-nitrofenilglicósidos, sustratos cromogénicos no naturales, para caracterizar estas enzimas, para determinar su actividad en soluciones buffer bajo condiciones que simulan las condiciones que se encuentran en la elaboración de vinos y para evaluar la inhibición producida por etanol, glucosa y otros componentes, con el objetivo de predecir su comportamiento en la bebida, aun cuando el comportamiento de la enzima no sea exactamente el mismo que cuando se utilizan glicósidos naturales. Esto se debe a la accesibilidad y simplicidad de los métodos que utilizan p-nitrofenilglicósidos comparados con los que utilizan glicósidos naturales, que a menudo incluyen laboriosas etapas de extracción, identificación y cuantificación de glicósidos y agliconas. Además de las posibles diferencias con los sustratos naturales, los p-nitrofenilglicósidos también muestran limitaciones cuando sustancias coloreadas de los vinos interfieren en la usual determinación colorimétrica, especialmente en vinos tintos. Debido a esta interferencia existen pocos datos sobre la influencia de los componentes del vino en la actividad enzimática sobre los p-nitrofenilglicósidos. Se ha determinado en algunos casos la estabilidad de las enzimas en vinos blancos (Günata *et al.* 1997, Martino *et al.* 2000), pero no se ha encontrado este tipo de datos para vinos tintos.

Con un método desarrollado en nuestro laboratorio, que incluye la determinación mediante HPLC de p-nitrofenol, producto de hidrólisis de p-nitrofenilglicósidos, se pudo eliminar la interferencia producida por compuestos coloreados y así determinar el efecto, de distintos componentes del vino y del vino en sí, sobre glicosidasas en la hidrólisis de sustratos cromogénicos. También se evaluó la estabilidad de distintas glicosidasas en vinos blanco y tinto. Se observó que la inhibición producida por etanol, glucosa y gluconolactona es menor que la producida por el vino en sí. Se encontró que, entre las distintas glicosidasas estudiadas, β-glucosidasa presenta mayor inhibición y menor estabilidad en estas bebidas (Cid y Ellenrieder 2009). Es importante tener en cuenta este resultado, ya que como se mencionó, esta enzima es la que completa la hidrólisis y libera la aglicona aromática unida a la glucosa.

Este trabajo tuvo como objeto estudiar cómo se afecta la inhibición y la estabilidad de una β-glucosidasa por la fracción de compuestos con peso molecular menor a 10 kDa, obtenida de la ultrafiltración de vino tinto Tannat. También se evaluó el grado de hidrólisis de p-nitrofenilglucósido cuando la enzima se confina en una membrana de diálisis, para compararlo con el producido cuando la enzima se agrega directamente al vino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

El vino tinto Tannat (cosecha 2007) fue elaborado por la bodega El Esteco (Cafayate, Salta). β-glucosidasa Endozym Rouge fue obtenida de PASCAL BIOTECH (París). p-nitrofenilglucósido (pNPG) fue comprado a SIGMA (St. Louis, MO, número de catálogo N7006) y p-nitrofenol (pNP) a MERCK (Schuchardt, número de catálogo 820896). La membrana de diálisis utilizada fue de celulosa con un corte de 10 kDa, provista por SIGMA (número de catálogo D9777). El resto de los reactivos empleados fueron de grado analítico.

### Preparación de la fracción de vino tinto con PM menor a 10 kDa (fracción de PM < 10 kDa)

Se filtraron 300 ml de vino Tannat en una celda AMICON (W.R. Grace & Co., Beverly, MA) provista con una membrana PM10 (Pall Corporation, New York, número de catálogo OM010076). Se recuperó el ultrafiltrado para los estudios posteriores.

### Determinación de actividad de β-glucosidasa

La mezcla de reacción estuvo compuesta por pNPG 1,9 mM, en el correspondiente medio en estudio (buffer, vino o fracción ultrafiltrada) y enzima en cantidad que se indica en cada caso, más abajo. Se incubó a la temperatura señalada en cada experiencia y a distintos tiempos se tomaron alícuotas de 50 µl, las que se añadieron inmediatamente a 0,75 ml de acetonitrilo con el fin de detener la reacción. Estas muestras se analizaron mediante cromatografía HPLC para cuantificar pNP liberado (Cid y Ellenrieder 2009). Se trabajó con una columna C18, conectada a un detector UV/Vis a 316 nm. La fase móvil fue acetonitrilo/agua/ácido acético (32 : 67,5 : 0,5) a un caudal de 0,8 ml $min^{-1}$. La actividad, expresada como µmol $min^{-1}$, se calculó a partir de la pendiente de la curva de concentración de pNP liberado en función del tiempo de reacción. La concentración de pNP se obtuvo a partir de curvas de calibración construidas mediante la adición de pNP en distintas concentraciones a muestras de vino.

### Inhibición de actividad β-glucosidasa por vino y por la fracción de PM < 10 kDa

Se determinó la actividad de la enzima en buffer tartrato 60 mM pH 3,6 a 20 °C (que corresponden al pH del vino tinto y a la temperatura durante la elaboración de esta bebida) y se la comparó con la actividad al añadir al medio de reacción vino o la fracción de PM < 10 kDa, en una concentración del 50 %. Para esto se incubaron muestras del medio de reacción en estudio con pNPG 1,9 mM y 0,16 U $ml^{-1}$ de enzima; a distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas en las que se determinó pNP mediante el método descrito.

### Estabilidad de β-glucosidasa en el vino y en la fracción de PM < 10 kDa

Se agregó β-glucosidasa (0,16 U $ml^{-1}$) a 20 ml de vino y de la fracción ultrafiltrada. Estas muestras fueron incubadas a 20 °C; se tomaron alícuotas de 100 µl a distintos tiempos (días), las que se agregaron a una solución de pNPG 1,9 mM en buffer tartrato 60 mM pH 3,6 para determinar la actividad residual de la enzima a 50 °C. La actividad residual se midió a 50 °C, ya que la velocidad de hidrólisis es cerca de 10 veces mayor a esta temperatura que a 20 °C.

### Hidrólisis de pNPG con enzima libre y confinada en membranas de diálisis

Se agregaron 6,5 U de enzima directamente a 50 ml de vino con pNPG (1,9 mM). En paralelo se agregó a 50 ml de vino la misma cantidad de enzima en buffer tartrato 60 mM pH 3,6 confinada en una membrana de diálisis, cuyo volumen fue 0,5 ml. Se incubaron las muestras durante 17 días a 20 °C; a distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción (50 µl en 0,75 ml de acetonitrilo) en las que se determinó la concentración de pNP liberado mediante el método descrito. Para evaluar el efecto de la superficie de intercambio del tubo de diálisis sobre la velocidad de hidrólisis de pNPG al variar el volumen de solución enzimática se incubaron muestras de 50 ml de vino con 6,5 U de enzima en buffer tartrato 60 mM pH 3,6 confinada en membrana de diálisis con 0,5; 1,0; 1,5 y 2,5 ml (1, 2, 3 y 5 % del volumen de vino); estas muestras se incubaron a 20 °C y durante 3 días; a distintos intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción (50 µl en 0,75 ml de acetonitrilo) en las que se determinó la concentración de pNP liberado.

### Análisis estadístico

En todos los casos se realizaron las determinaciones por duplicado y los resultados se informan como el valor promedio. El análisis estadístico se llevo a cabo empleando el software PRISM de GraphPad (San Diego, CA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante el método desarrollado en nuestro laboratorio, que permite determinar la actividad de glicosidasas en medios coloreados como el vino tinto, se hizo posible estudiar el efecto de vino Tannat y una fracción con peso molecular menor a 10 kDa obtenida del mismo, sobre la actividad de una β-glucosidasa comercial.

Como se puede observar en la **Tabla 1**, en presencia de 50% de vino en el medio de reacción la velocidad inicial de hidrólisis de pNPG fue (12±1) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ y en presencia de 50% de la fracción de PM < 10 kDa la velocidad inicial fue (34±2) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$, mientras que en buffer fue (12±10) x $10^{-3}$ µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$. Es decir, la presencia de vino y de la fracción de PM < 10 kDa redujeron la velocidad a un 9,8±1,3 % y 28,5±1,8 %, respectivamente.

**Tabla 1.** Velocidad inicial de hidrólisis de pNPG por β-glucosidasa en buffer tartrato pH 3,6 y en presencia de 50% de vino Tannat o de 50% de la fracción de PM < 10 kDa.

| Medio | Velocidad inicial (µmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$) |
|---|---|
| Buffer tartrato pH 3,6 | (120±10) x $10^{-3}$ |
| Vino Tannat, 50 % | (12±1) x $10^{-3}$ |
| Fracción de PM < 10 kDa, 50 % | (34±2) x $10^{-3}$ |

En un estudio anterior (Cid y Ellenrieder 2009) se encontró que la inhibición producida por glucosa, etanol y gluconolactona fue menor que la inhibición que se produce por el vino en su conjunto. También se observó que la actividad de una β-glucosidasa sobre pNPG en vino Tannat fue 5,2 ± 0,3 % de la actividad en buffer bajo las mismas condiciones, mientras que la actividad fue 38,7 ± 0,3 % en presencia de una fracción de glicósidos extraída del mismo vino tinto. Esto sugiere que los mismos glicósidos actúan como inhibidores competitivos en la hidrólisis del sustrato sintético. En el vino existe una gran variedad de glicósidos, pero sólo una pequeña parte de ellos presenta la característica de ser precursor de aromas. Es posible que los mismos glicósidos que actúan como inhibidores en la hidrólisis de pNPG, inhiban la hidrólisis de los glicósidos naturales que se pretende hidrolizar para realzar el aroma de vinos.

Según el resultado obtenido en este trabajo, dentro de la fracción con PM menor a 10 kDa obtenida por ultrafiltración del vino persisten inhibidores de la enzima; en esta fracción se encuentran los glicósidos naturales del vino y eventualmente otros inhibidores, pero la inhibición es menor en esta fracción que en el vino, por lo que cabe suponer que si se utilizaran enzimas confinadas en membranas semipermeables para liberar los aromas se podría evitar parte de la inhibición.

En la **Figura 1** se muestra la estabilidad de β-glucosidasa cuando fue incubada en vino Tannat y en la fracción de PM < 10 kDa a 20 °C. Se observa que la actividad se redujo en vino Tannat a 9,8±3,7 % a los 20 días de incubación, mientras que en la fracción de PM < 10 kDa se redujo a 34,8±4,7 % a los 28

días. Este resultado lleva a suponer que la enzima confinada en membranas de diálisis puede ser más activa que si está en contacto con la totalidad de los componentes del vino.

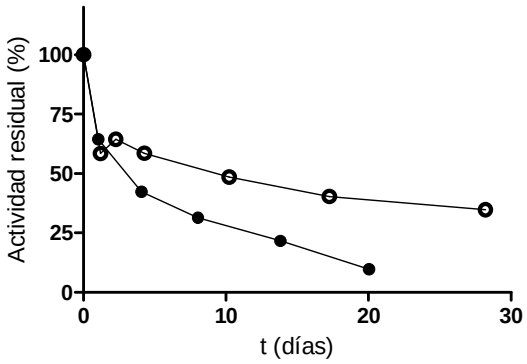


**Figura 1.** Estabilidad de β-glucosidasa a 20 °C, (●) en vino tinto Tannat y (○) en la fracción con PM < 10 kDa.

Con el fin de estudiar el efecto del confinamiento de la enzima sobre la velocidad de hidrólisis de pNPG, se agregó β-glucosidasa dentro de una membrana de diálisis a vino con pNP y se determinó el grado de hidrólisis del sustrato; se comparó el grado de hidrólisis con el producido cuando la misma cantidad de enzima se agregó directamente al vino. En la **Figura 2** se muestran los resultados de esta experiencia. Se puede observar que con los dos sistemas se alcanzó el mismo grado de hidrólisis de pNPG, si bien con la enzima dentro de la membrana este proceso fue más lento. La velocidad inicial de reacción fue (2,0±0,1) x $10^{-4}$ μmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ y (3,4±0,1) x $10^{-4}$ μmol $min^{-1}$ $ml^{-1}$ para la enzima confinada y sin confinar respectivamente. Esta diferencia se puede atribuir a que en el caso de la enzima confinada, tanto el sustrato como el producto de la reacción deben atravesar la membrana de diálisis y posiblemente la velocidad de difusión sea un factor limitante en la velocidad total de reacción.

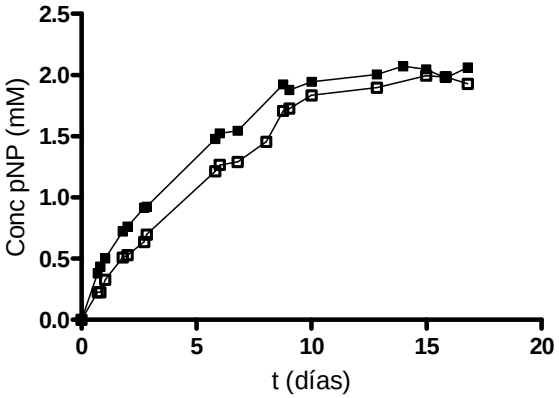


**Figura 2.** Hidrólisis de pNPG por una β-glucosidasa en vino, (■) cuando la enzima se agrega directamente y (□) cuando la enzima se encuentra confinada en membrana de diálisis.

Para evaluar si la velocidad de difusión controla la reacción, se aumentó el área de transferencia indirectamente, modificando el volumen del tubo de diálisis en el que la enzima se agregó al vino, desde un 1 % hasta un 5 % del volumen de vino a tratar, manteniendo constante la cantidad de enzima empleada. Como se puede observar en la **Tabla 2**, al aumentar el área de transferencia se alcanzó la misma velocidad inicial de hidrólisis que cuando la enzima se agrega directamente al vino, lo que confirma que la velocidad de difusión de sustrato y de producto controlan la velocidad total de la reacción.

Teniendo en cuenta estos resultados, se efectúan actualmente estudios tendientes a determinar si el uso de otros tipos de membrana que presenten mayor superficie de contacto y por ende menos problemas

de difusión, puede efectivamente llegar a producir una hidrólisis más rápida de los precursores de aromas y mejorar la estabilidad de la enzima en el proceso.

**Tabla 2.** Velocidad inicial de hidrólisis de pNPG por β-glucosidasa agregada al vino directamente o dentro de membranas con diferente volumen.

| Modo de agregado de enzima | Velocidad inicial ($\mu mol\ min^{-1}\ ml^{-1}$) |
|---|---|
| Enzima agregada directamente al vino | $(3,4 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |
| Enzima confinada en membranas de diálisis (1%)[a] | $(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |
| Enzima confinada en membranas de diálisis (2%)[a] | $(3,1 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ |
| Enzima confinada en membranas de diálisis (3%)[a] | $(3,2 \pm 0,2) \times 10^{-4}$ |
| Enzima confinada en membranas de diálisis (5%)[a] | $(3,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$ |

[a] Volumen de solución de enzima en la membrana expresado como % del volumen de vino

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la β-glucosidasa estudiada presentó menor inhibición y mayor estabilidad en una fracción de compuestos de peso molecular menor a 10 kDa de vino Tannat que en el vino mismo. Si bien en esta fracción persistieron sustancias inhibidoras, mediante el proceso de ultrafiltración se lograron retirar algunos de los compuestos que inhiben e inactivan la enzima.
Al confinar la enzima en una membrana de diálisis para luego agregarla al vino, se alcanzó el mismo grado de hidrólisis que cuando la enzima se añadió directamente y la misma velocidad inicial de hidrólisis cuando se aumentó el volumen en el que la enzima fue confinada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Arévalo Villena M, Úbeda Iranzo JF, Briones Pérez AI. 2007. β-Glucosidase activity in wine yeasts: Application in enology. Enzyme and Microbial Technology, 40 (3): 420-425.

Baek HH, Cadwallader KR. 1999. Contribution of free and glycosidically bound volatile compounds to the aroma of Muscadine grape juice. Journal of Food Science, 64 (3): 441-444.

Cabaroglu T, Selli S, Canbas A, Lepoutre JP, Günata ZY. 2003. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. Enzyme and Microbial Technology, 33: 581-587.

Cid AG, Ellenrieder G. 2009. Inhibition and inactivation evaluation of exogenous glycosidases in wines using *p*-nitrophenylglycosides. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 1053-1059.

Fernández-González M, Di Stefano R. 2004. Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by Saccharomyces cerevisiae. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 37 (4): 467-473.

Genovés S, Gil JV, Valles S, Casas JA, Manzanares P. 2005. Assessment of the aromatic potential of Palomino Fino grape must using glycosidases. American Journal of Enology and Viticulture, 56 (2): 188-191.

Gueguen Y, Chemardin P, Janbon G, Arnaud A, Galzy P. 1996. A very efficient β-glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (8): 2336-2340.

Günata ZY, Bayonove CL, Baumes RL, Cordonnier R. 1985 The aroma of grapes. I Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. Journal of Chromatography, 331: 83-90.

Günata ZY, Bitteur S, Brillouet J M, Bayonove CL, Cordonnier R. 1988. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. Carbohydrate Research, 184: 139-149.

Günata ZY, Vallier MJ, Sapis JC, Baumes R, Bayonove CL. 1994. Role of enzymes in the use of flavour potential from grapes glycosides in winemaking. En: Schreier P, Winterhalter P, editors. Progress in Flavour Precursors Studies. Carol Stream, IL: Allured Publishing. pag 219-245.

Günata ZY, Dugelay I, Vallier MJ, Sapis JC, Bayonove CL. 1997. Multiple forms of glycosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*: Partial characterization of a β-apiosidase. Enzyme and Microbial Technology, 21: 39–44.

Martino A, Schiraldi C, Di Lazzaro A, Fiume I, Spagna G, Pifferi PG, De Rosa M. 2000. Improvement of the flavour of Falanghina white wine using a purified glycosidase preparation from *Aspergillus niger*. Process Biochemistry, 36 (1-2): 93-102.

Mateo JJ, Jiménez M. 2000. Monoterpenes in grape juice and wines (Review). Journal of Chromatography, 881 (1-2): 557-567.

Palmeri R, Spagna G. 2007. Minireview: β-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. Enzyme and Microbial Technology, 40: 382-389.

Sánchez Palomo E, Díaz-Maroto MC, Gonzáles-Viñas MA, Pérez-Coello MS. 2005 Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. Food Chemistry, 92 (4): 627-635.

Sarry JE, Günata ZY. 2004. Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors. Food Chemistry, 87: 509-521.

Tamborra P, Martino N, Esti M. 2004. Laboratory tests on glycosidase preparations in wine. Analytica Chimica Acta, 513 (1): 299-303.

Williams PJ, Strauss CR, Wilson B. 1982. Use of C18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and nor-isoprenoid precursors from grape juice and wines. Journal of Chromatography, 235: 471-480.

# Productos enriquecidos en fibra obtenidos a partir de Cydonia oblonga Miller. Efecto de los tratamientos sobre las propiedades físico-mecánicas

# Dietary fiber enriched products from Cydonia oblonga Miller. Effect of treatments on the physical-mechanical properties

de Escalada Pla MF (1,2), Rojas AM (1,2), Gerschenson LN (1,2)

(1) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Industrias. Intendente Güiraldes 2620, Ciudad Universitaria, (1428) Capital Federal, Argentina.
(2) CONICET.
marina@di.fcen.uba.ar

## RESUMEN

El membrillo (*Cydonia oblonga* Miller) es un fruto que se destina a la elaboración de jaleas y dulces. Durante el proceso, se separa la pulpa, siendo el remanente descartado o utilizado para la alimentación animal. El objetivo del trabajo fue aprovechar este subproducto, evaluando tres tratamientos diferentes para la obtención de productos enriquecidos en fibra dietaria y estudiar las propiedades de los productos obtenidos. Las alternativas de proceso elegidas fueron: i) Lavado con agua y secado a 35 ºC (producto MA), ii) tratamiento con etanol a ebullición y secado a 35 ºC (ME), iii) secado a 80 ºC (M). En todos los casos, los productos fueron molidos. Se obtuvieron polvos ricos en fibra de baja actividad acuosa y, por lo tanto, estables y de granulometría adecuada para la futura aplicación como ingredientes de alimentos funcionales. La densidad aparente de ($\rho_a$) de ME resultó leve pero significativamente ($p<0,01$) menor que la de M mientras que no se observaron diferencias respecto a MA. La densidad real ($\rho_t$) es la densidad del material excluyendo el aire y es función del contenido de agua y del tipo de sólido. Las densidades reales de las tres fracciones fueron significativamente diferentes ($p<0,001$), siendo mayores los valores para M y menores los obtenidos para ME. La distribución del tamaño de partícula fue determinada a través de difracción láser. Los parámetros de diámetros equivalentes como el diámetro másico medio ($d_{0,5}$) y el de Sauter, mostraron valores significativamente mayores ($p<0,001$) para la fracción ME. Si bien se utilizó el mismo proceso de molienda en los tres casos, la fracción ME presentó una respuesta distinta dando origen a partículas de mayor tamaño. También pudo observarse, para las tres fracciones, que el $d_{0,5}$ aumentaba 1,28 a 1,37 veces cuando las partículas eran hidratadas. Los ensayos mecánicos de compresión y de relajación mostraron que ME presentó la compresibilidad más baja ($p<0,001$) evidenciando así, la capacidad de esta fracción a ser deformada con el menor cambio en la densidad global respecto a M y a MA; ello indica un comportamiento más sólido de la fracción ME. Se pudo concluir que el pre-tratamiento con etanol produciría una fracción (ME) más sólida, que ofrecería mayor resistencia a la molienda, determinando la obtención de un mayor tamaño medio de partículas, con menor densidad real de la matriz. Las diferentes propiedades físicas y mecánicas observadas afectarían la funcionalidad en el tracto digestivo de estos productos ricos en fibra.

## ABSTRACT

Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit is used to make jam, marmalade and jelly. During the process, quince pulp is separated, and the remaining is discarded or used as animal feed. The aim of this work was to take profit of this by-product, evaluating three different treatments to obtain products enriched in dietary fibre and to study their properties. The processes chosen were: i) washing step with water followed by drying at 35 ºC (MA product), ii) treatment with boiling ethanol followed by drying at 35 ºC (ME product) and iii) drying at 80 ºC (M product). Fractions obtained were milled rendering enriched fibre products that were stable due to its low water activity and had an adequate particle size for further use as functional food ingredients. Apparent density ($\rho_a$) of ME was slight but significantly ($p<0,01$) lower than that of M while no differences were observed with respect to MA. True density ($\rho_t$) is the solid material density excluding air and is a function of the water content and solid characteristics. True densities of the three fractions were significant different ($p<0,001$), being higher

for M and lower for ME. Particle size distribution was determined through light scattering. Median mass diameter ($d_{0,5}$) and Sauter parameter, showed significant highest values ($p<0,001$) for ME fraction. Although the same grinding process was applied for all samples, ME fraction showed a different behavior rendering particles with higher size. It could be also observed, for the three fractions, that $d_{0,5}$ increased 1,28 to 1,37 times when particles were hydrated. Mechanical assays of compression and relaxation showed that ME presented the lowest compressibility ($p<0,001$) making evident the capacity of this fraction to be deformed with the lowest change on density when compared with M and MA. This trend indicates a more solid behavior of ME fraction. It could be concluded that pre-treatment with boiling ethanol seemed to produce a more solid fraction (ME), which could offer greater resistance to grinding, rendering particles of higher average size, with lower matrix true density. Different physical and mechanical properties observed might influence the functionality of this fibre enriched products in the gut.

**PALABRAS CLAVE**: *membrillo, fibra dietaria, propiedades físico-mecánicas.*

**KEYWORDS**: *quince, dietary fibre, physical-mechanical properties.*

## INTRODUCCIÓN

La ingesta recomendada de fibra dietaria es de 25 a 30 g/día. En los países latinoamericanos, el valor promedio ingerido está en el orden de 15 g/día y en las ciudades de mayor crecimiento, la ingesta llega a estar por debajo de los 10 g/día (Cardona Velásquez 2004). Se recomienda el agregado de fibra dietaria a los alimentos para compensar la deficiencia existente en la dieta. Por otro lado, los residuos del procesamiento de frutihortícolas representan un serio problema de efluentes para el sector (Schieber et al. 2001) y su transformación en productos de valor agregado como son las fibras, puede contribuir a disminuir el problema y a recuperar biomasa y nutrientes de valor (Gerschenson et al. 2009). Las fibras de diferentes fuentes pueden tener distintos efectos metabólicos y fisiológicos. Más aún, las fibras provenientes de una misma fuente pero sometidas a distintos procesamientos pueden presentar distinto comportamiento. Se ha reportado, ampliamente, en bibliografía la correlación que tienen las propiedades físicas, mecánicas y químicas de las fibras con la funcionalidad que ellas tienen durante el pasaje por el tracto digestivo (Guillon et al. 1998, Guillon y Champ 2000, Robertson et al. 2000, Chau et al. 2004, Raghavendra et al. 2004, de Escalada Pla et al. 2007).

Los frutos del membrillo (**Cydonia oblonga** Miller) son demasiado duros, astringentes y ácidos para comerlos frescos. Se los utiliza para fabricar dulces, jaleas y mermeladas. Esta industrialización da lugar a residuos (i.e.: cáscara, semillas) que son descartados o utilizados como alimento de animales de granja. El objetivo del trabajo fue aprovechar este subproducto, evaluando tres tratamientos diferentes para la obtención de productos enriquecidos en fibra dietaria y estudiar las propiedades físicas y mecánicas de los productos obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de las distintas fracciones de fibra

Como materia prima se utilizó el producto remanente de la industrialización de pulpa de membrillo *(Cydonia Oblonga)*. El mismo provenía de una planta industrial localizada en General Alvear, Provincia de Mendoza.

La materia prima fue sometida a tres tratamientos diferentes, obteniendo así las distintas fracciones:

- Fracción ME: Cien gramos de muestra se mezclaron con 350 ml de etanol-95 % (v/v) a ebullición durante 30 min, bajo agitación constante.
- Fracción MA: Cien gramos de muestra se mezclaron con 350 ml de agua destilada a 35 ºC, durante 30 min, bajo agitación constante.

Tanto ME como MA fueron deshidratadas bajo convección forzada de aire a 30 ºC durante 24 h, tras eliminar la mayor parte de los líquidos del lavado mediante filtración.

- Fracción M: Una parte de la materia prima fue sometida a un secado directo, sin lavados previos, a 80 ºC, en convección forzada de aire durante 4 h.

Luego, las fracciones ME, MA y M se molieron y se tamizaron (tamiz ASTM USA, malla 40).

## Métodos

**Densidad aparente ($\rho_a$) y densidad real ($\rho_t$)**

La densidad aparente se determinó midiendo en una probeta graduada, el volumen de la muestra pesada (5,0000 g), golpeando suavemente el fondo de la probeta hasta alcanzar un nivel constante. La determinación se realizó seis veces para cada fracción.

La densidad real se midió con un picnómetro de Helio (Accupyc 1330, Micrometrics, Gosford, New South Wales, Australia). Se reporta el valor promedio de diez determinaciones.

**Tamaño de partícula**

Se determinó a partir de la distribución evaluada por difracción de un haz láser (Mastersizer 2000E ver. 5.20, Malvern, Worcestershire, UK). Se suspendió la muestra en etanol 96 %(v/v) de acuerdo con Guillon et al., 1998.

Otra evaluación se realizó suspendiendo la muestra en agua deionizada para medir el tamaño de partícula de la muestra hidratada.

Las determinaciones se realizaron por sextuplicado.

**Propiedades mecánicas**

Se colocó cada fracción de fibra dentro de una celda especialmente diseñada (Moreyra y Peleg 1980, Ofman et al. 2004) con una tapa plana plástica. El polvo fue comprimido a través de esta tapa utilizando un texturómetro Instron (Modelo 3345, Instron Corp, Canton MA, USA) con una velocidad de cabezal de 5 mm/min hasta una fuerza de 40 N. En esa posición se detuvo el cabezal dejando que la muestra relaje su estrés. La compresibilidad se evaluó convirtiendo la deformación sufrida por la fibra a variación de densidad y graficando esta última en función del esfuerzo de compresión, de acuerdo a la ecuación:

$$\rho = a + b \log \sigma \qquad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde: $\rho$ es la densidad y $\sigma$ es el esfuerzo de compresión; *b* representa la compresibilidad del polvo de fibra.

Para la curva de la relajación, los datos fueron normalizados y linealizados de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\frac{F_0 \cdot t}{F_0 - F(t)} = k_1 + k_2 \cdot t$$

Donde $F_0$ es la fuerza inicial y F(t) es la fuerza luego de transcurrido un tiempo t de relajación; $k_1$ y $k_2$ son constantes.

Los ensayos mecánicos se realizaron por quintuplicado.

**Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de un análisis de la varianza-ANOVA (nivel de confianza, $\alpha$: 0,05) seguido por un test de Tukey de comparaciones múltiples con el objetivo de evaluar diferencias significativas (Sokal y Rohlf 1980). Las regresiones lineales y no-lineales así como los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa Statgraphic Plus package (V. 5.1, 1997-2001, Rockville MD, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades físicas de las tres fracciones (M, MA y ME) se resumen en la **Tabla 1**. La densidad aparente ($\rho_a$) de ME fue leve pero significativamente ($p < 0,01$) menor que la de la fracción M mientras que no se observaron diferencias respecto a MA. La densidad real ($\rho_t$) es la densidad del material sólido, excluyendo el aire de los poros. Los valores obtenidos para las tres muestras fueron significativamente diferentes ($p<0,001$): el valor más alto correspondió al producto M, mientras que ME presentó el valor más bajo. La densidad real es una función del contenido de humedad y la naturaleza del sólido, no siendo afectada por el método de secado (Krokida y Maroulis 2001, Koç et al. 2008). La densidad aparente es función del contenido de agua, de las características del sólido y de la proporción de volumen de aire siendo afectada por el método se secado y colapso de la matriz (Koç et al. 2008). En el presente trabajo, la densidad real de M resultó un 63 % mayor que la de ME, mientras que la densidad aparente de M fue ≈ 26 % mayor que la de ME. La fracción M fue secada a 80 ºC y sin lavado previo o pretratamiento con solventes y mostró los valores más altos en cada una de las densidades evaluadas. Por otro lado, MA y ME fueron secadas a baja temperatura (35 ºC) durante

24 h y no se observaron diferencias significativas en la densidad aparente. Pero la densidad real de ME resultó significativamente menor a la de MA, probablemente debido a diferencias estructurales entre las dos fracciones.

**Tabla 1.** Propiedades físicas de productos enriquecidos en fibra obtenidos a partir de subproductos de membrillo, por secado a 80 ºC durante 4 h (M); con lavado con agua (MA) o extracción etanólica (ME) antes de secado a 35 ºC durante 24 h.

| | **M** | **MA** | **ME** |
|---|---|---|---|
| Densidad aparente; $\rho_a$ (g/cm$^3$)[1] | 0.558 ± 0.007$^{a}$ | 0.51 ± 0.05$^{a,b}$ | 0.45 ± 0.02$^{b**}$ |
| Densidad real, $\rho_t$ (g/cm$^3$)[2] | 17.10 ± 0.3$^{a}$ | 13.85 ± 0.05$^{b***}$ | 10.45 ± 0.02$^{c***}$ |
| $d_{(0.5)}$ (μm)[3] (etanol como vehículo) | 181.2 ± 0.3$^{a}$ | 179 ± 1$^{a}$ | 206 ± 5$^{b***}$ |
| Sauter (μm)[3] (etanol como vehículo) | 67 ± 3$^{a}$ | 64.1 ± 0.1$^{a}$ | 84 ± 4$^{b***}$ |
| $d_{(0.5)}$ (μm)[3] partículas hidratadas | 248 ± 2$^{a}$ | 230 ± 6$^{b}$ | 274 ± 3$^{c**}$ |
| Sauter (μm)[3] partículas hidratadas | 69.2 ± 0.6$^{a}$ | 66 ± 3$^{a}$ | 93 ± 2$^{b**}$ |
| Relación ($d_{(0.5)Hidratada}$/ $d_{(0.5)en\ etanol}$) | 1.37 ± 0.01$^{a}$ | 1.28 ± 0.04$^{a}$ | 1.33 ± 0.05$^{a}$ |

[1] Se informan promedios y desvíos estándar ($n$ = 6).
[2] Se informan promedios y desvíos estándar ($n$ = 10).
[3] Diámetros másicos medios y de Sauter. Se informan promedios y desvíos estándar ($n$ = 6).
Diferentes letras en la misma fila indica diferencias significativas ($p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$).

De la distribución de tamaño de partícula determinada a través de difracción láser se determinó el diámetro medio másico ($d_{0,5}$) el cual corresponde al diámetro equivalente de las partículas cuando la distribución acumulada es del 50 %. Mientras que el valor Sauter corresponde al diámetro equivalente de una esfera compacta y no porosa que tenga la misma superficie ponderada media que las partículas del polvo (Melçion 2000). Las partículas de ME presentaron los valores más altos de diámetros tanto para las muestras suspendidas en etanol como para las medidas luego del hinchamiento debido a la hidratación en agua deionizada, mientras que la fracción MA mostró los menores valores para las partículas hidratadas (**Tabla 1**). Cuando se calculó la relación entre el diámetro incrementado luego del hinchamiento con agua respecto al diámetro de la fibra (incremento: 28-37 %), no se observaron diferencias entre las distintas fracciones. Si bien el mismo proceso de molienda se llevó a cabo para los tres casos, la fracción ME presentó una respuesta distinta dando partículas de mayor tamaño, lo cual podría explicar, al menos en parte, los menores valores de densidad aparente. Auffret y otros (1994), remarcaron la importancia de la naturaleza y las propiedades físicas de la fibra al considerar la eficiencia de la molienda. Ellos encontraron que la fibra de remolacha y de cítricos eran materiales más frágiles y ofrecían menos resistencia al corte que otros más rígidos como el salvado de trigo y la cubierta de ciertas leguminosas. En aquel caso, los autores relacionaban la presencia de pared celular secundaria de las vainas de las leguminosas, ricas en celulosa, con la rigidez y la resistencia a la molienda.

Probablemente, no sólo la composición química sino también la microestructura de la matriz de la fibra podrían afectar la resistencia de los materiales a la molienda. En este sentido, se estudiaron las propiedades mecánicas de los polvos de las fracciones enriquecidas en fibra (M, MA y ME) a fin de una mejor comprensión. Las propiedades de los alimentos particulados (ej. densidad, compresibilidad) tienen un importante papel en muchos procesos, operaciones de manipulación y almacenamiento (Moreyra y Peleg 1980). Se puede observar en la **Figura 1**, los perfiles que presentaron las diferentes muestras durante la compresión hasta una respuesta de 40 N y, luego, los perfiles de relajación una vez detenido el cabezal. En la **Tabla 2** se informa el valor de compresibilidad que surge del ajuste con la ecuación 1, de los datos mostrados en el perfil. La fracción ME presentó la menor compresibilidad ($p<0,01$) o tendencia al colapso bajo el pequeño stress aplicado durante el ensayo mostrando así, la menor capacidad de esta fibra a ser deformada con respecto a M y a MA indicando un comportamiento más "sólido". De la pendiente $k_2$ del ensayo de relajación se puede concluir que ME y MA presentaron el mismo comportamiento sólido luego de ser compactadas, siendo el $k_2$ de ambas fracciones significativamente mayor que el de M. El pretratamiento con etanol, podría producir una

fracción más sólida (ME) que ofrezca mayor resistencia a la molienda y, entonces, produzca partículas con un tamaño medio mayor. Mort y otros (1991) indicaron que la extracción de material de pared celular con etanol a ebullición podría producir algún grado de agregación macromolecular.

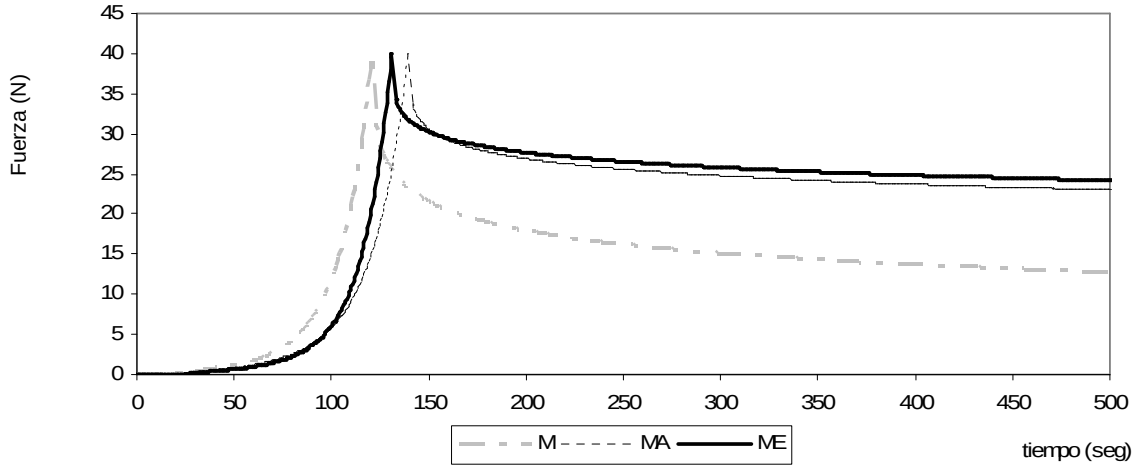


**Figura 1**. Curvas de compresión hasta 40N y posterior relajación de los polvos enriquecidos en fibra dietaria de membrillo.

**Tabla 2.** Parámetros mecánicos calculados a partir del ajuste de los valores de las curvas de compresión-relajación de productos enriquecidos en fibra del membrillo, los cuales fueron obtenidos por secado a 80 ºC durante 4 h (M); con lavado con agua (MA) o extracción etanólica (ME) antes de secado a 35 ºC durante 24 h.

| | **M** | **MA** | **ME** |
|---|---|---|---|
| Compresibilidad[1,2] | $0.088 \pm 0.003^{a}$ | $0.086 \pm 0.005^{a}$ | $0.061 \pm 0.003^{b***}$ |
| $k_2$ [1,3] | $1.35 \pm 0.05^{a***}$ | $2.4 \pm 0.1^{b}$ | $2.26 \pm 0.04^{b}$ |

[1] Se muestran promedios y desvíos estándar (n = 5). Letras diferentes indican diferencias significativas (***$p < 0.001$).

[2] Pendiente de la ecuación $\rho = a + b \log \sigma$; $\rho$: g/cm$^3$; $\sigma$: kgf/cm$^2$ (Moreyra y Peleg, 1980).

[3] Pendiente de la curva de relajación normalizada.

## CONCLUSIÓN

Los residuos de la industrialización del fruto de membrillo (*Cydonia oblonga* Miller) fueron aprovechados para la obtención de productos en polvo enriquecidos en fibra dietaria. Se utilizaron tres tratamientos distintos aplicando distintas condiciones de secado con y sin lavado o extracción previa. En todos los casos, se obtuvieron polvos estables y de granulometría adecuada. Además, todos ellos presentaron buena capacidad de absorción de agua, mostrando tamaños medios de partículas hidratadas mayores al de las partículas sin hidratar evidenciando de esta manera la buena funcionalidad de esta fibra. El tratamiento con etanol a ebullición y posterior deshidratación a baja temperatura, dio el material más sólido y, por lo tanto, de mayor tamaño y menor densidad; presentó un mayor tamaño de partícula hidratada. Tomando en cuenta todos estos resultados, se puede concluir que es posible producir productos enriquecidos en fibra con adecuadas propiedades funcionales basados en la modificación de las características microestructurales de nuevas fuentes de fibra dietaria. Esto constituye una manera interesante de aprovechar los residuos generados durante el procesamiento industrial de frutihortícolas, agregando valor a las materias primas y reduciendo, además, el impacto ambiental.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Auffret A, Ralet MC, Guillon F, Barry JL, Thibault JF. 1994. Effect of grinding and experimental conditions on the measurement of hydration properties of dietary fibres. LWT - Food Science and Technology, 27: 166-172.

Cardona Velásquez. 2004. La nueva tendencia en nutrición. Enfásis Alimentación, 4:86-90.

Chau Chi F, Wang Yi T, Wen Yu L. 2004. Comparison of the characteristics, functional properties, and in vitro hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. LWT - Food Science and Technology, 37: 155-160.

Chau Chi F, Wang Yi T, Wen Yu L. 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. Food Chemistry, 100: 1402-1408.

de Escalada Pla MF, Ponce NM, Stortz CA, Gerschenson LN, Rojas AM. 2007. Composition and functional properties of enriched fiber products obtained from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret). LWT - Food Science and Technology, 40: 1176-1185.

FDA. Department of Health and Human Services. 1993. Health Claims: fruits and vegetables and cancer . En: FDA, Code of Federal Regulations (vol. 2), Title 21. Chapter I. Subchapter B. Part 101. Subpart E. Section 101.78. Rockville, MD: GPO.

Gerschenson LN, Rojas AML, de Escalada Pla M, Fissore E. 2009. Functional properties of dietary fibre isolated from *Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret through different extraction procedures. En: Govil JN, Singh VK editors. Recent Progress in Medicinal Plants. Volume 24 Standardization of herbal/ayurvedic formulations. Texas: Studium Press LLC. pag. 359-370.

Grigelmo-Miguel N, Martin-Belloso O. 1999. Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. LWT - Food Science and Technology, 32: 503-508.

Guillon F, Champ M. 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. Food Research International, 33: 233-245.

Guillon F, Auffret A, Robertson JA, Thibault JF, Barry JL. 1998. Relationships between physical characteristics of sugar-beet fibre and its fermentability by human faecal flora. Carbohydrate Polymers, 37: 185-197.

Koç B, Eren İ, Kaymak Ertekin F. 2008. Modelling bulk density, porosity and shrinkage of quince during drying: The effect of drying method. Journal of Food Engineering, 85: 340-349.

Krokida MK, Maroulis ZB. 2001. Structural properties of dehydrated products during rehydration. International Journal of Food Science and Technology, 36: 529-538.

Melçion JP. 2000. La granulométrie de l'aliment: principe, mesure et obtention. INRA Prod. Anim., 13, (2): 81-97.

Moreyra R, Peleg M. 1980. Compressive deformation patterns of selected food powders. Journal of Food Science, 45: 864-868.

Mort AJ, Moerschbacher BM, Pierce ML, Maness NO. 1991. Problems encountered during the extraction, purification, and chromatography of pectic fragments, and some solutions to them. Carbohydrate Research, 215: 219-227.

Ofman MH, Campos CA, Gerschenson LN. 2004. Effect of preservatives on the functional properties of tapioca starch: analysis of interactions. LWT - Food Science and Technology, 37: 355-361.

Renard CMGC. 2005. Variability in cell wall preparations: quantification and comparison of common methods. Carbohydrate Polymers, 60: 515-522.

Renard CMGC, Baron A, Guyot S, Drilleau J-F. 2001. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. Int J Biol. Macromol. 29: 115–125.

Rhagavendra SN, Rastogi NK, Raghavarao KSM-S, Tharanathan RN. 2004. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. European Food Research and Technology, 218: 563-567.

Rieger M. 2006. Quince - Cydonia oblonga Mill. http://www.uga.edu/fruit/quince.html. Accedido: Marzo 11, 2009.

Robertson JA. 1988. Physicochemical characteristics of food and the digestion of starch and dietary fibre during gut transit. Proceedings of the Nutrition Society, 47: 143-152.

Robertson JA, de Monredon FD, Dysseler P, Guillon F, Amadò R, Thibault JF. 2000. Hydration properties of dietary fibre and resistant starch: a European collaborative study. LWT - Food Science and Technology, 33: 72-79.

Rumpunen K, Thomas M, Badilas N, Thibault JF. 2002. Validation of a combined enzymatic and HPLC method for screening of pectins in fruit of japanese quince (Chaenomeles japonica). LWT – Food Science and Technology, 35: 490-496.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. Trends in Food Science and Technology, 12: 401-413.

Sokal R, Rohlf FJ. 1980. Biometry. San Francisco, WH Freeman and Company.

# Diseño de un alimento funcional y apto para fenilcetonúricos con caseinoglicomacropéptido

# Design of a functional food suitable for individuals with phenylketonuria with casein glycomacropeptide

Farías ME (1)(2), Pilosof AMR (2)

(1) Departamento de Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Rutas 5 y 7, Luján (6700), Bs. As., Argentina.
(2) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
e-mail: efarias@mail.unlu.edu.ar

## RESUMEN

El caseinoglicomacropéptido (GMP) es un péptido bioactivo de 64 aminoácidos liberado en la ruptura enzimática específica de la k-caseína durante la elaboración del queso. No contiene aminoácidos aromáticos por ello se considera un ingrediente útil para pacientes fenilcetonúricos. Tiene numerosas actividades biológicas, entre ellas: antihipertensivo, antitrombótico, promotor del crecimiento de bifidobacterias, inhibidor de la toxina del cólera. El GMP, además es considerado como regulador de la saciedad, aunque no se ha podido comprobar este efecto en humanos. En los últimos años, las investigaciones se centraron en el aislamiento del GMP a escala industrial y existen muy pocas referencias en los que se lo evalúe como ingrediente funcional. El objetivo de este trabajo fue diseñar, a partir del estudio de las propiedades gelificantes del GMP, un producto apto para pacientes fenilcetonúricos. Para ello, se estudió la gelificación de un concentrado de GMP de origen comercial a temperaturas entre 25 ºC en el rango de pH entre 2,0 y 4,0 y concentraciones entre 5 y 20 % p/p. El ajuste de pH se realizó con HCl concentrado y ácidos orgánicos de grado alimentario (acético, láctico y cítrico). Los análisis de textura se realizaron en un texturómetro (Stable Micro Systems TA-XT2i). Para estudiar la reversibilidad, los geles se diluyeron 1 en 5 y se ajustó el pH a 7,0. La reversibilidad por pH y la agregación del GMP en el tiempo se determinó por Dynamic Light Scattering con un equipo Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments. El GMP gelificó a pH ácido (<4,0) a temperatura ambiente. La velocidad de gelificación disminuyó a pH cercano al pI (≈4). Los geles obtenidos a pH ácido fueron reversibles al llevar el pH a 7,0. No obstante, la distribución del tamaño de las especies moleculares fue diferente, indicando que el GMP luego de la gelificación no se encuentra más en forma monomérica. Los ácidos orgánicos tienen un efecto similar al HCl con respecto a las propiedades de gelificación y reversibilidad del GMP. Los geles de GMP fueron opacos y autosoportables. A partir de estos resultados se diseñó un producto con sabor naranja con 5 % de GMP acidulado con ácido cítrico, a pH 3,5. El producto, que no necesitó cocción previa y de sencilla elaboración, presentó una apariencia similar a la gelatina. En contacto con la saliva, de pH más básico, se disolvió en la boca, lo que favoreció la palatabilidad. Se concluye que el GMP por sus propiedades gelificantes a pH ácido puede ser utilizado en alimentos que requieran o no cocción previa. Los geles resultaron muy aceptables en término de apariencia siendo una excelente alternativa proteica para pacientes fenilcetonúricos. Además, por sus propiedades bioactivas este producto es promisorio para la inclusión en la dieta de cualquier grupo etario. Su reversibilidad podría favorecer la absorción intestinal.

## ABSTRACT

The casein glycomacropeptide (GMP) is a bioactive peptide of 64 amino acids released after the specific enzymatic cleavage of the k-casein during the cheese making. As it does not contain aromatic amino acids it is considered a suited ingredient for individuals with phenylketonuria. It has many biological activities, including: antihypertensive, antithrombotic, promoter of the bifidobacteria´s growth, inhibitor of cholera toxin. GMP is also regarded as a regulator of satiety although could has not been verified this effect in humans. In recent years, research focused on the isolation of GMP on an industrial scale and there are very few references evaluating as functional ingredient. The aim of

this study was to design, from on the basis of the gelling properties of GMP, a product suitable for phenylketonurics.
To this end, the gelation of commercial GMP was studied at room temperature (25 ºC) at the pH range between 2.0 and 4.0 and concentrations between 5 and 20 % wt. The pH adjustment was made with concentrated HCl and food grade organic acids (acetic, lactic and citric). The texture analysis was performed on a texturometer (Stable Micro Systems TA-XT2i). To study the pH-reversibility, the gels were diluted 1 in 5 and adjusted to pH 7.0. The pH-reversibility and the aggregation of GMP were determined by Dynamic Light Scattering with a Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments. The GMP gelled at acidic pH (<4.0) at room temperature and upon heating. The rate of gelation decreased when pH was closer to the pI (≈ 4). The gels obtained at acidic pH were reversible when the pH was restored to 7.0. However, the size distribution of molecular species was different, indicating that GMP after gelling was not more in any monomeric form. Organic acids had a similar effect with respect to HCl gelling properties and reversibility of the GMP. GMP gels were opaque and self supporting. From these results, it was designed a product with orange flavour with 5 % wt GMP, acidified with citric acid at pH 3.5. The product, which does not need prior cooking and is of simple preparation, presented an appearance similar to gelatine. Contacting with saliva, of basic pH, it dissolved in the mouth, which favoured the palatability. It is concluded that GMP for its gelling properties at acidic pH can be used in foods requiring cooking or not. The gels very acceptable in terms of appearance are an excellent alternative of protein for individuals with phenylketonuria. Moreover, this product is promising for its bioactive properties for inclusion in the diet of any age group. Reversibility could promote intestinal absorption.

**PALABRAS CLAVE**: *caseinoglicomacropéptido, gelificación, pH-reversibilidad, fenilcetonuria.*

**KEYWORDS**: *caseinomacropeptide, gelation, pH-reversibility, phenylketonuria.*

## INTRODUCCIÓN

La fenilcetonuria es una enfermedad hereditaria que se debe a un error en el metabolismo del aminoácido fenilalanina. La causa de la fenilcetonuira es una deficiencia en la enzima hidroxilasa de la fenilalanina hepática que no puede convertir la fenilalanina en tirosina. Las dietas para fenilcetonúricos requieren dos prácticas interrelacionadas: una extensiva restricción de las proteínas naturales para limitar la ingesta de fenilalanina y la suplementación con aminoácidos sintéticos para suplir el requerimiento adecuado de aminoácidos esenciales (Ney y otros 2008). El caseinoglicomacropéptido (GMP) es un péptido bioactivo de 64 aminoácidos liberado en la ruptura enzimática específica de la k-caseína durante la elaboración del queso. No contiene aminoácidos aromáticos por ello se considera un ingrediente útil para pacientes fenilcetonúricos. El perfil de aminoácidos del GMP es único y está asociado a la ausencia de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) como también de arginina, cisteína y histidina y además tiene elevadas cantidades de isoleucina y treonina (Thöma-Worringer y otros 2006). Tiene numerosas actividades biológicas, entre ellas: antihipertensivo, antitrombótico, promotor del crecimiento de bifidobacterias, inhibidor de la toxina del cólera (El-Salam y otros 1996, Thomä-Worringer y otros 2006). El GMP, además, es considerado como regulador de la saciedad aunque no se ha podido comprobar este efecto en humanos (Gustafson y otros 2001, Keogh y Clifton 2008). En los últimos años, las investigaciones se centraron en el aislamiento del caseinoglicomacropéptido a escala industrial y existen muy pocas referencias en los que se lo evalúe como ingrediente funcional. El objetivo de este trabajo fue diseñar, a partir del estudio de las propiedades gelificantes del GMP, un producto símil gelatina, sabor naranja, apto para pacientes fenilcetonúricos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se utilizó caseinoglicomacropétido (BioPURE GMP) de DAVISCO Foods Internacional, Inc. Su composición (en base seca) fue 83,0 ± 3,0 % de proteínas siendo 90,0 ± 3,0 % de las proteínas totales GMP, 0,6 ± 0,2 % de grasas, 6,3 ± 0,2 % de cenizas y 6,0 ± 0,2 % de humedad.

Las soluciones de GMP fueron preparadas por disolución del polvo (5 al 12 % p/p) en agua y almacenadas en la heladera al menos 24 h antes de su uso. El pH se ajustó con HCl y ácidos orgánicos (láctico, acético y cítrico) de alta normalidad para evitar dilución.

### Transición Sol-gel

El tiempo de la transición sol-gel se determinó por el ensayo "tilting test" modificado (Relkin y otros 1998). Tubos de 4 ml de capacidad con 2 g de solución de GMP fueron observados en el tiempo a temperatura ambiente y el tiempo de gelificación ($t_{til}$) se asumió como el tiempo donde no hubo deformación en el menisco al inclinar el tubo. La velocidad de gelificación ($V_{til}$) fue calculada como $1/t_{til}$. Los valores reportados fueron la media de al menos triplicados.

### Cinética de agregación del GMP

La cinética de agregación del GMP se determinó a temperatura ambiente por Dispersión Dinámica de Luz (DDL) con un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) provisto de un He-Ne laser (633 nm) un correlador digital (Modelo ZEN3600).Las medidas fueron llevadas a cabo con ángulo de dispersión fijo de 173º. Para obtener el tamaño de partículas se utilizó el método de cumulante para calcular el diámetro promedio de la distribución de intensidad o Z-average (Z-ave). El Z-ave se midió a través del tiempo para obtener la cinética de agregación.

### Determinación de la reversibilidad de los geles

Los geles de GMP (10 % p/p) fueron obtenidos a diferentes pHs a 25 ºC y almacenados al menos 24 h antes de su análisis. Luego, fueron diluidos 1:5 y el pH se ajustó a 7. Las diluciones se mantuvieron 48 h refrigeradas antes de su uso. Las diluciones fueron filtradas a través de un microfiltro de 0.45 µm de diámetro de poro (Whatman International Ltd., England) antes de la determinación del tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DDL) con un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) provisto de un He-Ne laser (633 nm) un correlador digital (Modelo ZEN3600). Las medidas fueron hechas a ángulo de dispersión fijo de 173º. Se utilizaron cubetas de poliestireno para realizar las mediciones. La técnica de DDL mide el movimiento browniano y lo relaciona con el diámetro de las partículas. Dos aproximaciones fueron utilizadas para obtener el tamaño de partículas: (i) el método de cumulante que se utilizó para calcular el diámetro promedio de la distribución de intensidad o Z-ave y además para conocer el índice de polidispersidad como un indicador del grado de agregación (ii) el método CONTIN que se usó para analizar los datos de la distribución por percentiles de los tamaños de las partículas/agregados. La distribución del tamaño de las partículas se obtuvo graficando la intensidad relativa dispersa por las partículas. Éstos gráficos se conocen como distribución de tamaños por intensidad. A través de la teoría de Mie, es posible convertir la distribución por intensidad en distribución por volumen y número de partículas. El valor del Z-ave es adecuado para obtener un simple valor con el propósito de comparación pero inadecuado para dar una completa descripción de los resultados para sistemas polidispersos. Se reportó el promedio de los valores de al menos triplicados.

### Textura de los geles

Los ensayos de perfil de textura (TPA) se realizaron sobre muestras cilíndricas de geles en envases plásticos de 2,8 cm de diámetro y 3,5 cm de altura en un texturómetro TA-XT2i de Stable Micro Systems. Para la compresión de los geles se utilizó una punta de prueba cilíndrica de ebonita de ½ pulgada de diámetro (P/05). Se comprimieron las muestras un 20 % de su altura original, a una velocidad de deformación de 0,5 mm $min^{-1}$. Este porcentaje de compresión fue determinado de modo de obtener repetitividad en los ensayos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para diseñar el producto fue necesario conocer las propiedades de agregación y gelificación del GMP y conocer así el rango de pH que se utilizaría. Como primer paso se estudió la agregación por dispersión dinámica de luz.

El Z-ave del GMP fue pH-dependiente como se muestra en la **Figura 1**. El diámetro promedio (Z-average) inmediatamente después de ajustar el pH (t = 0) mostró un mínimo a pH 4,5 y un máximo a pH 7,0 para la solución 5 % de GMP. Las soluciones de GMP a pH menores de 4,5 (condiciones ácidas) mostraron una agregación dependiente del tiempo a temperatura ambiente. El crecimiento del tamaño de partícula en el tiempo también aumentó con la concentración de GMP.

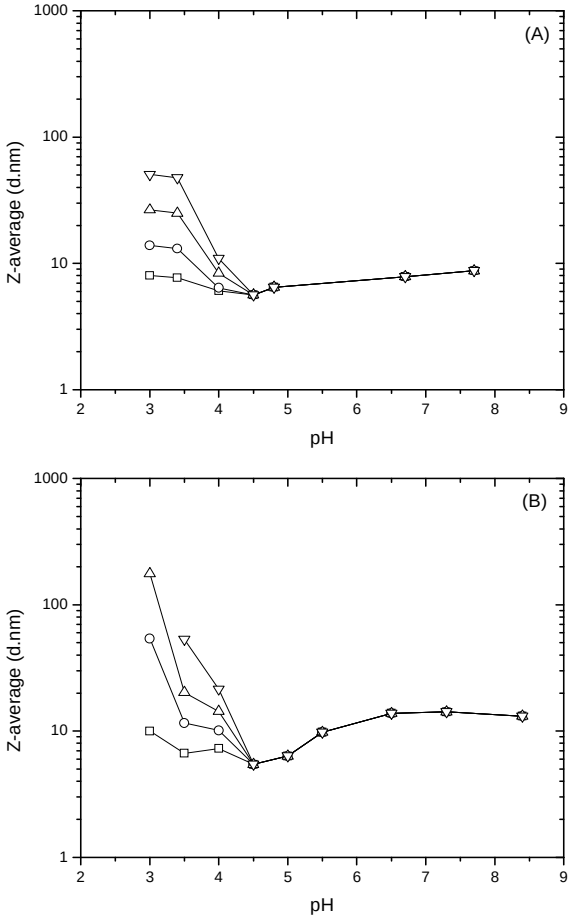


**Figura 1**. Z-ave en función del pH con el tiempo (minutos): (□) 0, (○) 20, (Δ) 40, (∇) 60. Soluciones de concentraciones: (A) 3 % y (B) 5 %. Temperatura 25 °C.

Como resultado de la agregación pH-dependiente del GMP, las soluciones a pH debajo de 4,5 gelifican con el tiempo. Por ello, se estudió si la agregación observada por dispersión dinámica de luz terminaba en gelificación o en precipitación. La gelificación del GMP a temperatura ambiente fue pH-dependiente (**Figura 2**). El mayor tiempo de gelificación se obtuvo para pH 4,0 y disminuyó con el pH. A pH 3,0 o 3,5, el GMP gelificó a concentraciones bajas como 3 %. Ésta solución, 3 %, a pH 4,0 no gelificó pero un precipitado se observó con el tiempo. La temperatura no afectó al rango de pH en el que se observó gelificación a temperatura ambiente. Los geles formados presentaron opacidad. A pH mayores que 4,0 no se observó agregación ni gelificación de las soluciones a ninguna concentración. Por estos resultados se determinó un posible rango de concentración de GMP en el producto de 3-10 % y además que el pH tendría que estar comprendido entre 3,0 y 4,0, condición de acidez adecuada para un producto alimenticio.

La constante de agregación (K) se obtuvo de la pendiente del ajuste lineal resultado de graficar el log (z-average) en función del tiempo (regresión lineal (LR) = 0,99) de los datos de la **Figura 1**. La constante de agregación se correlacionó fuertemente con la velocidad de gelificación, calculada como $1/t_{til}$, indicando que desde los primeros estadíos de la agregación se puede conocer aproximadamente cuánto demorará la solución en gelificar y de esta manera hacer una rápida predicción. A partir de los resultados de la obtención de K a diferentes pH a concentración de 3 y 5 % de GMP, se eligió el pH 3,5 para el producto alimenticio, que es similar al jugo de naranja.

Luego fue necesario reemplazar al ácido clorhídrico, con el que se había hecho los estudios, con ácidos orgánicos de calidad alimentaria (cítrico, acético y láctico) (**Figura 3**). Como resultado de la medición en el tiempo del Z-ave y la posterior obtención de K, se pudo comparar el efecto del tipo de ácido en la agregación. Como resultado de estos estudios, el ácido cítrico presentó similar constante de agregación que el ácido clorhídrico, que posibilitó la incorporación al alimento de sabores cítricos. El ácido acético presentó la menor constante de agregación.

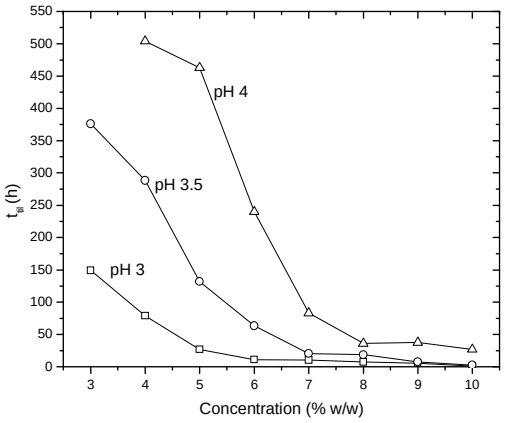


**Figura 2**. Tiempo de gelificación ($t_{tilt}$) a 25 °C como función de la concentración (3-10 %) en un rango de pH de 3 a 4.

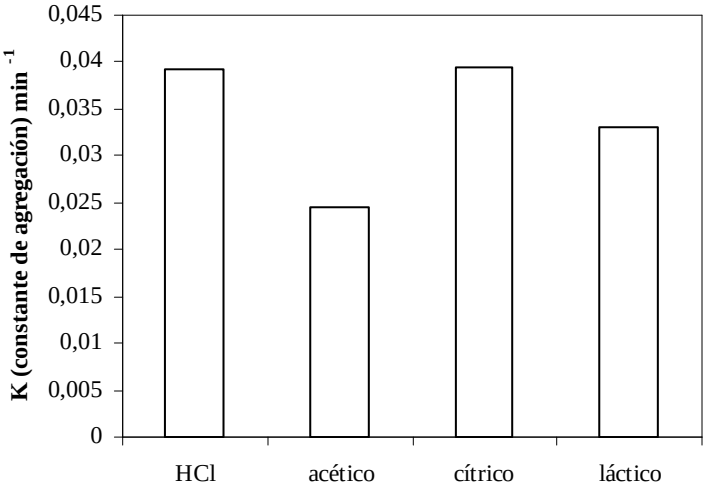


**Figura 3**. Constante de agregación, K, ($min^{-1}$) como función del tipo de ácido a pH 3,5. Concentración: 5 % de GMP. Temperatura 25 °C.

Los métodos empíricos son importantes en la evaluación de las características de los geles alimentarios. El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo que se correlaciona con el análisis sensorial y está basado en el reconocimiento de la textura como un atributo de múltiples parámetros. Se prepararon geles de diferentes concentraciones de GMP a pH 3,5 con ácido cítrico. En los ensayos de TPA de geles de GMP obtenidos con ácido cítrico a 25 ºC, los parámetros de textura (dureza, gomosidad, masticabilidad y fracturabilidad) se relacionaron principalmente con la concentración. Los geles obtenidos con concentraciones entre 5 y 8 % tienen parámetros de textura similares (**Figura 4**). La cohesividad de los geles fue muy baja (entre 0,15 y 0,20) e independiente de la concentración hasta aproximadamente un 15 %. La cohesividad puede ser tomada como una medida de la velocidad en que el material se desintegra bajo acción mecánica.

Los geles obtenidos a pH ácido fueron casi reversibles al llevar el pH a 7,0 no obstante, la distribución del tamaño de las especies moleculares fue diferente indicando que luego de la gelificación el GMP la especie predominante es la dimérica mientras que antes de la agregación era la monomérica. La reversibilidad de los geles por pH se asemeja sensorialmente a la fusión de la gelatina por temperatura en la boca.

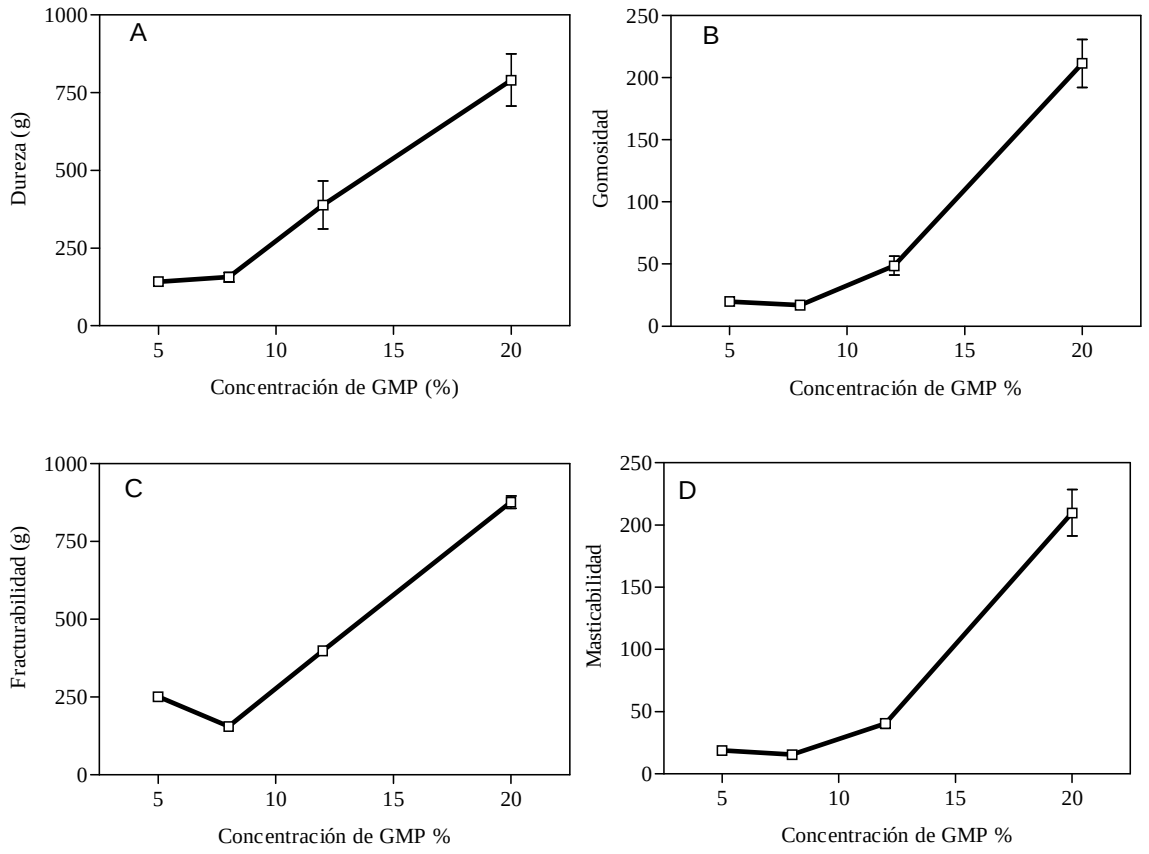


**Figura 4**. Parámetros del perfil de textura (TPA) de geles de GMP a distintas concentraciones (5-20 %) a pH 3,5 obtenidos a 25 ºC. Acidulante: ácido cítrico. A) Dureza, B) Gomosidad C) Fracturabilidad D) Masticabilidad.

## CONCLUSIONES

Se diseñó un producto con sabor naranja con 5 % de GMP acidulado con ácido cítrico, a pH 3,5 que es apto para fenilcetonúricos. El producto, que no necesitó cocción previa y de sencilla elaboración, presentó una apariencia similar a la gelatina. En contacto con la saliva, de pH más básico, se disolvió en la boca, lo que favoreció la palatabilidad.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen al Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján, a la Universidad de Buenos Aires, al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

El-Salam AMH, El-Shibini S, Buchheim W. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. International Dairy Journal, 6: 327-341.

Keogh J, Clifton P. 2008. The effect of meal replacements high in glycomacropeptide on weight loss and markers of cardiovascular disease risk. American J. Clinical Nutrition 87: 1602-1605

Ney D, Hill A, van Calcar S, Liu X, Etzel M. 2008. Dietary Glycomacropeptide Supports Growth and Reduces the Concentrations of Phenylalanine in Plasma and Brain in a Murine Model of Phenylketonuria. The Journal of Nutrition, 138: 316-322

Gustafson D, Mc Mahon D, Morrey J, Nan R. 2001. Appetite is not influenced by a unique milk pepetide: caseinomacropetide (CMP). Appetite 36: 157-63.

Relkin P, Meylheuc T, Launay B, Raynal K. 1998. Heat-induced gelation of globular protein mixtures. A DSC and scanning electron microscopic study. Journal of Thermal Analysis, 51: 747-755.

Thöma-Worringer C, Sørensen J, López Fandiño R. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. International Dairy Journal, 16: 1324-1333.

# Estudio comparativo de la dependencia con la temperatura del coeficiente de difusión de aceite de canola y girasol durante la extracción con hexano

# Comparative study of the temperature dependence of the diffusion coefficient of canola and sunflower oil during the extraction with hexane

Fernández MB (1), Perez EE (1), Nolasco SM (1), Crapiste GH (2)

(1) CONICET - Grupo TECSE – Facultad de Ingeniería – Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Bs. As. – Argentina.
(2) Planta Piloto de Ingeniería Química – CONCET - Universidad Nacional del Sur – Argentina.
eperez@fio.unicen.edu.ar

## RESUMEN

La extracción por solvente es la operación más utilizada para obtener aceite de semillas y frutos oleaginosos. Si bien los procedimientos convencionales utilizados se hallan consolidados, se continúan los estudios de extracción para obtener productos óptimos a menor costo. La difusividad es una propiedad de transporte substancial para predecir el coeficiente de transferencia de masa utilizado para el diseño de equipos, por eso es importante conocer dicho parámetro para oleaginosas cultivadas en Argentina y sobre todo de variedades específicas. En este trabajo se presenta un modelo difusivo modificado que tiene en cuenta la etapa previa de lavado de aceite de la superficie de la semilla molida y la dependencia con la temperatura aplicado a girasol y canola. Se ha utilizado como materia prima semillas molidas de canola (variedad Barrel) y girasol (híbrido Paraíso 20), con una granulometría promedio de 0,7 mm. Las muestras se han caracterizado según técnicas estandarizadas (AOCS, IUPAC, AOAC) determinándose contenidos de: humedad, aceite, proteínas y fibras. Se han realizado las extracciones en un sistema batch agitado y termostatizado a tres temperaturas 40, 50 y 60ºC. Los ensayos se realizaron por duplicado y se han tomado tiempos entre 5 min y 18 h, tiempo considerado suficiente largo como para haber alcanzado el equilibrio (tiempo infinito). Los datos experimentales se han ajustado al modelo utilizando algoritmo de Marquardt-Levenberg con el software SIGMAPLOT versión 11.0. El modelo contempla tres parámetros: A, relacionado con el valor medio de la fracción de aceite involucrada en la fase de lavado con respecto a la encontrada a tiempo infinito; $B_o$, asociada con el término preexponencial del coeficiente de difusión y $B_e$, proporcional a la energía de activación. Las muestras presentaron un contenido de humedad similares - 6,4% b.s, girasol y 6,7% b.s., canola - mientras que el contenido de aceite fue de 49,5 y 45,2% para Paraíso 20 y Barrel, respectivamente. Se representó la relación entre la masa de aceite obtenido a cada tiempo, expresada en base seca libre de aceite, con respecto a la de tiempo infinito. Se ajustó al modelo con coeficientes de correlación superiores a 0,97 para las dos especies. Se confirmó que la extracción de aceite se vio influenciada por el tipo de materia prima empleada, liberándose el aceite a velocidades diferentes. Las relaciones con las fracciones halladas a tiempo infinito fueron 26,2 y 76,7% para canola y girasol, respectivamente. La especie con mayor contenido de aceite presentó mayor energía de activación (48,55 $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$). El aceite de girasol difundió más rápidamente, con coeficientes comprendidos entre $2,42.10^{-12}$ y $7,40.10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$, mientras que el de canola de $1,40.10^{-12}$ a $2,91.10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$.

## ABSTRACT

The solvent extraction is the most used operation to obtain oil from oilseeds. Even though, the oilseed industry is consolidated, the development aims at improving the product with appropriate process conditions in order to obtain the major benefits in the shortest time. The diffusivity is an important transport property for predicting the mass transfer coefficient and it is useful for design mass transfer equipment; therefore it is essential to know this parameter for the extraction of oil from oilseeds cultivated in Argentina and especially for specific varieties. In this work it is proposed a diffusive modified model which takes into account the previous stage where solvent removes the oil from the ground seed surface by washing and the temperature dependence of oil diffusion coefficient during solvent extraction applied to sunflower and canola. Sunflower (Paraiso 20 hybrid) and canola (Barrel variety) ground seeds has been used as raw material with an average particle diameter of 0.7 mm.

Moisture, oil content, protein and fibers content were determined by AOCS, IUPAC and AOAC standard methods. Tests were carried out in a magnetically-stirred batch extractor at three temperatures (40, 50 and 60°C). Extractions were replicated twice for each of the experimental conditions during different periods of time from 5 min up to 18 h, time long enough to reach the equilibrium (infinite time). Experimental data were fitted to the model using the Marquardt-Levenberg algorithm with SIGMAPLOT v. 11.0 software. In the model, three parameters are considered: A, related to the oil fraction involved in the washing step in respect to that found at infinite time; $B_0$, associated to the diffusion coefficient pre-exponential term and $B_e$, proportional to the activation energy. Samples showed similar moisture content -6.4% d.b, girasol and 6.7% d.b., canola- and the oil content was 49.5 and 45.2% for Paraiso 20 and Barrel, respectively. The ratio between the total amount of oil that has diffused at any time and the amount transferred after equilibrium is reached, expressed as dry free base of oil, was plotted. The experimental data correlated well for all samples ($R^2$>0.97). It was confirmed that the oil extraction was influenced by the kind of used raw material, being the oil liberated at different rates. Ratios with the fractions found to infinite time were 26.2 and 76.7% for canola and sunflower, respectively. The species with major oil content presented higher activation energy (48.55 $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$). Sunflower oil diffused more quickly than canola oil, being the sunflower oil diffusion coefficients values ranged between 2.42 $10^{-12}$ and 7.40 $10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$, while 1.40 $10^{-12}$ to 2.91 $10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$ for canola.

**PALABRAS CLAVE**: *extracción, coeficiente de difusión, canola, girasol.*

**KEYWORDS**: *extraction, diffusive coefficient, canola, sunflower.*

## INTRODUCCIÓN

La extracción sólido-líquido de alimentos es una operación de transferencia de masa multicomponente, que involucra la transferencia de especies (extracto) desde el sólido hacia el solvente. En la actualidad, el método de obtención de aceites a partir de oleaginosas más utilizado en la industria es la extracción por solvente.

En general, la difusión de los solutos a través de la matriz sólida es la etapa controlante (Aguilera 2003), por lo que se hace necesario conocer las variables que afectan a la difusión, siendo ésta sustancial para determinar la velocidad a la que se producirá el proceso. La difusividad es una propiedad de transporte importante para predecir la cinética de extracción utilizada para el diseño de equipos. La compleja naturaleza química de la materia prima, temperatura, solvente, geometría de la partícula, entre otras, condicionan el consumo de tiempo del proceso y la eficiencia de extracción. Las plantas de procesamiento de oleaginosas requieren diseños adecuados a las características fisicoquímicas y morfológicas de los granos, por esta razón es importante conocer dicho parámetro para oleaginosas cultivadas en nuestro país y, especialmente para variedades específicas.

Desde la década de los 50 se han reportado modelos matemáticos para predecir la extracción de aceite, basados en datos empíricos, aplicados a soja, algodón y maní (Karnofsky 1949, Coats y Karnosfky 1950)

Diferentes enfoques se han presentado para explicar el contenido de aceite restante en el sólido en función del espesor y el tiempo de extracción (Boucher *et al*. 1942, Fan *et al*. 1948, Coats y Wingard 1950). Informes de la literatura señalan que la limitación de la extracción se debe a la composición química del aceite residual, que contiene mayores cantidades de los componentes menos solubles como fosfátidos y no glicéridos (Coats y Karnosfky 1950, Coats y Wingard 1950). El modelo más extendido para explicar el proceso de extracción considera dos mecanismos principales: i) un proceso de lavado de aceite que se produce en la superficie del grano y ii) un proceso de difusión que pueda tener lugar en una o dos fases (Patricell *et al.* 1979, So y Macdonald 1986), dependiendo de la proporción de células intactas y rotas que se han quedado después de los tratamientos antes de la extracción. Este modelo ha sido aplicado al estudio de la extracción del aceite de girasol descascarado, torta de colza y de oliva.

En este trabajo se presenta un modelo difusivo modificado, que tiene en cuenta la etapa previa de lavado de aceite de la superficie de la semilla molida y la dependencia con la temperatura aplicado a girasol y canola.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

Se ha utilizado como materia prima semillas de canola (variedad Barrel) obtenidas comercialmente y girasol (híbrido Paraíso 20) provistas por el INTA-Balcarce. Las mismas se han molido sin descascarar en un molinillo de cuchilla horizontal (Moulinex) a una granulometría promedio de 0,7 mm (harina).

### Caracterización de la materia prima

Las muestras se han caracterizado según técnicas estandarizadas (AOCS, IUPAC, AOAC) determinándose contenidos de: humedad (IUPAC 1.121 1992), aceite (IUPAC 1.122 1992), proteínas **(**AOCS Ai 4-91 1993), fibra cruda (AOCS Ba 6-84 1993), fibra detergente ácida (FDA), fibra detergente neutra (FDN) y lignina (Van Soest y Robertson 1985)

### Velocidad de extracción

Para determinar la cinética de extracción de aceite, el ensayo se llevó a cabo a diez diferentes tiempos: 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 1080 min y a tres temperaturas (40, 50 y 60°C). El proceso de extracción se realizó en un sistema batch agitado en un baño termostáticamente controlado. Se pesó exactamente 5,00 g de semillas molidas a una granulometría de 1,00 - 0,42 mm. La muestra se colocó en un erlenmeyer de 250 mL provisto de un agitador magnético. En otro recipiente se colocaron 85 mL de hexano grado técnico, para mantener una relación 17 mL de solvente/g de harina. Ambos se llevaron a la temperatura de extracción durante 5 min y luego se pusieron en contacto trasvasando el solvente al recipiente con la muestra, se tapó y colocó en el dispositivo, la temperatura se mantuvo contante, la agitación fue de aproximadamente 200 rpm en todos los ensayos, para asegurar un buen contacto entre el solvente y la muestra. Transcurrido cada tiempo preestablecido, se retiró el erlenmeyer, el contenido se filtró y el recipiente se lavó con 5 mL de hexano, para arrastrar aceite y harina pegada a las paredes. La miscela se recogió en un balón previamente tarado. El solvente se evaporó en un evaporador rotatorio y el resto de hexano se eliminó bajo corriente de nitrógeno. La cantidad de aceite obtenido se determinó gravimétricamente.

### Modelo Matemático

Se propuso un modelo difusivo modificado de la ley de Fick (1), considerando estado no estacionario y partículas de geometría esférica, suspendidas en un medio de concentración constante sin restricción de volumen (Pérez 2002)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - A\exp\left[-B_o\exp\left(-\frac{B_e}{T}\right)(t - t_o)\right] \qquad (1)$$

Siendo, t el tiempo de difusión en segundos; $M_t$ y $M_\infty$ la masa de aceite que difunde en el tiempo t y tiempo infinito, expresada como kg aceite/kg harina seca desgrasada, respectivamente**.**

El modelo contempla tres parámetros: A, relacionado con el valor medio de la fracción de aceite involucrada en la fase de lavado con respecto a la encontrada a tiempo infinito; $B_o$, asociada con el término preexponencial del coeficiente de difusión y $B_1$, proporcional a la energía de activación.

Los coeficientes están descriptos según:

$$A = \left(1 - \frac{M_o}{M_\infty}\right)\frac{6}{\pi^2} \qquad (2)$$

$$B_o = \frac{D_o.\pi^2}{R^2} \qquad (3)$$

$$B_e = \frac{\Delta E_d}{R_g} \qquad (4)$$

El coeficiente de difusión efectivo está definido por la siguiente ecuación tipo Arrhenius:

$$D_e = D_0\exp\left(-\frac{\Delta E_d}{R_g T}\right) \qquad (5)$$

donde $M_o$ es el contenido de aceite involucrado en la fase de lavado, $D_o$, la constante preexponencial expresada en $m^2.s^{-1}$; $E_d$, la energía de activación en $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$; R, el radio de la partícula de harina en m; $R_g$, la constante de los gases y T, temperatura de ensayo en escala absoluta (K).

En todos los casos se realizaron las determinaciones por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio. Los datos experimentales se han ajustado al modelo utilizando algoritmo de Marquardt-Levenberg con el software SIGMAPLOT versión 11.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se muestra la composición química de las muestras estudiadas, expresada en base seca (b.s.). Las semillas molidas presentaron un contenido de humedad en un intervalo de 6,4 a 6,7%, mientras que el porcentaje de aceite fue de 49,5 y 45,2% para el girasol y canola, respectivamente. Comparando la proporción de proteína y fibra cruda obtenida, la canola mostró menor proporción de proteína (18,7%) y mayor contenido de fibra cruda (37,0%) de ambas muestras. Por, su parte el análisis de fibras estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina) indicó que la muestra canola presentó un contenido 89,2% y 22,0% mayor de hemicelulosa y lignina, respectivamente en referencia al girasol.

**Tabla 1**. Composición química de las muestras de canola (variedad Barrel) y girasol (híbrido Paraíso 20)

| Determinación | Canola | Girasol |
|---|---|---|
| Humedad | 6,7 | 6,4 |
| Aceite (% b.s.) | 45,2 | 49,5 |
| Proteína (% b.s.) | 18,7 | 29,3 |
| Fibra Bruta (% b.s.) | 37,0 | 24,3 |
| FDN (% b.s.) | 43,7 | 39,1 |
| FDA (% b.s.) | 35,5 | 37,7 |
| Celulosa (% b.s.) | 21,8 | 30,3 |
| Hemicelulosa (% b.s.) | 13,0 | 1,4 |
| Lignina (% b.s.) | 9,5 | 7,4 |

En las **Figuras 1** y **2** se representan los datos experimentales de la extracción de aceite de girasol y canola respectivamente, conjuntamente con su ajuste.

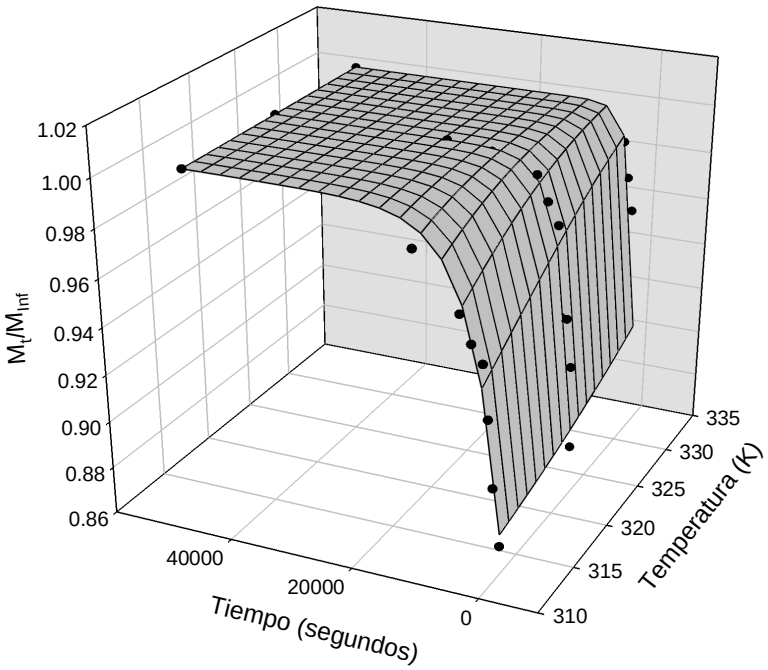


**Figura 1**. Cinética de extracción de aceite de girasol a tres temperaturas: 40, 50 y 60ºC.

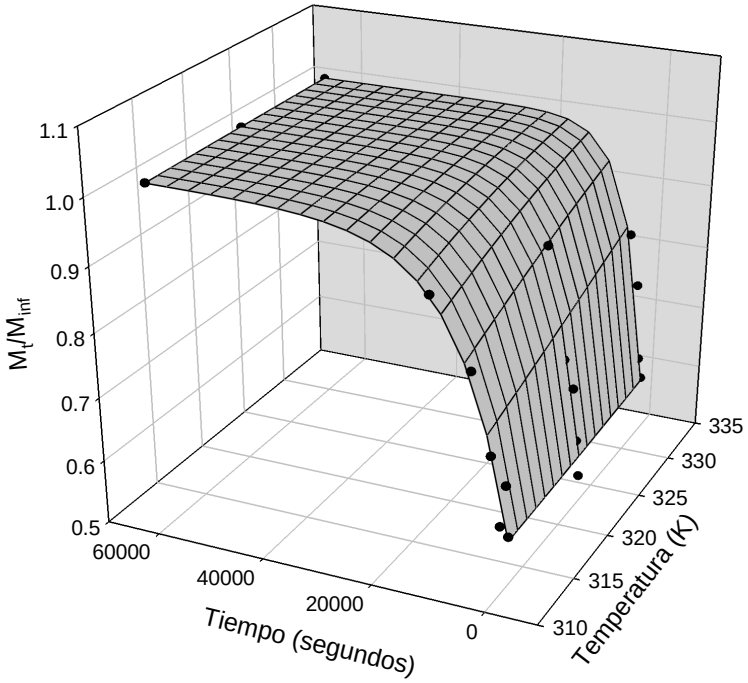


**Figura 2**. Cinética de extracción de aceite de canola a tres temperaturas: 40, 50 y 60ºC.

Se observó, en todas las muestras, que el rendimiento de aceite en el extracto se incrementó con el aumento del tiempo de contacto y temperatura. Las curvas de extracción no se iniciaron desde cero dado que la molienda previa rompió las estructuras celulares liberando el aceite y dejándolo expuesto al lavado por el solvente. Esta etapa corresponde a la más rápida de la velocidad de extracción. Las paredes celulares intactas y las membranas adheridas constituyen la mayor resistencia a la difusión (Aguilera y Stanley 1999).

La **Tabla 2** muestra los coeficientes de ajuste empleando el modelo dado por la Ec. 1. Las correlaciones de las Ecuaciones 3 y 4 permitieron obtener el coeficiente preexponencial ($D_o$) y la energía de activación (□$E_d$), siendo de $2{,}68.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$ y 31,67 $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$ para la muestra de canola, respectivamente y $3{,}02.10^{-4}$ $m^2.s^{-1}$ y 48.55 $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$ para la muestra de girasol. Las relaciones de las fracciones involucradas en la etapa de lavado con las fracciones halladas a tiempo infinito ($M_o/M_\infty$) fueron 26,2 y 76,7% para la canola y el girasol, respectivamente.

**Tabla 2**. Coeficientes de ajuste del modelo difusivo modificado.

| **Parámetros** | **A** | **$B_O$ [$s^{-1}$]** | **$B_e$ [K]** | **$R^2$** |
|---|---|---|---|---|
| Girasol | 0,1414 | $2{,}58.10^4$ | $5{,}84.10^{-4}$ | 0,972 |
| Canola | 0,4489 | $2{,}10.10^1$ | $3{,}81.10^{-3}$ | 0,973 |

La conformación de las microestructuras celulares juega un papel importante afectando a permeabilidad de los solutos. Existen reportes que indican que las paredes celulares lignificadas y materia primas con contenidos elevados de componentes lignocelulósicos reducen la transferencia de masa del los aceites y modifican la fisicoquímica de sorción. Así mismo, estos materiales contribuyen a la retención del contenido de humedad, más aún cuanto más pequeño es el tamaño de partícula, evitando que el solvente acceda a sitios activos para la extracción del aceite. Según lo expuesto en la **Tabla 1**, la canola responde a estas características, por ello que la velocidad de extracción de aceite fue menor que la de girasol.

En la **Tabla 3** se presentan los valores del coeficiente de difusión efectivo a las tres temperaturas de trabajo. Los valores obtenidos se hallaron en el orden de los informados para otros aceites de

oleaginosas extraídos con hexano como por ejemplo para girasol cultivable que varió entre $1{,}43.10^{-12}$ y $1{,}96.10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$ y para girasol silvestre entre $1{,}49.10^{-12}$ y $2{,}07.10^{-12}$ $m^2.s^{-1}$ (Pérez 2002), a pesar de que los reportes indican que el coeficiente de difusión depende fuertemente de las condiciones experimentales, geometría del sólido y demás propiedades fisicoquímicas de la materia prima.

**Tabla 3**. Coeficientes de ajuste del modelo difusivo modificado.

| **Temperatura (°C)** | **Coeficiente de Difusión Efectivo** ($m^2.s^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|
| | 40 | 50 | 60 |
| **Girasol** | $1{,}40.10^{-12}$ | $2{,}04.10^{-12}$ | $2{,}91.10^{-12}$ |
| **Canola** | $2{,}42.10^{-12}$ | $4{,}30.10^{-12}$ | $7{,}40.10^{-12}$ |

El coeficiente de difusión efectivo resultó mayor cuando se utilizó semilla de girasol, teniendo ésta una mayor dependencia con la temperatura que en el caso de la semilla de canola.

## CONCLUSIONES

El modelo difusivo modificado describe satisfactoriamente la cinética de extracción de aceites de ambas semillas cuando la dependencia del coeficiente de difusión efectivo con la temperatura se formuló mediante la ecuación de Arrhenius.

Se confirmó que la extracción de aceite se vio influenciada por el tipo de materia prima empleada, liberándose el aceite a distintas velocidades. Se encontró una mayor energía de activación en la especie con mayor contenido de aceite (girasol). La composición de la semilla afecta a la difusión del aceite, siendo el aceite de girasol el que difundió más rápidamente.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Bs. As y la Universidad Nacional del Sur –CONICET. Los autores agradecen al INTA-Balcarce la provisión de las muestras de girasol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera JM, Stanley DW. 1999. Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers. pag 335

Aguilera JM. 2003. Solid-Liquid Extraction en Extraction Optimization in food engineering. New York: Marcel Dekker, Inc. pag 35

AOCS. 1993. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4ª ed. Champaign, Illinois: AOCS Press.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15ª ed. Arlington, Virginia: Association of Official Analytical Chemists Inc.

Boucher DF, Brier JC, Osburn JO. 1942. Extraction of Oil from Porous Solid. Transactions of the American Institute of Chemical Engineers, 38: 967-993.

Coats HB, Karnosfky G. 1950. Solvent Extraction II. The Soaking Theory of Extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society, 27(3): 51-53.

Coats HB, Wingard MR. 1950. Solvent Extration III, The Effect of Particle Size on Extraction Rate. Journal of the American Oil Chemists' Society, 27(3):93-96.

Fan HP, Morris JC, Wakeham H. 1948. Diffusion Phenomena in Solvent Extraction of Peanut Oil: Effect of Celular Structure, Industrial and Engineering Chemistry, 40:195-199.

IUPAC. 1992. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7a edn. Oxford: International Union of Pure and Applied Chemistry, Blackwell Scientific.

Karnofsky G. 1949. The Theory of Solvent Extraction. Journal of the American Oil Chemists' Society, 26: 564-569.

Patricelli A, Assogna A, Casalaina A, Emmi E, Sodini G. 1979. Fattori che influenzano l'estrazione dei lipidi da semi decorticati di girasole. Rivista italiana delle sostanze grasse, 56:136–142.

Pérez E. 2002. Obtención y caracterización de aceites y harinas de girasol silvestre: *Helianthus Petiolaris*. Tesis de Doctorado en Ingeniería Química. Bahia Blanca: Universidad Nacional del Sur.

SIGMAPLOT for Windows Version 11. Copyright © 2008, Systat Software Inc.

So GC, Macdonald DG. 1986. Kinetics of oil extraction from Canola (Rapeseed). Canadian Journal of Chemical Engineeering, 64:80–86.

Van Soest PJ, Robertson JB. 1985. Analysis of forages and fibrous food. A Laboratory Manual. Deparment of Animal Science AS 613. Ithaca New York: Cornell University. pag 613.

# Modelado de la transferencia de masa durante el proceso de deshidratación osmótica de peras con soluciones de sacarosa y sorbitol

# Modeling of mass transfer during osmotic dehydration process of pears in solutions of sucrose and sorbitol

Ferrari CC (1), Arballo JR (2, 3), Mascheroni RH (2, 3)

(1) Departamento de Engenharia de Alimentos, FEA, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
(2) Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata, Argentina.
(3) CIDCA (CONICET La Plata y Universidad Nacional de La Plata)
jrarballo@cidca.org.ar

## RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la transferencia de masa y cinética de deshidratación osmótica de trozos de pera en soluciones de sacarosa y/o sorbitol. Medias rodajas de peras variedad Packham´s, de 10 mm de espesor fueron inmersas en soluciones hipertónicas de sacarosa o sorbitol en concentraciones de 40 y 60ºBrix. Soluciones conteniendo los dos azucares también fueron utilizadas con la intención de validar el efecto de los solutos en los parámetros de proceso. Las concentraciones fueron las siguientes: 40% de sacarosa + 20% de sorbitol, 30% sacarosa + 30% sorbitol y 20% sacarosa + 40% sorbitol. El proceso fue conducido por 24 h con temperatura controlada (30ºC) y agitación de 90 ciclos/min. La pérdida de agua y de peso y la incorporación de sólidos en la fruta fueron analizadas a lo largo del proceso en función del tipo y concentración de la solución. Para todos los ensayos, la pérdida de agua y peso aumentaron significativamente con la elevación de la concentración de la solución deshidratante, en tanto que los ensayos con sorbitol promovieron una mayor tasa de salida de agua de la fruta y mayor ganancia de sólidos, debido al menor peso molecular del sorbitol en relación a la sacarosa. En los tratamientos realizados con los dos solutos, la proporción sacarosa:sorbitol en la solución influenció directamente en los resultados, verificándose un mayor efecto del sorbitol tanto en la pérdida de agua como en la incorporación de azucares. Se utilizó la solución analítica para difusión con propiedades constantes para obtener los coeficientes efectivos de difusión del agua y los solutos en las distintas condiciones de proceso.

## ABSTRACT

The objective of this work was to study mass transfer and osmotic dehydration kinetics of pear pieces in solutions of sucrose or sorbitol. Half slices of pears of the variety Packham´s Triumph were immersed in hypertonic aqueous solutions of sucrose or sorbitol with concentrations of 40 or 60ºBrix. Solutions containing both sugars were also used in the attempt to validate the effect of solutes on process parameters. Compositions used were: 40% sucrose + 20% sorbitol, 30% sucrose + 30% sorbitol and 20% sucrose + 40% sorbitol. The process was run during 24 h at constant temperature (30ºC) and agitation (90 cycles/min). Weight and water loss and solids gain were analyzed along process time as a function of solution composition and concentration. For all runs weight and water loss increased significantly with solution concentration. Sorbitol induced a higher water loss and solid gain due to its lower molecular weight respect to sucrose. In the tests using mixtures of solutes the ratio sorbitol:sucrose influenced directly on results: the higher ratios determined and increase in water loss and solids gain. The analytical solution for a system with diffusion in a liquid medium, with constant properties was used to obtain the effective diffusion coefficients of water and solutes for the different process conditions.

**PALABRAS CLAVE**: *deshidratación osmótica, peras, sacarosa, sorbitol*.

**KEYWORDS**: *osmotic dehydration, pears, sucrose, sorbitol.*

## INTRODUCCIÓN

La deshidratación osmótica es una técnica ampliamente utilizada para la extracción parcial de agua de frutas y vegetales, en la cual el alimento está en contacto con una solución de baja actividad de agua (generalmente soluciones concentradas de azucares y/o sales o alcoholes), y donde se establecen dos mecanismos simultáneos de transferencia de masa debido a la diferencia de potencial químico acuoso entre la solución y el alimento: 1) transferencia de agua desde el producto a la solución, acompañada, frecuentemente, por sustancias naturales (azúcares, vitaminas, pigmentos, componentes del sabor); y 2) en el sentido opuesto, el soluto se transfiere de la solución al alimento. Como consecuencia de este intercambio el producto pierde peso y se contrae y sufre cambios en sus propiedades físicas (Spiazzi y Mascheroni 1997; Agnelli, *et al.* 2005). Los alimentos osmo-deshidratados no son estables y necesitan una segunda etapa de procesamiento, comúnmente congelado o secado por aire o microondas para alcanzar la estabilidad requerida. Los productos finales son de alta calidad sensorial y nutricional y más estables contra la contaminación microbiológica y el deterioro químico (Torregiani y Bertolo 2001). La sacarosa ha sido extensamente usada como agente osmótico, mientras el sorbitol – un polihidroxialcohol obtenido de la glucosa usando oxidación catalítica -, está siendo analizado debido a su uso como agente humidificante y endulzante en productos "light". Las condiciones del proceso osmótico (temperatura, tipo de soluto, concentración, tiempo de contacto) determinan las propiedades (textura, color, sabor) del alimento parcialmente deshidratado y evidentemente influencian en las del producto final, por lo tanto es importante caracterizar las variaciones de los índices de transferencia de masa y calidad durante la deshidratación osmótica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

Fueron utilizadas peras de la variedad Packham´s Triumph compradas en La Plata – Argentina, usando como criterio de selección: nivel de maduración, intensidad del color de la cáscara y sólidos solubles (12 - 14ºBrix), mismo tamaño y forma, a fin de obtener muestras relativamente homogéneas.

Los agentes deshidratantes fueron: sacarosa comercial (Ledesma – Buenos Aires - Argentina) y sorbitol (NEOSORB® P 60W – Roquette - Lestrem – Francia).

### Métodos

**Preparación de la Materia Prima**

Los frutos seleccionados fueron lavados en agua corriente para la remoción de las suciedades más groseras. Posteriormente, fueron pelados manualmente, cortados en medias rodajas de 1 cm, utilizando cuchillos de acero inoxidable.

**Deshidratación Osmótica**

Las muestras fueron pesadas y luego colocadas en frascos de 2000 ml con la solución deshidratante previamente calentada a temperatura de 30ºC. Las concentraciones de sacarosa y/o sorbitol están especificadas en la **Tabla 1**.

**Tabla 1**. Condiciones de proceso.

| Ensayo | Azúcar | Concentración (ºBrix) |
|---|---|---|
| SAC40 | Sacarosa | 40 |
| SAC60 | Sacarosa | 60 |
| SOR40 | Sorbitol | 40 |
| SOR60 | Sorbitol | 60 |
| SAC20SOR40 | Sacarosa/Sorbitol | 20/40 |
| SAC30SOR30 | Sacarosa/Sorbitol | 30/30 |
| SAC40SOR20 | Sacarosa/Sorbitol | 40/20 |

La relación muestra:solución utilizada fue 1:10 (p/p), para garantizar la concentración de solución constante durante todo el proceso. Los ensayos de deshidratación osmótica fueron conducidos en un

shaker termostático, marca FERCA, modelo TT400 con agitación (90 ciclos/min), por 24 h con retirada de muestras en los tiempos de 1, 2, 4, 12 y 24 h de proceso.
Después del proceso, las muestras fueron drenadas, enjuagadas con agua destilada, colocadas sobre papel absorbente para la remoción de la solución en exceso y pesadas nuevamente para la determinación de la pérdida de peso en relación a la masa inicial del producto, evaluada a través de la ecuación:

$$PP(\%) = 100.\left[1 - \frac{m_f}{m_0}\right] \quad (1)$$

siendo:
PP = pérdida de peso del producto deshidratado (%);
$m_0$ = masa inicial do producto (g);
$m_f$ = masa final do producto (g).

La pérdida de agua en términos porcentuales fue calculada por la ecuación:

$$PA(\%) = 100.\left[\frac{m_{w0} - m_{wf}}{m_{w0}}\right] \quad (2)$$

siendo:
PA = pérdida de agua del producto deshidratado (%);
$m_{w0}$ = masa inicial de agua en la muestra (g);
$m_{wf}$ = masa final de agua en la muestra (g).
La ganancia de sólidos, o incorporación de azúcares, fue calculada por medio de la siguiente ecuación:

$$GS(\%) = 100.\left[\frac{m_{sf} - m_{s0}}{m_{s0}}\right] \quad (3)$$

siendo:
GS = incorporación de azúcares del producto deshidratado (%);
$m_{s0}$ = masa inicial de sólidos en la muestra (g);
$m_{sf}$ = masa final de sólidos en la muestra (g).

**Determinación de la masa de la muestra**

La masa fue medida en balanza semi-analítica, para la verificación de la pérdida de peso durante el proceso.

**Determinación de humedad**

Fue realizada utilizando estufa de vacío a 70ºC (A.O.A.C. 2002).

**Determinación de los sólidos solubles**

Fue realizada utilizando un refractómetro de mesada Zeiss - Jena, Germany.

**Determinación de las propiedades mecánicas**

La determinación de las propiedades mecánicas fue realizada a través de la evaluación de la tensión de ruptura, del tiempo de relajación y de la tensión residual de la muestra, con el auxilio del texturómetro Universal Testing Machine, modelo TATX2i, marca Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra (Costell *et al.* 1997).
La tensión a la ruptura fue determinada a través de un ensayo de compresión uniaxial a altas deformaciones de la muestra, utilizando una placa cilíndrica de acrílico lubricada de 60mm de diámetro, a una velocidad de compresión de 1 mm/s y 80% de deformación de la muestra. Los datos de la fuerza y altura proveídos por el equipamiento fueron convertidos a tensión de Hencky ($\sigma_H$) y deformación ($\varepsilon_H$), considerando el producto incompresible, de acuerdo con las ecuaciones 4 a la 6. La tensión máxima a la ruptura fue calculada por el valor del pico de la curva tensión-deformación.

$$\sigma_H = \frac{F(t)}{A(t)} \qquad (4) \qquad \varepsilon_H = -\ln\left(\frac{H(t)}{H_0}\right) \qquad (5)$$

donde:
$\sigma_H$ = tensión de Hencky (Pa);
$\varepsilon_H$ = deformación;
F(t) = fuerza (N) en función del tiempo t (s).

$$A(t) = \frac{A_0 H_0}{H(t)} \qquad (6)$$

donde:
A(t) = área ($m^2$) en función del tiempo (s);
$A_0$ = área inicial de la muestra ($m^2$);
$H_0$ = altura inicial de la muestra (m);
H(t) = altura de la muestra (m) en función del tiempo (s).

**Análisis Estadístico**
Los resultados fueron evaluados estadísticamente a través del Análisis de Varianza, aplicando el Test de Duncan al nivel de 5% de significancia, con la ayuda del programa STATISTICA® 5.0.
**Modelado del Proceso**
La transferencia de masa fue modelada usando la solución analítica de Crank 1975, que resuelve las ecuaciones de difusión planteadas por Fick en su segunda ley.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -D_{ef}\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \qquad (7)$$

La cual se aplica asumiendo las siguientes consideraciones: la transferencia de masa es unidireccional, concentración de la solución constante en el tiempo, las concentraciones en el equilibrio deben ser determinadas experimentalmente, solo se considera el mecanismo difusional de eliminación de agua, no se considera las interacción entre flujos, se desprecia el encogimiento y la resistencia externa a la transferencia de masa.
La solución de Crank para láminas planas semi-infinitas se presenta a continuación:

$$\frac{(w_t - w_\infty)}{(w_i - w_\infty)} = \sum_{n=0}^{\infty}\frac{8}{(2n+1)^2.\pi^2}.\exp\left(-(2n+1)^2.\frac{\pi^2.D_{ef}}{4.l^2}t\right) \qquad (8)$$

El modelo se puede simplificar usando únicamente el primer término de la serie de la ecuación (8), aunque es menos riguroso matemáticamente, para tiempos largos se obtiene:

$$\frac{(w_t - w_\infty)}{(w_i - w_\infty)} = \frac{8}{\pi^2}.\exp\left(-\frac{\pi^2.D_{ef}}{4.l^2}t\right) \qquad (9)$$

Aplicando logaritmo natural a ambos lados de la ecuación, tenemos:

$$\left(\ln\frac{(w_t - w_\infty)}{(w_i - w_\infty)}\right) = \left(\ln\frac{8}{\pi^2}\right) + \left(-\frac{\pi^2.D_{ef}}{4.l^2}\right).t \qquad (10)$$

Regresionando obtenemos fácilmente los coeficientes efectivos de difusión para el agua y los sólidos ($Def_W$ y $Def_S$). La secuencia de cálculo para obtener los *coeficientes de difusión* para el agua y para el azúcar se llevó a cabo a través de un algoritmo de cálculo programado en *Matlab 6.5* donde se aplicó la función REGRESS para obtener los coeficientes *a* y *b* de la recta de ajuste.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pérdida de Peso, Pérdida de Agua y Ganancia de Sólidos

De acuerdo con la **Figura 1**, se verificó una mayor velocidad de pérdida de agua en las cuatro primeras horas de proceso en comparación con la pérdida de agua alcanzada en 24 h de deshidratación, principalmente en los ensayos realizados con sorbitol, consecuencia de la mayor fuerza osmótica de deshidratación existente entre el alimento y la solución hipertónica en el inicio del proceso. Además de eso, en todos los ensayos, fue observada una tendencia a la estabilización después de 24 h de proceso, probablemente debido a la aproximación al equilibrio.

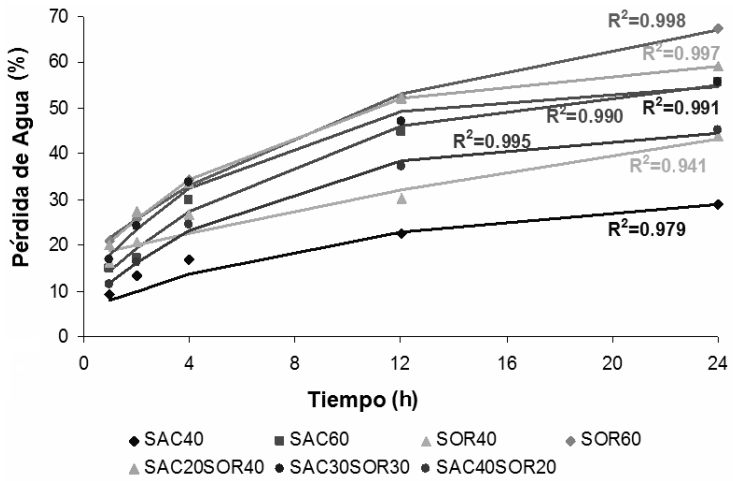


**Figura 1**. Cinética de Pérdida de Agua durante 24 h de proceso para las 7 condiciones estudiadas.

El aumento de la concentración de la solución osmótica favoreció la pérdida de agua en el producto por el mayor gradiente de presión osmótica en la interfase producto/solución, proporcionando una mayor tasa de transferencia de masa. Comportamiento semejante fue reportado por Rastogi y Raghavarao 2004 y Talens *et al.* 2002 en trabajos similares, donde los autores afirman que mayores tasas de pérdida de agua son obtenidas con la combinación de alta temperatura y concentración de la solución hipertónica. Los datos de pérdida de peso (**Figura 2**) se presentaron similares a los resultados de la pérdida de agua, o sea, una mayor reducción en la pérdida de peso fue observada en las muestras procesadas con soluciones más concentradas de azúcares.

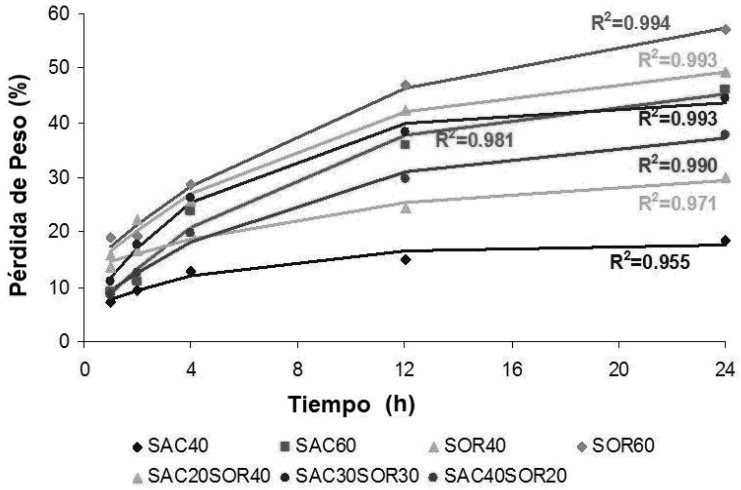


**Figura 2**. Cinética de Pérdida de Peso durante 24 h de proceso para las 7 condiciones estudiadas.

Con relación a la ganancia de sólidos (**Figura 3**), se notó una disminución de la incorporación de solutos con el aumento de la concentración de azúcar. Esta ocurrencia ya fue comprobada por diversos investigadores, tales como Torres *et al.* 2006 y Talens *et al.*2002 en sus trabajos con mangas y kiwis,

respectivamente, y está relacionada con el hecho de que soluciones más concentradas limitan la entrada de sólidos en el producto por la formación de una capa superficial de azúcar alrededor de la fruta. Además de eso, el aumento de la viscosidad de la solución a 60ºBrix representa una barrera para la transferencia de masa de la solución a la fruta.

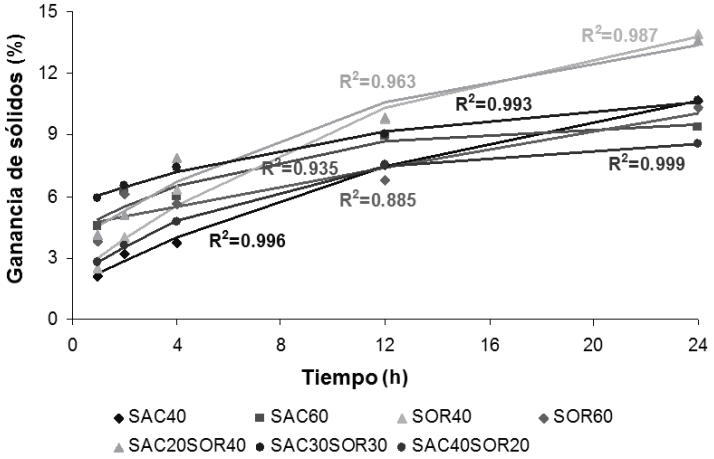


**Figura 3**. Cinética de Ganancia de Sólidos durante 24 h de proceso para las 7 condiciones estudiadas.

Las muestras procesadas con soluciones de sorbitol presentan una ganancia de sólidos más elevada a lo largo del proceso, lo que está relacionado con el menor peso molecular del sorbitol, penetrando más rápidamente en las frutas en comparación con la sacarosa. En los ensayos realizados con la mezcla de sacarosa y sorbitol, se observó una mayor pérdida de agua y ganancia de sólidos en los tratamientos con mayor proporción de sorbitol en la solución, indicando el mayor efecto deshidratante de éste azúcar en el proceso osmótico. La eficiencia del sorbitol en el proceso osmótico fue comprobada en los trabajos con frutillas (Rizzolo *et al.* 2007) y damascos (Riva *et al.* 2005; Togrul *et al.* 2007). En estos trabajos, los autores observaron una mayor pérdida de agua y una mayor ganancia de azúcares a lo largo del proceso osmótico y también atribuyeron tal ocurrencia a las diferencias entre los pesos moleculares de los dos azúcares.

## Propiedades Mecánicas: Tensión a la Ruptura

La variación de la tensión a la ruptura durante 12 h de proceso puede ser vista en las **Figuras 4** y **5**. Los datos referentes a la tensión a la ruptura para 24 h de proceso no son presentados, porque no fue verificada ruptura en éstas condiciones, probablemente debido a la elevada ganancia de sólidos (**Figura 3**), dejando la estructura más plástica.

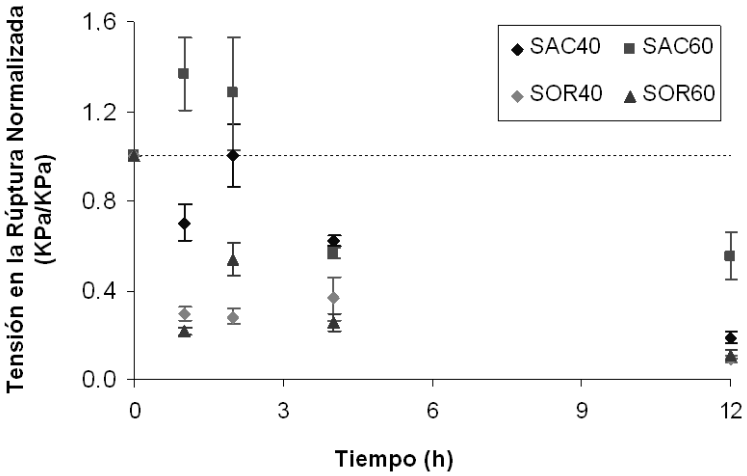


**Figura 4**. Variación de la Tensión a la Ruptura durante 12 h de proceso para los ensayos realizados con sacarosa (SAC40 e SAC60) o sorbitol (SOR40 e SOR60): concentraciones de 40 o 60ºBrix.

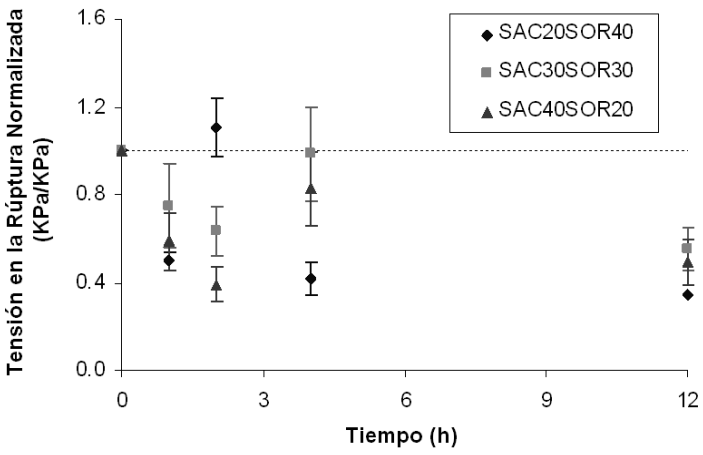


**Figura 5**. Variación de la Tensión a la Ruptura durante 12 h de proceso para los ensayos realizados con sacarosa y sorbitol. SAC20SOR40: solución con 20% de sacarosa y 40% de sorbitol, SAC30SOR30: solución con 30% de sacarosa y 30% de sorbitol, SAC40SOR20: solución con 40% de sacarosa y 20% de sorbitol.

El análisis estadístico de los datos experimentales no es presentado, porque a pesar de la relación de 5 repeticiones para este análisis (quintuplicado), no fueron observadas diferencias significativas entre las determinaciones de tensión a la ruptura de las muestras a los niveles de 5% y 10% de significancia. Tal variación en las medidas de la tensión a la ruptura se debe a la heterogeneidad entre las frutas y a la falta de uniformidad en su estructura interna, toda vez que las propiedades mecánicas de un material biológico son determinadas por la estructura y por los constituyentes de la pared celular, afectados por las condiciones de proceso y por las pequeñas variaciones en el nivel de maduración, variedad y época de cosecha. Una gran variabilidad en la materia prima también fue observada en trabajos realizados con guayabas (Pereira *et al.* 2004) y manzanas (Lewicki y Lukaszuk 2000).

De acuerdo con la **Figura 4**, los tratamientos con sorbitol resultaron en desvíos en la tensión de ruptura bastante menores que los presentados en las muestras procesadas con sacarosa, mostrando un efecto protector del sorbitol en la preservación de la estructura celular, garantizando así una mayor uniformidad en las características estructurales de la fruta.

De manera general, se puede decir que la deshidratación osmótica con soluciones de sacarosa o sorbitol provocó una reducción estadísticamente significativa de la tensión de ruptura de las muestras, dejando el producto más blando. Tal ocurrencia también fue relatada por Lewicki y Lukaszuk 2000 y por Prinzivalli *et al.* 2006 en manzanas y frutillas deshidratadas osmóticamente, respectivamente. Según los autores, el cambio de textura en el proceso osmótico es atribuido principalmente a los flujos de agua y de sólidos y a factores químicos y enzimáticos, como la descomposición de la pectina presente en la pared celular, debido a la acción de enzimas responsables por el ablandamiento de los frutos, tales como pectinametilestearasa y poligalacturonasa.

Un aumento de los valores de tensión a la ruptura en las primeras horas de proceso fue observado sólo para el ensayo con soluciones de sacarosa a 60ºBrix, hecho que puede estar relacionado con la gran tasa de pérdida de agua (**Figura 1**) y la menor incorporación de sólidos (**Figura 3**) verificada en ésta condición. A partir de lo anterior, se puede decir que el uso de sorbitol como agente deshidratante en el proceso osmótico de peras no representa una alternativa viable, debido a los grandes cambios en las características de textura de la fruta observadas desde el inicio de los tratamientos. En este caso, el uso de la solución conteniendo la mezcla de los dos solutos, como el sorbitol y sacarosa, parece ser más apropiado para el producto, debido a su estructura poco rígida y frágil, a fin de reducir las modificaciones significativas en la textura de las frutas.

## Coeficientes de Difusión

Los coeficientes efectivos de difusión (**Tabla 2**) para el agua fueron mayores en las muestras deshidratadas con sacarosa, debido probablemente a una menor incorporación de sólidos que lo que ocurre con soluciones de sorbitol. Además los coeficientes de difusión de sólidos son mayores en el caso de las soluciones con sacarosa, lo cual no es totalmente obvio debido al bajo peso molecular del sorbitol. Probablemente puede estar causado por la formación de una capa superficial de sorbitol que dificulta la difusión y enmascara el mecanismo real de difusión.

**Tabla 2**. Coeficientes de Difusión para el Agua y el Azúcar.

| Ensayo | $D_{Wef}$ ($m^2/s$) | $D_{Sef}$ ($m^2/s$) |
|---|---|---|
| SAC40 | $2.3656\ 10^{-10}$ | $2.2349\ 10^{-10}$ |
| SAC60 | $2.7296\ 10^{-10}$ | $2.4390\ 10^{-10}$ |
| SOR40 | $1.7393\ 10^{-10}$ | $1.5613\ 10^{-10}$ |
| SOR60 | $1.5637\ 10^{-10}$ | $2.0291\ 10^{-10}$ |

## CONCLUSIONES

El sorbitol, por sí solo, no mostró ser un agente deshidratante efectivo, a pesar de promover una mayor tasa de salidas de agua y mayor ganancia de sólidos, por el hecho de producir en la fruta un deterioro mayor en relación a lo que ocurre con sacarosa. El modelo propuesto ajustó adecuadamente los valores experimentales y los coeficientes de difusión obtenidos explican las modificaciones ocurridas en torno a la transferencia de masa.

Una alternativa para la optimización del proceso sería la adición de sales de calcio a la solución osmótica, buscando preservar la integridad estructural de la pared celular de los alimentos deshidratados osmóticamente y, consecuentemente, las características de textura del producto final.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


A.O.A.C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed., Gaithersburg, Ed. William Horwitz, 2002.

Agnelli ME, Marani CM, Mascheroni RH 2005. Modelling of heat and mass transfer during (osmo) dehydrofreezing of fruits. Journal of Food Engineering, 69, 415-424.

Bobbio FO, Bobbio PA 1992. Introdução à química de alimentos. São Paulo: Varela, 223p.

Cândido LMB, Campos AM 1996. Alimentos para fins especiais: dietéticos. São Paulo: Varela, 423p.

Costell E, Fisman SM, Durán L 1997. Propiedades Físicas I – Reologia de Sólidos y Textura. En: Aguilera, JM, editor. Temas en Tecnología de Alimentos, México: Ed. Instituto Politécnico Nacional, v.I, cap.6, p.215-260.

Crank J 1975. The mathematics of diffusion (2nd ed.). Oxford: Clarendon Press.

Erle U, Schubert H 2001. Combined Osmotic and Microwave-Vacuum Dehydration of Apples and Strawberries. Journal of Food Engineering, v.49, n.2-3, p.193-199.

FAO. FAOSTAT Statistical Database. Disponible en: http://faostat.fao.org. Acceso el 10 dic. 2007.

Fito P, Chiralt A, Betoret N, Gras M, Cháfer M, Martinéz-Monzó J, Andrés A, Vidal D 2001. Vacuum Impregnation and Osmotic Dehydration in Matrix Engineering. Application in Functional Fresh Food Development. Journal of Food Engineering, v.49, n.2-3, p.175-183.

Forni E, Sormani A, Scalise S, Torreggiani D 1997. The Influence of Sugar Composition on the Color Stability of Osmodehydrofrozen Moisture Apricots. Food Research International, v.30, p. 87- 94.

Kader AA. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Disponible en: http://postharvest.ucdavis.edu. Acceso el 07 dic. 2007.

Lewicki PP, Lukaszuk A 2000. Effect of Osmotic Dewatering on Rheological Properties of Apple Subjected to Convective Drying. Journal of Food Engineering, v.45, n.3, p.119-126.

Pattee HE 1985. Evaluation of quality of fruits and vegetables. Avi publishing company Inc: Westport, 410p.

Pereira LM, Rodrigues ACC, Sarantópoulos CIGL, Junqueira VCA, Cunha RL, Hubinger MD 2004. Influence of Modified Atmosphere Packaging and Osmotic Dehydration of Minimally Processed Guavas. Journal of Food Science, v.69, n.4, p.172-177.

Prinzivalli C, Brambilla A, Maffi D, Lo Scalzo R, Torreggiani D 2006. Effect of Osmosis Time on Structure, Texture and Pectin Composition of Strawberry Tissue. European Food Research and Technology, v.224, n.1, p.119-127.

Raoult-Wack AL 1994. Recent Advances in the Osmotic Dehydration of Foods. Trends in Food Science &Technology, v.5, n.8, p.255-260.

Rastogi NK, Raghavarao KSMS 2004. Mass Transfer during Osmotic Dehydration of Pineapple: considering Fickian Diffusion in Cubical Configuration. Food Science and Technology: LWT, v.37, n.1, p.43-47.

Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Niranjan K, Knorr D 2002. Recent Developments in Osmotic Dehydration: Methods to Enhance Mass Transfer. Trends in Food Science & Technology, v.13, n.1, p.48-59.

Riva M, Campolongo S, Leva AA, Maestrelli A, Torreggiani D 2005. Structure–Property Relationships in Osmo-air-dehydrated Apricot Cubes. Food Research International, v.38, n.5, p.533–542.

Rizzolo A, Gerli F, Prinzivalli C, Buratti S, Torreggiani D 2007. Headspace Volatile Compounds during Osmotic Dehydration of Strawberries (cv Camarosa): Influence of Osmotic Solution Composition and Processing Time. Food Science and Technology: LWT, v.40, n.3, p.529-535.

SIDRA – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: http://www.sidra.ibge.gov.br/. Acesso em 11 julho 2007.

Spiazzi, E.A. & Mascheroni, R.H. (1997). Mass transfer model for osmotic dehydration of fruits and vegetables. Development of the simulation model. Journal of Food Engineering, 34, 387-410.

Talens, P.; Martínez-Navarrete, N.; Fito, P.; Chiralt, A. Changes in Optical and Mechanical Properties during Osmodehydrofreezing of Kiwi Fruit. Innovative Food Science & Emerging Technologies, v.3, n.2, p.191-199, 2002.

Togrul, I.C.; Ispir, A. Effect on Effective Diffusion Coefficients and Investigation of Shrinkage during Osmotic Dehydration of Apricot. Energy Conversion and Management, v.48, n.10, p.2611–262, 2007.

Torreggiani, D.; Bertolo, G. Osmotic Pre-Treatments in Fruit Processing: Chemical, Physical and Structural Effects. Journal of Food Engineering, v.49, n.2-3, p.247-253, 2001.

Torres, J.D.; Talens, P.; Escriche, I.; Chiralt, A. Influence of Process Conditions on Mechanical Properties of Osmotically Dehydrated Mango. Journal of Food Engineering, v.74, n.2, p.240-246, 2006.

Ventura, F.C. Desenvolvimento de doce de fruta em massa funcional de valor calórico reduzido, pela combinação de goiaba vermelha e yacon desidratados osmóticamente e acerola. Dissertação (Mestre

em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004. 217p.

# Efecto de la temperatura y el rango de humedad en la energía de activación durante el secado de geles pécticos de tomate

# Effect of temperature and moisture content range on the activation energy during drying of tomato leathers

Fiorentini C [a,b], Giner S A*[a,b,c]

[a]Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 116 La Plata (B1900 AJJ), Argentina.
[b]Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.
[c]Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.
*Correos electrónicos: ce_fiore@yahoo.com.ar (Cecilia Fiorentini): saginer@ing.unlp.edu.ar (Sergio Giner)

## RESUMEN

Los propósitos de este trabajo fueron comparar los valores de la energía de activación ($E_a$) de Arrhenius, que representa la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura durante el secado de geles pécticos de tomates, determinados por dos métodos: (1) correlación con la temperatura del aire y (2) con la temperatura media del producto. Se analiza el significado fisicoquímico en ambos casos. Se utilizó una formulación desarrollada para producir geles pécticos de tomate por deshidratación con aire a temperaturas de entre 40 y 80 ºC. Las experiencias se realizaron en un secadero piloto de bandejas con pesada in situ, control de temperatura y de velocidad del aire. La humedad inicial de la formulación fue de 88% p/p, obteniéndose una lámina gelificada final con 35% p/p de textura flexible, adecuada para su consumo en pizzas y sándwiches. El producto se obtiene con una $a_w$ de 0,85 y constituye un alimento funcional por la presencia del pigmento rojo licopeno, que exhibe propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Además de las curvas de secado, se midieron las historias térmicas del producto con un termómetro infrarrojo sin contacto. Para cada temperatura del aire, la curva de humedad versus tiempo mostró una primera zona húmeda a tiempos cortos, con un comportamiento cuasilineal, interpretado con la solución analítica de la ecuación difusiva considerando resistencias internas y externas a la transferencia de masa, determinando un Biot masa de 0,2. La correlación de la difusividad con la temperatura del aire permitió ajustar una $E_a$ de 19,9 kJ/mol, valor similar al de otros autores. A tiempos largos (zona seca), la etapa fue controlada por la difusión interna de agua, utilizándose una solución analítica acorde para obtener una $E_a$ de 25,4 kJ/mol, mayor que la de la zona húmeda. Esto discreparía con la teoría de Movilidad Molecular (Mm), que predice una mayor dependencia con la temperatura de procesos limitados por la difusión, a mayor contenido de agua. Se volvieron a correlacionar los coeficientes de difusión de la zona húmeda, ahora con la temperatura media del producto y se determinó una $E_a$ de 41,6 kJ/mol, valor muy similar al calor de desorción de agua en alimentos, que es mucho mayor que la $E_a$ de la zona seca, lo que reconciliaría así los resultados con la teoría de Movilidad molecular.

## ABSTRACT

The purposes of this work were to compare the Arrhenius activation energies ($E_a$) during hot air drying of tomato leathers. This parameter, which represents the dependence of the diffusion coefficient with temperature, was determined by two methods (1) correlation of the diffusion coefficient with air temperature (2) correlation with the mean product temperature. The physical meaning of the results was analyzed for both methods. A previously developed formulation was converted in tomato leather by dehydration at air temperatures between 40 and 80 ºC. The kinetic experiments were carried out in a pilot scale tray dryer with in situ weighing,, and automatic control of air temperature and velocity. Moisture content of the formulation was 88% w/w, and the value for the finished flexible product was 35% p/p, which is suitable for using in pizza and sandwich. The leather has a water activity of 0.85 and constitutes a functional product owing to the presence of lycopene, a carotenoid responsible of the red color of tomato which, besides, possesses antioxidant and anticarcinogenic actions. Besides the drying curves, the product thermal histories were determined by a non contact infrared thermometer. In each experiment carried out at constant air temperature, the curve of average product moisture

content as a function of time showed first a "wet zone" where the decrease of moisture was quasilinear. This was interpreted by the analytical solution of diffusion considering internal and external resistances. A mass transfer Biot was determined to be 0.2. When the diffusion coefficient was correlated with air temperature, the activation energy resulted 19.9 kJ/mol, in agreement with previous authors. At long times ("dry zone"), the internal water diffusion controlled the drying rate, so an analytical solution for strict internal control was fitted to the data to obtain the diffusion coefficients. When these, in turn, were correlated with air temperature, the $E_a$ was of 25.4 kJ/mol, higher than in the wet zone but in agreement with earlier work in other dry products. However, these results would not be in agreement with the Molecular Mobility theory (Mm), which predicts a stronger dependence of diffusion-limited processes when the moisture content is higher. In the wet zone, the diffusion coefficients were then correlated with the mean product temperature in that zone, which is more realistic if a constant temperature has to be chosen. The activation energy found was 41.6 kJ/mol, which is very close to the heat of desorption of water in foods and much higher than the activation energy of the dry zone. The latter correlation would reconcile results with the Mm theory and may contribute to a better understanding of drying kinetics in foods.

**PALABRAS CLAVE**: *geles de tomate, cinética, energía de activación, modelado.*

**KEYWORDS**: *tomato leather, kinetics, activation energy, modeling.*

## INTRODUCCIÓN

El estudio de la cinética de secado de un producto brinda información útil para la industria de deshidratación de alimentos, y además contribuye para el diseño y simulación de secaderos (Ratti 2001). Los parámetros que se derivan de los estudios cinéticos, tales como los coeficientes de difusión del agua en la matriz del producto, pueden emplearse dentro de modelos de simulación para predecir el tiempo de secado y definir así las dimensiones de equipos en forma (Crapiste y Rotstein 1997).

La deshidratación de materiales frescos es un proceso complejo que involucra fenómenos de transferencia de masa y calor que ocurren simultáneamente en el interior del producto. La migración de humedad en el alimento durante el secado puede estar gobernada por una combinación de mecanismos, pero a temperaturas moderadas puede modelarse asumiendo difusión líquida. Pezzutti y Crapiste (1997), estudiando el secado de ajo, utilizaron una solución analítica de un término a la ecuación diferencial no estacionaria de difusión en sólidos que resulta dependiente del Biot y de raíces de una ecuación trigonométrica. Por otra parte, la gran mayoría de los investigadores del secado de alimentos, correlacionaron los coeficientes de difusión con la temperatura del aire de secado de sus estudios cinéticos (Zogzas *et al*, 1996). Este recurso puede resultar válido para alimentos de poca humedad, tales como los cereales, donde el sólido alcanza rápidamente el equilibrio térmico con el aire, pero no en alimentos frescos o de alta humedad, donde la temperatura media del producto durante el secado es claramente inferior a la del aire. Por tanto, la energía de activación que se ajusta con la ecuación tipo Arrhenius contra la inversa de la temperatura absoluta del aire, que representa la dependencia del coeficiente de difusión con la temperatura, no sería un valor representativo del proceso. Más aún, ese valor puede distorsionar las predicciones de consumo de combustible durante el secado, que dependen de la interrelación del tiempo de proceso y de la temperatura del aire de secado.

El presente trabajo tiene como objetivos comparar los valores de la Energía de activación de Arrhenius (Ea), obtenida por medio de dos métodos: correlación con la temperatura del aire y correlación con la temperatura media del producto. Además, se compararán las Ea encontradas en zonas con distinto mecanismo gobernante del secado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de la Formulación

La formulación de los geles pécticos de tomate fue descripta en un trabajo previo (Fiorentini *et al.* 2008). El material inicial para el estudio de las cinética de secado presenta una consistencia líquida, con un contenido de humedad del 88,5 % w/w, o 7,69 kg agua/ kg materia seca.

## Determinación de la temperatura y humedad ambiente

Las temperaturas de bulbo seco y húmedo del aire ambiente se midieron por medio de un psicrómetro desarrollado a tal fin, que consiste en un par de termómetros de mercurio. Estos lecturas se introdujeron como datos en el software Akton psychrometric (Akton Associates Inc., EUA) para calcular la humedad absoluta (ha) y relativa (hr) a la temperatura del aire de secado.

## Determinación del contenido de humedad de la formulación

El contenido de humedad de la formulación ingresada al secadero se determinó por deshidratación en estufa-balanza Mettler LP 16 a 105 ºC hasta pesada constante (Greensmith 1998, AOAC 1984). La muestra colocada pesaba 10 g. Esto involucra remover alrededor de 8,8 g de agua. La precisión de la balanza es similar a su resolución, 0,01 g de manera que el error esperado del método en esta medida es de 100 x (0,01/8,8) = 0,11%. El valor determinado para la formulación es entonces de 88,5% ±0,11/100, es decir 88,5 ± 0,10% , un error muy bajo.

## Determinación de la actividad de agua

La determinación de la actividad de agua de la formulación y del producto final fueron obtenidas a 25ºC por el método higrométrico en un Aqualab 3TE meter (Decagon Devices, Inc., EUA).

## Técnica experimental de secado

La formulación fue ubicada en bandejas de acero inoxidable de 0,20 x 0,20 m de lado, con un espesor inicial de producto de 7,5 mm. Las muestras fueron ingresadas a un secador de bandejas a escala piloto con pesada in situ.

Mientras el contenido de humedad inicial de la formulación fue determinada en estufa como se describió, el resto de las humedades a los distintos tiempos de la curva de secado se calcularon por diferencias de pesada, empleando la siguiente expresión.

$$W = \left( \frac{1 + W_0}{m_0} \right) m - 1 \qquad (1)$$

Donde $W$ y $m$ son el contenido de humedad (kg agua/kg material seca) y la masa del producto (kg), respectivamente, al tiempo $t$ medidas en una balanza digital OHAUS (precisión 0,01 g, capacidad, 3000 g) mientras que $W_0$ y $m_0$ son los correspondientes valores iniciales.

Las curvas de temperatura del producto fueron obtenidas midiendo desde un orificio en la parte superior del secadero, con un termómetro infrarojo sin contacto Testo 830 T2 (Testo AG, Alemania) sobre la superficie del producto. Este orificio se encuentra normalmente cerrado con un tapón de polipropileno. A los tiempos de medida, el tapón se retiraba para tomar en pocos segundos varias lecturas y promediarlas. Las cinéticas de secado experimentales se realizaron en duplicado a cuatro temperaturas del aire de secado: 40, 50, 60 y 80 ºC, con una velocidad de aire de 2,0 ± 0,05 m/s. Las temperaturas del aire se mantuvieron constantes mediante un controlador proporcional por tiempo, en alrededor de ± 0,5ºC del valor deseado. Para medir la variable controlada, el dispositivo electrónico emplea una termo resistencia Pt-100. La potencia se suministró uniformemente a todas las resistencias aleteadas (Potencia total instalada, 14,4 kW) a efectos de lograr un calentamiento homogéneo del aire en la sección transversal del equipo de secado.

El valor de la humedad de equilibrio experimental a las condiciones de secado, We, fue medido por prolongación del secado hasta un peso estable (24 a 36 h desde el comienzo del secado).

## Túnel de secado a escala piloto

En la **Figura 1** se muestra un diagrama esquemático del secadero de bandejas utilizado para el estudio cinético, con las referencias de cada una de las partes.

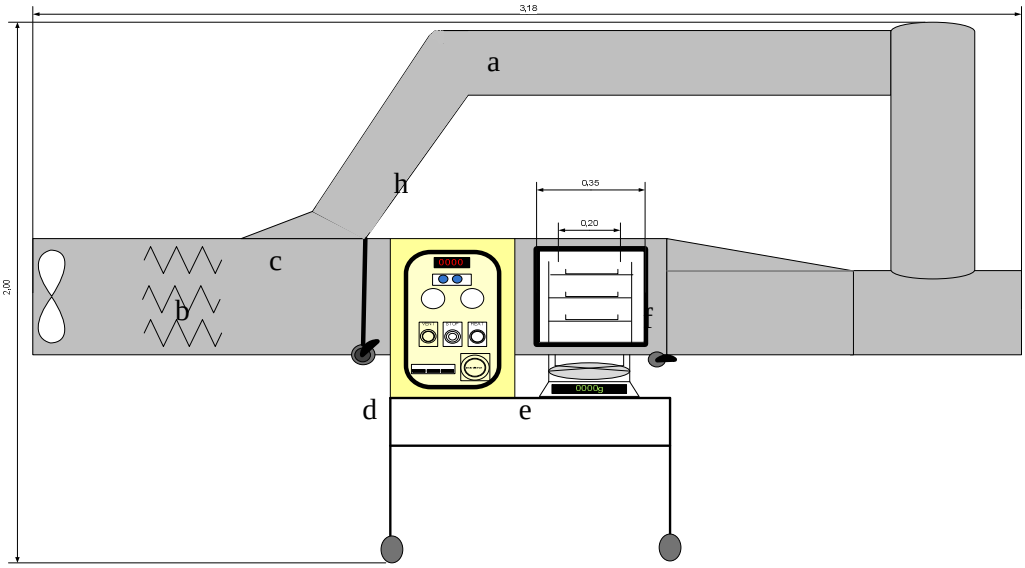


**Figura 1**. Equipo de secado. Descripción de las partes: a. Conducto paralelo de derivación, b. Resistencias internas de calentamiento del aire, c. Deflector de derivación, d. Control automático de temperatura del aire y de velocidad de aire, e. Balanza digital de precisión, f. Cámara de secado aislada térmicamente, g. Sensores de temperatura del aire, h. Orificio para tomar medidas de temperatura sin contacto.

## Modelado de la zona húmeda de la curva de secado

La "zona húmeda" de cada curva de secado fue definida basándose en las curvas de las historias térmicas (**Figura 2**). Éstas muestran dos comportamientos aproximadamente asintóticos: el primero, desde la temperatura inicial, hasta un valor intermedio correspondiente a un período de secado aparentemente constante, mientras el segundo, comienza cuando hay un "quiebre" en la curva de temperatura y la pendiente de calentamiento vuelve a subir, para posteriormente tender a un nuevo valor de la asíntota, la temperatura del aire de secado. El tiempo para el cual aumenta la pendiente de la curva de temperatura, luego del primer comportamiento asintótico, puede considerarse como el punto final de la "zona húmeda" de la curva de secado. Esta duración de la "zona húmeda" para cada experiencia de secado, corresponde a un rango de humedad adimensional $0,3 \leq W_{ad} \leq 1$ (**Figura 3**).

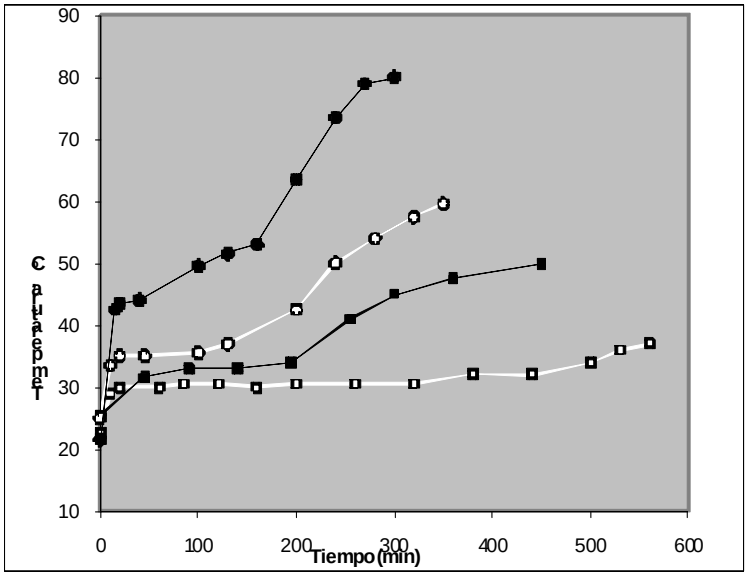


**Figura 2**. Historias térmicas del producto durante el secado, correspondientes a las curvas de la Figura 2, para temperaturas de aire de 40 (□), 50 (■),60 (○) y 80ºC (●).

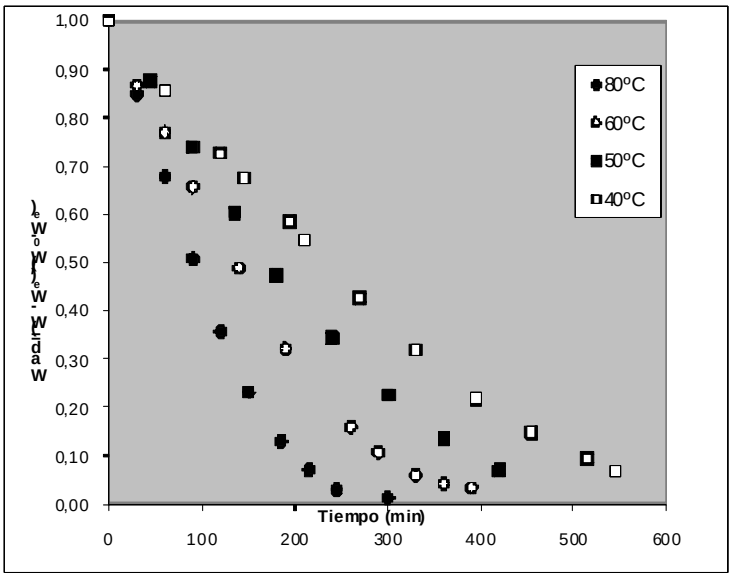


**Figura 3**. Humedades adimensionales de producto en función del tiempo. Las curvas de secado se midieron a 40 (□),50 (■),60 (○) y 80 ºC(●).

La solución analítica que expresa el contenido de humedad promedio del producto en función del tiempo para la situación general donde ambas resistencias, interna y externa son importantes, fue utilizada para la "zona húmeda". Se empleó un software estadístico para ajustar el modelo por medio de una regresión no lineal de los datos experimentales (Systat, Inc), siendo el coeficiente de difusión efectivo y el número de Biot los parámetros de ajuste para cada curva medida a una temperatura de aire constante.

$$W_{ad} = \frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\,Bi_m{}^2 \exp\left[\dfrac{-\beta_n^2\, D_{zh}\; t}{d_{zh}^2}\right]}{(\beta_n^2 + Bi_m^2 + Bi_m)\beta_n^2} \qquad (2)$$

$D_{zh}$ y $d_{zh}$ son el coeficiente de difusión efectivo del agua en el laminado de tomate y el espesor medio del laminado en la zona húmeda, respectivamente.. El símbolo $\beta_n$ representa a las raíces de la ecuación trascendente escrita debajo, que es dependiente del número de Biot para la transferencia de masa, $Bi_m$ (Crank 1975),

$$f(\beta_n) = \beta_n\, tg(\beta_n) - Bi_m = 0 \qquad (3)$$

Esta ecuación ha sido poco utilizada en la literatura, posiblemente por falta de información sobre la forma más práctica de emplearla y la relativamente nueva disponibilidad de software potente para el ajuste de parámetros de ecuaciones de cierta complejidad.
En este sentido, mediante un programa Matlab se comprobó que el uso de dos términos resulta suficiente para tener una precisión comparable a la de la serie infinita

$$W_{ad} = \frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = 2\left[\frac{Bi_m{}^2 \exp\left[\dfrac{-\beta_1^2\, D_{zh}\; t}{d_{zh}^2}\right]}{(\beta_1^2 + Bi_m^2 + Bi_m)\beta_1^2} + \frac{Bi_m{}^2 \exp\left[\dfrac{-\beta_2^2\, D_{zh}\; t}{d_{zh}^2}\right]}{(\beta_2^2 + Bi_m^2 + Bi_m)\beta_2^2}\right] \qquad (4)$$

La relación matemática entre las raíces $\beta_i$ y el Número de Biot de masa que se desarrollaron en un trabajo previo (Leiva Díaz *et al*. 2009) en base a la información provista por Crank (1975), se emplearon para el ajuste de la ecuación (4) a los datos experimentales.

## Modelado de la zona seca de la curva de secado

El secado en la zona de baja humedad ($W_{ad} \leq 0{,}3$) se encuentra gobernado por un control interno estricto (difusivo) a la transferencia de masa. Por este motivo, se empleó la solución analítica Ec (5), una serie infinita convergente.

$$W_{ad} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left( -\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4} \frac{D_{zs}\, t}{d_{zs}^2} \right) \tag{5}$$

donde $D_{zs}$ y $d_{zs}$ representan el coeficiente de difusión y el espesor promedio de la zona seca, respectivamente .En esta zona se ubican los datos de humedad adimensional menor que 0,3, por lo cual sólo un término es suficiente para la convergencia. De esta manera, es posible ajustar la ecuación en la forma semi logarítmica siguiente (Ec. (6))

$$Ln\ W_{ad} = Ln\left( \frac{8}{\pi^2} \right) - \left( \frac{\pi^2 D_{zs}}{4 d_{zs}^2} \right) t \tag{6}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se observó que los dos primeros términos de la serie de la Ecuación (2) predecían la curva del contenido de humedad adimensional vs. tiempo con una precisión similar a la obtenida con los seis términos utilizados en un trabajo previo (Fiorentini *et al.* 2008). Por lo tanto, se empleó la versión simplificada que permitió el ajuste del número de Biot y el coeficiente de difusión, a cada temperatura de aire utilizando el software estadístico Systat (Systat, 1990). Se encontró un valor óptimo de Biot de 0,2 para todas las temperaturas en la zona "húmeda" de la curva de secado, que predice una línea casi recta, con una resistencia interna a la transferencia de masa que es baja pero no despreciable. Si bien el espesor inicial de la formulación para el secado fue de 7,5 mm, el espesor promedio calculado con un modelo de contracción volumétrica para el contenido de humedad promedio en la zona húmeda (Fiorentini *et al.* 2008), fueron los siguientes: 40 ºC, 5,0 mm; 50 ºC, 4,8 mm; 60 ºC, 4,6 mm; 80 ºC, 4,7 mm. La humedad promedio en cada curva experimental se calculó numéricamente en Matlab mediante la expresión siguiente, que surge del teorema del valor medio para integrales:

$$W_m = \frac{1}{t_{zh}} \int_0^{t_{zh}} W(t)\, dt \tag{7}$$

donde los valores de W(t) son las humedades experimentales del producto al tiempo t, mientras que $t_{zh}$ es la duración de la zona húmeda.

## Cálculo de la temperatura media de producto en la zona húmeda

La temperatura media del producto en la zona húmeda se calculó por medio de la ecuación siguiente, basada en la igualación de la entalpía media del producto en la zona húmeda y la integración de la entalpía instantánea durante ese período, aplicando nuevamente el teorema del valor medio para integrales y la humedad media calculada con la ecuación (7).

$$T_m = \frac{1}{\left(C_{ps} + C_{pw} W_m\right) t_{zh}} \int_0^{t_{zh}} \left(C_{ps} + C_{pw} W(t)\right) T(t)\, dt \tag{8}$$

En la **Tabla 1**, se listan los coeficientes de difusión y números de Biot ajustados a los datos de la curva de secado (**Figura 3**) en la zona húmeda, junto a los valores de la temperatura del aire de secado y la temperatura media del producto, calculada con la Ec. (8). La **Figura 4** es un gráfico tipo Arrhenius

para la zona húmeda, donde el coeficiente de difusión se representó en función de la temperatura del aire y del valor medio en el producto. En el primer caso, la energía de activación fue de 19,9 kJ/mol, mientras que en el segundo, de mayor pendiente, de 41,6 kJ/mol. Dado que la temperatura media se considera más representativa a la hora de referir los resultados a un valor constante, es altamente posible que el valor más alto de la energía de activación sea un valor con mayor fundamento. Más aún, existe una gran similitud entre el valor más alto de la $E_a$ y el calor de desorción de agua en el alimento, que es del orden de 40 kJ/mol.

**Tabla 1**. Valores del coeficiente de difusión para la zona húmeda ($D_{zh}$), de la curva de secado de geles pécticos de tomate junto a sus correspondientes desviación estándar y coeficiente de correlación de la ecuación tipo Arrhenius a distintas temperaturas de aire y temperatura media de producto

| $T_a$, ºC | $T_m$, ºC | $Bi_m$ | $D_{zh}$ $m^2/s$ | $s(D_{zh})$ $m^2/s$ | $r^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 40 | 30,0 | 0,2 | 6,3238 x $10^{-9}$ | 0,169 x$10^{-9}$ | 0,999 |
| 50 | 31,8 | 0,2 | 7,6225 x $10^{-9}$ | 0,405 x $10^{-9}$ | 0,999 |
| 60 | 35,4 | 0,2 | 9,6238 x $10^{-9}$ | 0,567 x $10^{-9}$ | 0,998 |
| 80 | 45,7 | 0,2 | 14,876 x $10^{-9}$ | 1,09 x $10^{-9}$ | 0,997 |

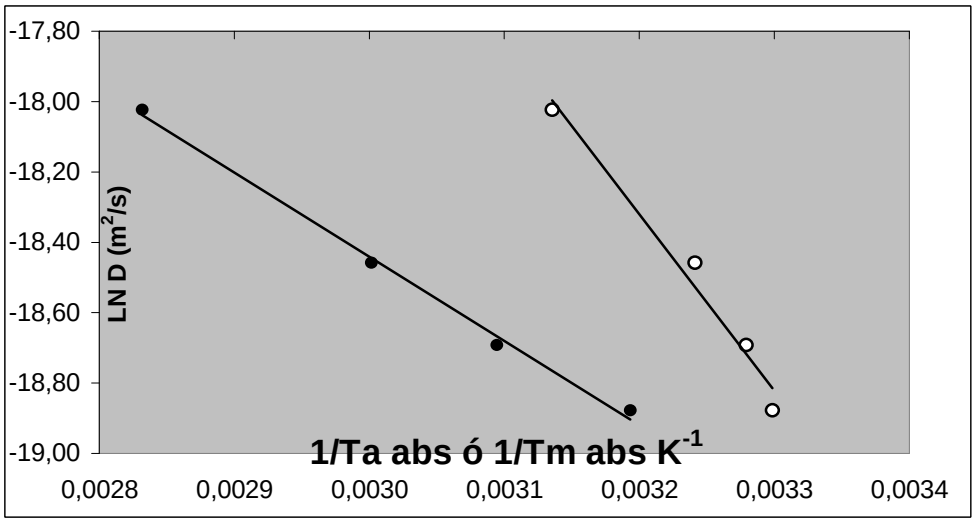


**Figura 4**. Correlación entre el coeficiente de difusión con la temperatura del aire (●) y la temperatura media del producto (○) para la zona húmeda.

La **Tabla 2** muestra los resultados de los ajustes de la ecuación (6) a los datos experimentales de la curva de secado en la zona seca. La **Figura 5**, muestra los valores del coeficiente de difusión en la zona seca, éstos son de un orden de magnitud menores que los de la zona húmeda, lo cual está de acuerdo con los datos obtenidos por otros investigadores en otros alimentos (Pezzuti y Crapiste 1997). La energía de activación de la ecuación tipo Arrhenius para esta zona se calculó correlacionando los coeficientes de difusión con la temperatura del aire, y resultó de 25,4 kJ/mol. Es posible que este valor, menor al obtenido en la zona húmeda para la correlación con la temperatura media, esté de acuerdo con que los procesos limitados por difusión presentan menor dependencia con la temperatura, a menor contenido de humedad (Roos 1995)

En la **Figura 6**, se muestra una comparación de la correlación en cada zona, observándose que en la zona seca los procesos de difusión son más lentos por producirse a bajos contenidos de humedad.

**Tabla 2**. Valores del coeficiente de difusión para la zona seca ($D_{zs}$), junto a sus correspondientes desviación estándar y coeficiente de correlación de la ecuación tipo Arrhenius a distintas temperaturas de aire

| $T_a$, ºC | $D_{zs}$ $m^2/s$ | $s(D_{zs})$ $m^2/s$ | $r^2$ |
|---|---|---|---|
| 40 | $0{,}980 \times 10^{-10}$ | $0{,}07 \times 10^{-10}$ | 0,983 |
| 50 | $1{,}256 \times 10^{-10}$ | $0{,}116 \times 10^{-10}$ | 0,980 |
| 60 | $1{,}935 \times 10^{-10}$ | $0{,}088 \times 10^{-10}$ | 0,993 |
| 80 | $2{,}865 \times 10^{-10}$ | $0{,}027 \times 10^{-10}$ | 0,978 |

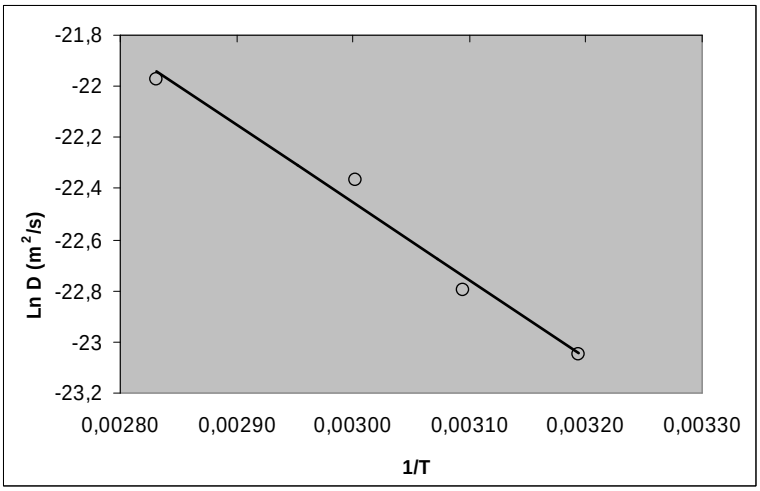


**Figura 5**. correlación entre el coeficiente de difusión y la temperatura del aire para la zona seca.

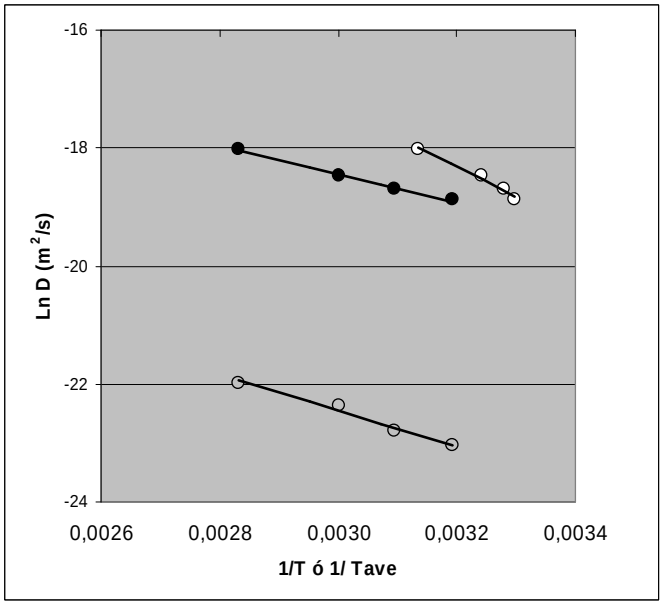


**Figura 6**. Correlaciones de las Figuras 4 y 5, graficadas conjuntamente: Coeficientes de difusión para las zonas húmeda en función de la temperatura del aire (●) y de la temperatura media del producto (○). Correlación del coeficiente de difusión de la zona seca(●), con la temperatura del aire.

## CONCLUSIONES

La Ea determinada correlacionando el coeficiente de difusión de la zona húmeda con la temperatura del aire, fue de 19,9 kJ/mol. Es el método convencional y su valor es comparable al de otros alimentos vegetales de alta humedad.

Al correlacionar los mismos coeficientes con la temperatura media del producto en la zona húmeda, se obtiene una Ea de 41,6 kJ/mol. Se considera que este valor tiene más sentido físico por provenir de una correlación con la temperatura media del producto

El valor de Ea determinado al correlacionar el coeficiente de difusión de la zona seca con la temperatura del aire fue 25,4 kJ/mol. Esta parte del secado ocurre a una temperatura más próxima a la del aire

Las diferencia de Ea entre 41,6 y 25,4 kJ/mol concordaría con la teoría de la Movilidad Molecular, que predice un efecto más débil de la temperatura en los procesos difusionales que se desarrollan a bajos contenidos de agua.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las entidades siguientes por el respaldo recibido: Comisión de Investigaciones Científicas, CICPBA, CONICET, Universidad Nacional de La Plata, y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (1984). *Official methods of analysis* (14th ed.). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Crank J. (1975). The Mathematics of Diffusion, 2nd edn, Oxford, UK:Oxford Clarendon Press.

Crapiste GH, Rotstein E. (1997). Design and performance evaluation of dryers. In: Valentas K.J., Rotstein E. and Singh R.P. (eds), Handbook of Food Engineering Practice 4. Boca Raton, New York: CRC Press, pp. 125–165.

Fiorentini C, Leiva Díaz E, Giner SA. (2008). A Mass Transfer Model for the Drying of an Innovative Tomato Gel. Food Science and Technology International. Vol 13, issue 6.

Greensmith M. (1998). Practical Dehydration, 2nd edn, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.

Leiva Díaz E, Giannuzzi L, Giner SA. (2009) Apple pectic gel produced by dehydration. Food and Bioprocess Technology 2 (2), 194-207

Pezzutti A, Crapiste GH. (1997). Sorptional equilibrium and drying characteristics of garlic. *Journal of Food Engineering*, 31(1), 113-123

Ratti C. (2001). Hot air and freeze drying of high–value foods: a review. Journal of Food Engineering 49: 311–319.

Roos YH. (1995). *Phase transitions in foods*. Academic Press, Inc., San Diego, New York, Boston.

Systat (1990). *Systat 5.02* for Windows, Systat, Inc., Evanston IL, USA 60201

Zogzas NP, Maroulis ZB, Marinos-Kouris D. (1996). Moisture diffusivity data compilation in foodstuffs. *Drying Technology*, 14(10), 2225-2254.

# Efecto de la liofilización sobre la viscosidad aparente de la pulparefinada de mango (*Mangifera indica* L.)

# Effect of the liofilitation in the viscosity aparent in pulp refinate mango (*Mangifera indica* L.)

González C (1), Soto N (1)

(1) Laboratorio de Procesos Agroindustriales. Programa Ingeniería Agroindustrial.
Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela
cesargonzalez@ucla.edu.ve

## RESUMEN

La presente investigación describe el comportamiento reológico de la pulpa de mango (*Mangifera indica L.*) a través de la determinación de su viscosidad aparente y al mismo tiempo persigue esclarecer si el proceso de liofilización incide en dicho parámetro reológico. La metodología utilizada se fundamentó en la construcción de reogramas a partir de mediciones de la viscosidad aparente en muestras de pulpa refinada fresca, y muestras de pulpa refinada, liofilizada y reconstituida (incorporación del contenido de humedad extraído). Para lo cual se empleó un viscosímetro Brookfield LVD. Los reogramas obtenidos permitieron definir el comportamiento pseudoplástico de ambas pulpas, asi como visualizar una disminución de los valores de viscosidad aparente experimentados por las muestras liofilizadas y reconstituidas. Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico Statgraphycs Centurion versión XV Plus, con el cual se analizó la varianza de las viscosidades aparentes obtenidas (antes y después del tratamiento), corroborando la diferencia significativa en la viscosidad aparente de las pulpas en estudio.

## ABSTRACT

This research describes the rheological behavior of the mango pulp (*Mangifera indica L.*) through the determination of their apparent viscosity at the same time tries to clarify whether the lyophilization (Freeze-Drying) process impinges on this parameter rheological. The methodology used was based on the construction of reograms from measurements of the viscosity apparent in samples of fresh pulp refined, and samples of refined pulp, freeze-dried and reconstituted (incorporating the moisture content extracted). For that which is used a viscosimeter Brookfield LVD. The reogramas earned helped to define the pseudoplastic behaviour of both pulp, as well as displaying a decrease in viscosity experienced by the apparent freeze-dried and reconstituted samples. To analyze the results using the statistical package Statgraphycs Centurion Plus version XV, which analyzed the variance of apparent viscosities obtained (before and after treatment), corroborating the significant difference in the apparent viscosity of the pulp in study.

**PALABRAS CLAVE**: *reología, fluido, consistencia, deshidratación, reconstitución.*

**KEYWORDS**: *rheology, fluid, consistency, dehydration, reconstitution.*

## INTRODUCCIÓN

El mango (*Mangifera indica* L) es una fruta tropical muy popular en Venezuela, tanto para consumo fresco como para procesamiento y obtención de diversos productos. Esta gran aceptación se debe a su valor comercial, digestibilidad, palatabilidad, sabor agradable y valor nutritivo. Debido a la gran aceptación, se requiere una información más detallada sobre las características de su pulpa y establecer los atributos que definan su calidad de acuerdo a su comercialización.

Por otro lado, el estudio de las características reológicas de un producto alimenticio es de suma importancia en la actualidad. Éste además de contribuir al conocimiento de la estructura del producto analizado, permite a la agroindustria controlar los procesos involucrados en la elaboración de alimentos, al efectuar frecuentemente medidas reológicas sobre las materias primas y flujos en

proceso, enfocadas en la aceptación del producto por parte del consumidor. Asi mismo presta una valiosa ayuda en el diseño de la maquinaria requerida, al precisar el tipo de tolvas, tuberías, bombas, entre otros, que más se adecua a las características del producto utilizado.

Se han registrado numerosas investigaciones orientadas al estudio reológico de pulpas de frutas. Entre las publicaciones revisadas destaca el estudio realizado por Ramos *et al.* (2006), quienes caracterizaron las propiedades viscoelásticas de pulpa de membrillo a diferentes concentraciones de sólidos solubles. El estudio fue realizado en el rango de concentraciones de 12,3 a 28 °Brix. Los resultados demostraron un predominio del carácter viscoso sobre el carácter elástico de la pulpa de 16 a 20 °Brix.

En otro orden de ideas, el proceso de liofilización ha sido de gran utilidad en la actualidad como método de conservación de diversos alimentos, al prolongar en gran medida la vida útil del producto, ofreciendo las mismas cualidades organolépticas y valor nutritivo del alimento fresco. Se han reunido esfuerzos en las últimas décadas para comprobar con éxito la conservación de sustancias termolábiles una vez que el producto ha sido sometido a una etapa de deshidratación por medio de la liofilización.

En relación a este punto, Rotsteint *et al.* (1983) mencionan que la dificultad y baja rehidratación de manzanas deshidratadas es explicado por el cierre de los poros durante el colapso celular durante la deshidratación, en contraste la liofilización muestra una rápida rehidratación debido a que los poros permanecen intactos al no verse afectados por el método de sublimación.

Por último, Zambrano *et al.* (2007) realizaron un estudio del efecto de la temperatura sobre la cinética, el coeficiente de difusión y la adición de ácido cítrico y cloruro de sodio sobre la rehidratación de zanahorias liofilizadas. Los resultados obtenidos afirman que las variables de mayor influencia sobre la rehidratación son el contenido de ácido cítrico, la temperatura y la concentración de ácido cítrico, a los niveles estudiados.

Es por ello que la presente investigación se enfoca en esclarecer si existen otros efectos colaterales en la aplicación del mencionado método de conservación, más concretamente sobre la viscosidad aparente de la pulpa refinada de mango, con el propósito de que las mismas sean conocidas y tomadas en cuenta a la hora de seleccionar y diseñar las condiciones de operación más adecuadas en procesos en donde involucren dicha tecnología, como una contribución al conocimiento de las pulpas de las frutas producidas y procesadas en el país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevo a cabo en 3 etapas: en la primera, se caracterizó el comportamiento reológico de la pulpa refinada de mango de la variedad “bocado”, recién extraída (sin tratamiento) a través de la construcción de reogramas en base a mediciones de viscosidad aparente. Una segunda etapa, en donde se caracterizó el comportamiento reológico de la pulpa refinada de mango de la variedad “bocado” tratada, definiendo el tratamiento como: deshidratación por liofilización y posterior reconstitución de las muestras (incorporación del agua extraída); lo cual permitió identificar si el proceso de liofilización genera una variación de la viscosidad aparente de la pulpa en estudio. Por último, durante la etapa 3 se corroboraron los resultados obtenidos aplicando análisis estadístico, dicho procedimiento permitió confirmar si las muestras tratadas se diferencian significativamente de las no tratadas. A continuación se describe cada una de las actividades involucradas en la ejecución de la investigación durante la realización de las diferentes etapas.

### Toma y selección de las muestras

Para el desarrollo de la investigación se emplearon mangos (*Mangifera indica l.)* de la variedad “bocado”. La selección de los frutos se realizó de manera visual, siguiendo una escala de color elaborada con anterioridad, solo los frutos similares al patrón 5 de la mencionada escala fueron elegidos. Se escogió el patrón 5 de la escala por 2 razones: la primera, por representar el fruto fisiológicamente maduro, pero aún de textura firme, evitando de esta manera que el traslado o la manipulación originara algún daño en el lote; y en segundo lugar, para garantizar el procesamiento del fruto el día siguiente en su estado de madurez óptima.

### Obtención de la pulpa refinada

Para la elaboración de la pulpa refinada de mango se empleó una despulpadora marca SPRINMATIC (de 10 kg de capacidad). Asimismo se empleó un tamiz de acero inoxidable malla 65 (por lo que las perforaciones en el tamiz tendían un diámetro de 2 mm). La despulpadora fue alimentada con mangos

pelados manualmente. El tiempo de despulpado fue estandarizado con anterioridad, estableciendo 5 minutos de procesamiento.

## Acondicionamiento de las muestras

El acondicionamiento de las muestras se fundamentó en cuatro pasos: acidificación, estandarización de los grados Brix, empacado y congelación.

**Acidificación**. Para garantizar la inactivación enzimática y cualquier actividad microbiana que pudiera incidir en la variación de la viscosidad de las muestras durante su manipulación, se disminuyó el pH de las muestras a un valor de 3,5; para lo cual se añadió una solución de ácido cítrico saturada al 50 %.

**Estandarización de los grados Brix**. La pulpa extraída arrojo en cada uno de los ensayos una concentración promedio de 18 ºBrix. Solo en el ensayo en donde se determinó el efecto del tratamiento sobre la concentración de las muestras, fue necesaria la dilución de las mismas, hasta alcanzar valores de 10, 12, 14 y 16 ºBrix. La dilución se efectuó añadiendo agua destilada según cálculos de balance de materia realizados para ajustar la concentración al valor deseado.

**Empaque y congelación**. Las muestras fueron empacadas en bolsas de polietileno provistas de cierre hermético. Una vez selladas e identificadas se introdujeron de forma horizontal (formando una delgada capa) en una cava de congelación la cual las mantuvo a una temperatura de -20 ºC. El tiempo de congelación total en los diferentes lotes procesados varió entre 20 a 26 horas.

Cabe destacar que la etapa de congelación, solo fue aplicada a las muestras a liofilizar, es decir, para determinar el comportamiento reológico y el cálculo de la viscosidad aparente de la pulpa fresca (sin tratamiento) se empleó pulpa acondicionada inmediatamente después de ser refinada.

## Tratamiento de las muestras

**Liofilización de las muestras.** Para la aplicación del tratamiento se empleó un liofilizador marca: LABCONCO modelo Lyph·lock 6. Las muestras congeladas fueron troceadas manualmente, realizando el menor daño posible, e introducidas en los recipientes de 900 mL de capacidad del liofilizador. Durante el llenado de los recipientes los trozos de pulpa congelada se introdujeron de forma suelta dejando espacios vacíos entre los trozos para aumentar la eficiencia del tratamiento. Una vez llenado los envases (hasta ¾ partes de su capacidad) fueron pesados (dicho peso menos el peso de la tara o recipiente vacío permitió determinar el peso de pulpa a liofilizar)

El tratamiento de liofilización de las muestras en el equipo descrito se llevo a cabo a -45ºC y 7 a 20 x $10^{-3}$ M Bar.

La finalización del tratamiento fue indicada por la activación de la alarma del liofilizador, estableciendo una duración del tratamiento entre 56 a 60 horas. El equipo deshidrató cada una de las muestras hasta que las mismas alcanzaron un porcentaje de humedad igual a 3%. Dicho valor se determinó empleando un analizador de humedad Marca Ohaus, modelo MB45.

**Reconstitución de las muestras**. La adición de agua para la hidratación de las muestras liofilizadas fue determinada por diferencia de peso; por lo cual fue necesario pesar las muestras de pulpa de mango refinada justo antes del tratamiento de liofilización y una vez liofilizadas. Al restar ambas masas se calculó la cantidad de agua extraída en la operación de deshidratación. Una vez agregada la cantidad de agua determinada teóricamente, la concentración fue corroborada mediante la medición de los grados Brix de la muestra empleando para ello un refractómetro portátil.

Para lograr la hidratación, fue necesario sumergir los trozos de pulpa liofilizados en el agua destilada por espacio de 20 minutos. Seguidamente se continuó el procedimiento establecido para la medición de la viscosidad que se describe a continuación.

## Medición de la viscosidad aparente

Para determinar la viscosidad aparente de las muestras se identificaron en primer lugar, las condiciones de operación del viscosímetro Brookfield LVD empleado. A través de ensayos preliminares se estableció tanto el eje del viscosímetro que corresponda al tipo de fluido, los cuales fueron ejes 62 y 63; así como las diferentes R.P.M. (velocidad de rotación) a las cuales el equipo arroje lectura.

Entre los criterios tomados en consideración para la selección de las velocidades de rotación figuran en primer lugar, los parámetros empleados por Medina y Pagano (2001); en segundo lugar se tomo en cuenta la velocidad de lectura arrojada por el equipo, ya que las lecturas mostradas en el mismo a 20-30 RPM se mostraban claramente y a una rapidez que permitían detener la rotación del eje. Asimismo, se estableció una temperatura de las muestras fija durante todas las determinaciones de viscosidad realizadas, la cual fue de 25 ºC (valor comúnmente empleado en la consulta bibliográfica realizada).

Para mantener las muestras a una temperatura constante (25 °C) se empleó un baño termostatado, Marca: Precis Term.
Cabe destacar que para cada uno de los ensayos realizados, se emplearon 3 muestras, la lectura de viscosidad aparente en cada uno de ellas fue realizada por triplicado, lo que permitió obtener un promedio de las 3 lecturas de viscosidad por cada parámetro analizado en cada una de las muestras individualmente. Dicho valor fue el utilizado para la realización diferentes representaciones gráficas.

**Fase I.- Caracterización del comportamiento reológico de la pulpa de mango refinada fresca**

Para distinguir el comportamiento reológico de las muestras se procedió a identificar en cuál de las categorías pertenece el producto en estudio. En primer lugar se determinó la viscosidad aparente de muestras de pulpa de mango a diferentes intensidades de cortadura (velocidad de deformación); las cuales fueron: 4, 5, 6, 10, 12, 20, 30 y 50 RPM, cada lectura de viscosidad (variando las RPM) se realizó a un mismo intervalo de tiempo, dejando transcurrir 2 minutos entre cada lectura. Se verificó la temperatura del fluido en cada medición la cual fue de 25 °C. Con los datos obtenidos se representó gráficamente la viscosidad aparente ($\eta$) en Centipoise versus la velocidad de deformación ($D$) en RPM; según la conducta descrita, se definió a cuál de las categorías de comportamiento no newtoniano corresponde (plástico, pseudoplástico o dilatante).
Seguidamente se realizó un estudio del comportamiento dependiente del tiempo de la muestra, para ello, se realizaron mediciones de viscosidad aparente igualmente recién despulpadas, manteniendo la misma velocidad de deformación (20 RPM) dejando transcurrir 10 minutos entre una lectura y otra. Se tomaron un total de 20 lecturas, por lo que se realizaron mediciones de viscosidad durante 200 minutos. Los valores obtenidos sirvieron para representar gráficamente la viscosidad aparente en función de t; según el comportamiento ilustrado en la gráfica se precisará si el fluido en estudio describe un comportamiento de un fluido tixotrópico o reopéctico.

**Fase II. Caracterización del comportamiento reológico de la pulpa de mango liofilizada y reconstituida**

Para la caracterización reológica de las muestras de pulpa de mango liofilizadas se siguió la metodología detallada anteriormente para la caracterización reológica de pulpa de mango refinada recién extraída, es decir, se realizaron mediciones de viscosidad aparente en muestras de pulpa de mango liofilizadas y reconstituidas (hidratadas) a diferentes intensidades de cortadura o velocidad de deformación; y manteniendo la misma velocidad de deformación (20 RPM) dejando transcurrir 10 minutos entre una lectura y otra.

**Fase III. Comparación de los valores de viscosidad aparente registrados por las muestras antes y después del tratamiento**

Los valores obtenidos en la fase II fueron comparados con los valores de viscosidad aparente de las pulpas frescas (fase I). La representación gráfica de ambos ensayos y el análisis estadístico de los resultados realizado permitieron determinar si existió o no diferencias significativas entre la viscosidad aparente de la pulpa de mango fresca y la viscosidad aparente de la pulpa de mango liofilizada y reconstituida.
Por otro lado, se contempló un ensayo, en el cual se estudió el efecto de la concentración de las muestras sobre el tratamiento (liofilización y reconstitución), para ello se contemplaron 5 muestras con diferentes concentraciones, a 10, 12, 14, 16 y 18 ºBrix. A las cuales se les determinó la viscosidad aparente antes y después del tratamiento. Igualmente fueron elaborados los reogramas correspondientes de cada una de las muestras a diferentes concentraciones, representando gráficamente el valor obtenido antes y después del tratamiento; lo que permitió visualizar si el efecto tiene mayor incidencia en muestras con concentraciones menos elevadas.

**Fase IV. Análisis estadístico de los resultados**

En primer lugar, se corroboró el cumplimiento de los supuestos básicos (normalidad, aditividad y homogeneidad de varianzas) de los datos obtenidos en los diferentes ensayos. Para ello fue necesario el empleo de las siguientes pruebas: Prueba de Ji – Cuadrado de bondad de ajuste (para el Supuesto de Normalidad) y la Prueba de Pearson y Hartley (para el supuesto de homogeneidad de varianzas).
El sistema de hipótesis para el análisis del efecto del tratamiento se estableció de la siguiente manera:

$H0 : \mu\eta$ antes del tratamiento $= \mu\eta$ después del tratamiento contra $H1 : \mu\eta$ antes del tratamiento $\neq \mu\eta$ después del tratamiento

En segundo lugar, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de viscosidad aparente de las muestras antes y después del tratamiento, se opto por el análisis de la varianza, empleando para ello el software Statgrafhics Centurion versión XV, en el cual se utilizó ANOVA de un solo factor y ANOVA multifactorial, en los dos tipos de comparaciones realizadas, las cuales se describen a continuación:

**1) Comparación de cada una de las muestras antes y después del tratamiento a diferentes concentraciones:** en este primer análisis se compararon los valores de viscosidad aparente registrados por cada una de las muestras (a cada una de las concentraciones estudiadas) antes y después del tratamiento, estableciendo de esta forma 5 comparaciones, constituidas por cada una de las muestras a las cinco diferentes concentraciones (10, 12, 14, 16 y 18 ºBrix). Para dicha comparación se empleó ANOVA de un solo factor (definiendo el factor como el tratamiento).

**2) Comparación del efecto de las concentraciones sobre los valores de viscosidad aparente antes y después del tratamiento:** para corroborar si las concentraciones tuvieron una influencia en el efecto del tratamiento, fueron comparadas simultáneamente los cinco pares de muestras (a diferentes concentraciones, antes y después del tratamiento). Para la realización de dicha comparación fue necesario el empleo del método ANOVA multifactorial, en donde se establecieron 2 factores:

Factor 1: la concentración de las muestras (es decir 1=10 ºBrix, 2=12 ºBrix, 3=14 ºBrix, 4=16 ºBrix y 5=18 ºBrix)

Factor 2: el tratamiento (definiendo 1 = antes del tratamiento y 2 = después del tratamiento)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Medición de la viscosidad aparente con variación de la velocidad de deformación en muestras de pulpa refinada de mango sin tratamiento.

En base a los valores viscosidad aparente de cada una de las muestras se construyó la **Figura 1**, en esta se destaca la variación de la viscosidad aparente de las muestras al ser sometidas a diferentes velocidades de deformación. En él, se puede apreciar dos 2 aspectos: en primer lugar el fluido, en este caso pulpa refinada de mango, presenta, como era de suponerse, variaciones en los valores de viscosidad aparente al ser sometido a diferentes velocidades de deformación ($\eta$ varía con respecto a $D$). Esto permite afirmar que la pulpa refinada de mango se comporta como un fluido no newtoniano, tal y como los resultados presentados en las investigaciones realizadas por Muñoz *et al.* (2000) y Medina *et al.* (2001), al analizar pulpas de fruta de consistencia similar.

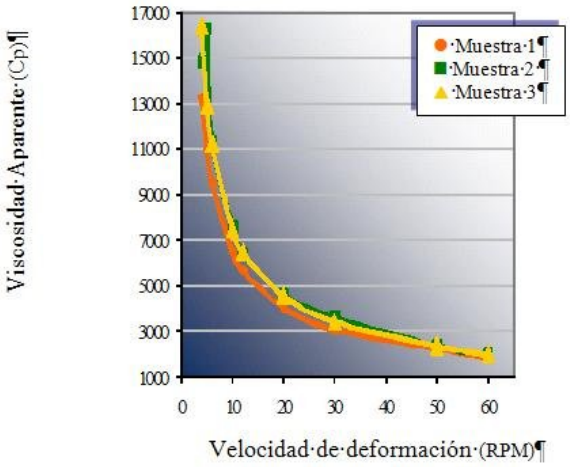


**Figura 1.** Curva de fluidez de las muestras, en donde se aprecia los valores de viscosidad aparente a diferentes velocidades de deformación

*Nota:* los valores de viscosidad presentados, representa el promedio obtenido de las muestras procesadas (ya que cada una de ellas fue evaluada por triplicado), las muestras presentadas poseían una concentración de sólidos solubles igual a 18%.

En segundo lugar, puede distinguirse un descenso de la viscosidad aparente a medida que aumenta la velocidad de deformación, definiendo de esta manera, el comportamiento pseudoplástico de la pulpa refinada de mango; lo que permite inferir que la viscosidad aparente depende de la velocidad de deformación por cizalladura, pero no del tiempo durante el cual están sometidos a la tensión cizallante. Ambos fenómenos fueron experimentados por las 3 muestras (representadas en el gráfico con las líneas naranja, amarillo y verde), y como puede apreciarse, con valores de viscosidad muy similares.
Usualmente los homogeneizados de las pulpas de frutas exhiben este comportamiento, y en muchos casos puede atribuirse a la presencia de sustancias de alto peso molecular en solución y/o a las sólidos dispersos en la fase líquida, tal y como lo señala Fellows (1994).
Las líneas de tendencia representadas en la **Figura 2**, describen el espesamiento dependiente del tiempo experimentado por las muestras (la viscosidad aparente de las muestras en estudio aumenta a medida que pasa el tiempo), por lo que la pulpa refinada de mango, al igual que los resultados obtenidos por Medina *et al.* 2001 durante la caracterización de pulpa de guayaba, puede caracterizarse como un fluido reopéctico.

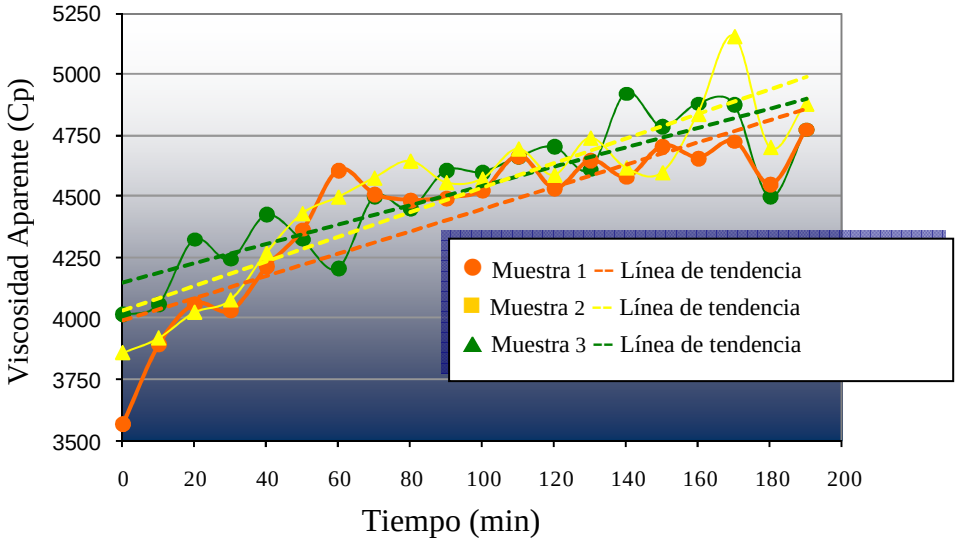


**Figura 2**. Curva de fluidez de las muestras, en donde se indican los valores promedio de viscosidad aparente realizadas a un intervalo fijo de tiempo.
*Nota:* los valores de viscosidad presentados, representa el promedio obtenido de las muestras procesadas (ya que cada una de ellas fue evaluada por triplicado), las muestras presentadas poseían una concentración de sólidos solubles igual a 18%.

## Medición de la viscosidad aparente con variación de la velocidad de deformación en muestras de pulpa refinada de mango liofilizadas y reconstituidas.

Una vez aplicado el tratamiento así como la reconstitución de las muestras se determinó la viscosidad aparente de las mismas en función a la velocidad de deformación. Cabe destacar la división de fases experimentado por las muestras al transcurrir el tiempo, visualizando pulpas de consistencia heterogénea; dichos resultados se asemejan a los obtenidos por Viñas (1977), quien estudió la reconstitución de mezclas a base de cromógenos de fresa y pulpa de uva.
En la **Figura 3**, se destaca la variación de la viscosidad aparente de las muestras al ser sometidas a diferentes velocidades de deformación. Asimismo, se puede corroborar el patrón reológico del fluido en estudio, pulpa refinada de mango liofilizada y reconstituida, el cual permanece describiendo un comportamiento de un fluido no newtoniano, de tipo pseudoplástico, tal y como los resultados descritos por Viñas 1977, en su estudio de pulpa de fresa y uva liofilizada.

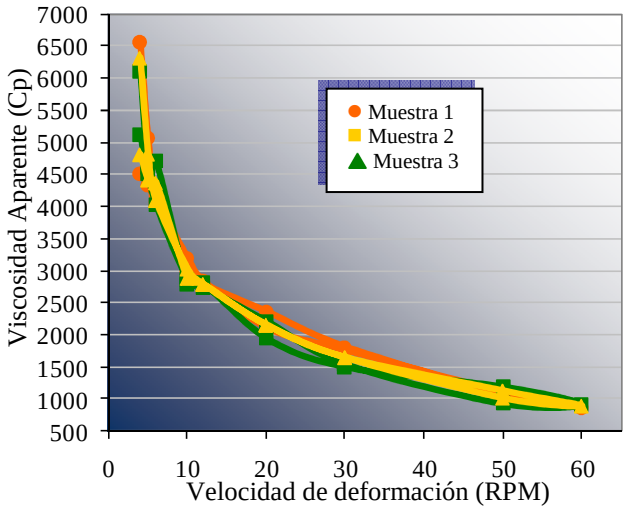


**Figura 3**. Curva de fluidez de las muestras, en donde se aprecia los valores de viscosidad aparente a diferentes velocidades de deformación.
*Nota:* los valores de viscosidad presentados, representa el promedio obtenido de las muestras procesadas (ya que cada una de ellas fue evaluada por triplicado), las muestras presentadas poseían una concentración de sólidos solubles igual a 18%.

## Medición de la viscosidad aparente en el tiempo empleando una velocidad de deformación fija en muestras de pulpa refinada de mango liofilizadas y reconstituidas.

Como se muestra en la **Figura 4**, las muestras tratadas (liofilizadas y reconstituidas) presentan un patrón de viscosidad aparente variable en el tiempo, ya que los valores de viscosidad registrados en el transcurso del tiempo no tienen una tendencia clara. Observando las líneas de tendencia de las muestras, se aprecia una inclinación de estas líneas orientadas hacia abajo en los primeros 100 min, lo que evidencia una disminución de los valores de viscosidad aparente, trascurrido dicho tiempo el valor de viscosidad aparente tiende a mantenerse relativamente constante. En este caso, no se puede asegurar que el fluido en estudio (pulpa refinada de mango liofilizada y reconstituida) presenta un comportamiento de un fluido tixotrópico, dado la variabilidad de los valores de viscosidad registrados, es por ello que se debe considerar la realización de un nuevo ensayo, en el cual se estudie a fondo el comportamiento de la viscosidad de la pulpa refinada de mango en el tiempo.

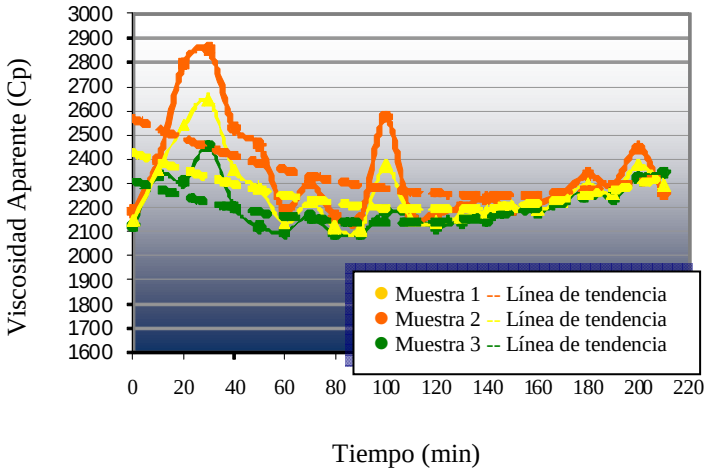


**Figura 4**. Curva de fluidez de las muestras, en donde se indican los valores promedio de viscosidad aparente realizadas a un intervalo fijo de tiempo.
*Nota:* los valores de viscosidad presentados, representa el promedio obtenido de las muestras procesadas (ya que cada una de ellas fue evaluada por triplicado), las muestras presentadas poseían una concentración de sólidos solubles igual a 18%.

**Comparación del comportamiento reológico de las muestras de pulpa de mango refinada antes y después del tratamiento.**

Para comparar el comportamiento reológico de las muestras de pulpa refinada de mango antes y después del tratamiento se construyeron los gráficos mostrados en la **Figuras 5** y **6**.

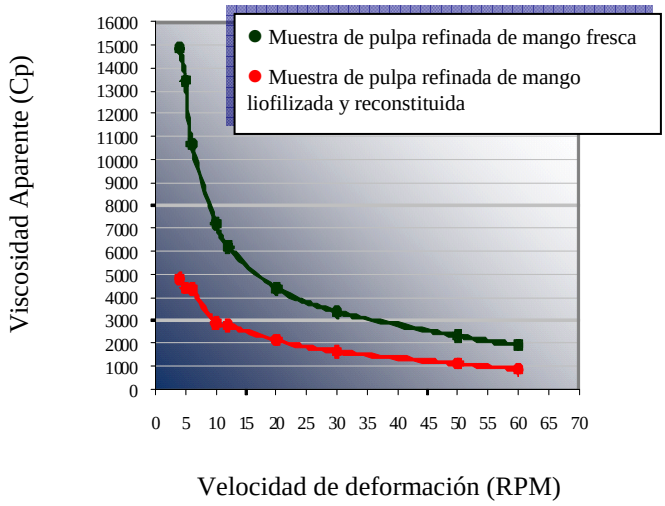


**Figura 5.** Comparación de las viscosidades aparentes a diferentes velocidades de deformación antes y después del tratamiento.

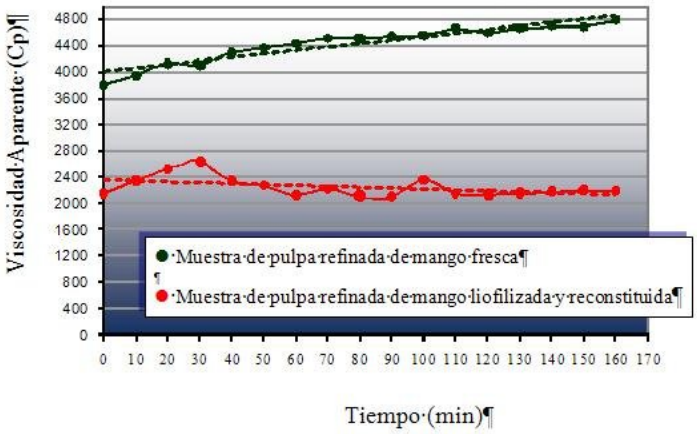


**Figura 6.** Comparación de las viscosidades aparentes a velocidad de deformación constante y a un intervalo fijo de tiempo antes y después del tratamiento.

En ambos gráficos puede apreciarse un marcado descenso de la viscosidad aparente experimentado por las muestras de pulpa refinada de mango liofilizadas y reconstituidas al cotejarlas con muestras frescas (no tratadas), hecho que evidencia el efecto del tratamiento sobre la estructura de las muestras.

**Medición de la viscosidad aparente en muestras de pulpa de mango antes y después del tratamiento a diferentes concentraciones.**

En base a los valores de viscosidad aparente obtenidos de cada una de las muestras a diferentes concentraciones antes y después del tratamiento se construyó la **Figura 7**. Dicho gráfico, presenta la variación de viscosidad aparente experimentado por las muestras a diferentes concentraciones luego de ser aplicado el tratamiento (liofilización y reconstitución), las líneas de tendencia en el grafico nos permiten visualizar el aumento de la viscosidad aparente a medida que aumenta la concentración de las muestras, por lo que se puede inferir que el efecto del tratamiento se acentúa a mayor concentración de sólidos solubles en las muestras de pulpa de mango liofilizadas y reconstituidas.

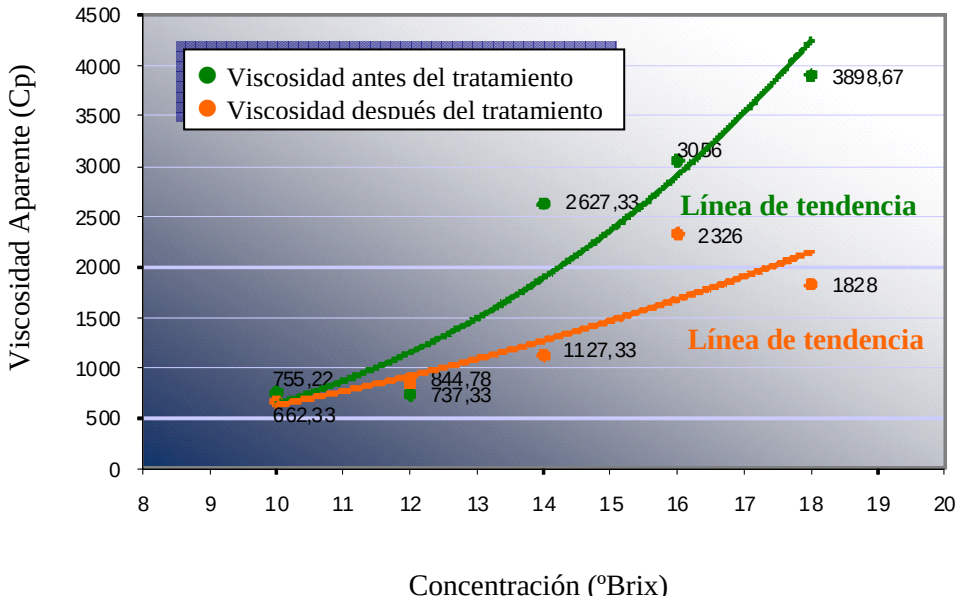


**Figura 7**. Valores de viscosidad aparente a diferentes concentraciones antes y después del tratamiento.

### Análisis estadístico de las muestras de pulpa refinada de mango a 10, 12, 14, 16 y 18 ºBrix

Los resultados arrojados por el programa para cada una de las muestras a diferentes concentraciones (analizadas de forma individual) presentan un P-valor de la F-test inferior a 0,001; lo que permite afirmar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los valores de viscosidad aparente de pulpa refinada de mango antes y después de liofilizar y reconstituir a 10, 12, 14, 16 y 18 ºBrix, con un nivel de confianza del 95%.

### Análisis estadístico de las muestras de pulpa refinada de mango a diferentes concentraciones antes y después del tratamiento

Los P-valores arrojados por el paquete estadístico prueban la significación estadística de cada uno de los factores, ya que los 2 P-valores son inferiores a 0,001; por lo que puede afirmarse que ambos efectos (tanto el tratamiento, como la concentración) tienen un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 99,0%.

## CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento reológico de la pulpa refinada de mango fresca y liofilizada, se derivan las siguientes conclusiones:

La viscosidad aparente de la pulpa de mango depende de la velocidad de corte, por lo tanto es un fluido no newtoniano; y disminuye con el aumento en la velocidad de rotación, por lo cual, la pulpa refinada de mango se clasifica como un fluido no newtoniano con características pseudoplásticas. Asimismo, al analizar los valores de viscosidad aparente en el tiempo, la pulpa refinada de mango se comporta como un fluido reopéctico.

Las muestras de pulpa refinada de mango sometidas a una deshidratación por liofilización y una posterior reconstitución de la humedad removida pueden caracterizarse reológicamente como un fluido pseudoplastico. Al representar sus valores de viscosidad aparente a una velocidad de deformación fija a intervalos de tiempo, no se aprecia el espesamiento característico, como el experimentado por la pulpa refinada de mango sin tratamiento.

Del efecto de la liofilización sobre la viscosidad aparente en pulpa refinada de mango se puede concluir:

La deshidratación por liofilización generó un descenso en el valor de su viscosidad aparente. Este efecto se acentúa cuanto mayor es la concentración de sólidos solubles de la pulpa.

El análisis estadístico aplicado reafirma los resultados gráficos obtenidos, por lo que se puede aseverar, con un porcentaje de confiabilidad de 95%, que se presentaron diferencias estadísticamente

significativas en los valores de viscosidad aparente en pulpa refinada de mango antes y después de ser sometida a un proceso de deshidratación por liofilización bajo diferentes concentraciones 10, 12, 14, 16 y 18º Brix. Asimismo, el análisis de varianza realizado permitió afirmar que ambos efectos (tratamiento y concentración) tienen un efecto estadísticamente significativo con un nivel de confianza igualmente del 95%.

Finalmente, en base a los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados, se puede afirmar que el proceso de deshidratación por liofilización genera una modificación en la estructura de la pulpa refinada de mango lo que ocasiona dificultad para su reconstitución, al ser llevadas nuevamente a su concentración original. Este hecho fue constatado al evidenciar una significativa reducción en los valores de viscosidad aparente registrados por las pulpas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS


Comisión Venezolana de Normas Industriales. (1978). Norma Nº 21818. Determinación de viscosidad. FONDONORMA, Caracas, Venezuela.

Fellows P. (1994). Tecnología del procesado de los alimentos, principios y prácticas. 2da ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A. Pag 162

Rotstein E, Lozano J, Urbicain, M. (1983*). Shrinkage, porosity and bulk density of foodstuffs at changing moisture content*. Journal of Food Science, New York and London, v. 48, n. 5, p. 1497-1502.

Medina MY, Pagano F. (2001) *Caracterización de la pulpa de guayaba (Psidium guajava L.) tipo "Criolla Roja"*. Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV); Volumen 20 Número 1. Caracas, Venezuela.

Ramos AY, Ibarz A. (2006). *Comportamiento viscoelástico de pulpa de membrillo en función de la concentración de sólidos solubles*. Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas, V. 26, Nº1. [Documento en línea]. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-206120060001000 34&lng=es&nrm=iso>. [Consulta: 19 Febrero 2008].

Viñas A. (1977). *Estudio del proceso de liofilización de distintas mezclas de cromógenos en especial el de fresa con zumo de uva y la influencia de las pectinas en el comportamiento reológico de las mezclas y de la liofilización*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid.

Zambrano M, Rodríguez DY, Álvarez A. (2006). *Estudio cinético y de superficie de respuesta para la rehidratación de zanahorias* (*Daucus carota*) *liofilizadas*. Revista Información Tecnológica, Volumen 18, Número 4-2007. México. [Revista en línea]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.ph ?script=scipdf&pid=S0718-07642007000400008&lng=es&nrm=iso&tlng [Consulta: 2008, Enero 10].

# Coeficientes de difusión efectivos durante el secado con aire caliente de rosa mosqueta pretratada y sin pretratar

# Effective diffusion coefficients during air drying of rose hip whit and without pretreatment

Mabellini A (1), Ohaco E (1), Márquez CA (1), De Michelis A (2), Lozano JE (3)

[1] AUVR-Facultad Ingeniería-UNCo. alejandra_mabellini@hotmail.com
[2] CONICET-INTA-AER-El Bolsón. ademichelis@bariloche.inta.gov.ar
[3] PLAPIQUI. (Planta Piloto de Ingeniería Química). Camino "La Carrindanga", Km 7, C.C. 717 (8000) Bahía Blanca, Argentina. jlozano@plapiqui.edu.ar

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar los coeficientes de difusión efectivos (Deff), durante el secado con aire caliente de frutos pretratados de la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria L*), adoptando modelos simples y utilizándolos con radio de partícula variable ya que estos frutos cambian significativamente su tamaño a medida que se deshidratan. Los modelos utilizados fueron, el de Becker y la solución analítica (segunda ley de Fick). Los tratamientos previos al secado de estos frutos disminuyen significativamente los tiempos de deshidratación según se observó en un trabajo anterior. Dicha disminución, como es lógico, modifica los coeficientes de difusión efectivos (Deff). Se utilizaron frutos frescos, mantenidos a 2 ºC y 90% de humedad hasta su uso. Los pretratamientos usados fueron: soluciones de NaOH y oleato de etilo con $K_2CO_3$, cortes poco profundos de la cutícula, longitudinales con bisturí, de los frutos y pinchaduras ecuatoriales equidistantes, con punzón de 1,11 mm en su superficie. El secado de las muestras con y sin pretratamiento se efectuó en un equipo experimental con aire a 70 ºC, 5 m/s y 5% de humedad relativa. La humedad de las muestras se obtuvo mediante pesada discontinua y los cambios de volumen del fruto parcialmente deshidratado mediante medidas picnométricas y geométricas (ejes principales de los frutos). Con las geométricas se calculó el volumen de las partículas utilizando la ecuación de un paraboloide de revolución. Con los cambios de volumen se calculó el radio de partícula variable utilizado en los modelos de Becker y la solución analítica para estimar el *Deff*, maximizando $R^2$ y minimizando el error % promedio. Como los tiempos de secado en repeticiones de cada pretratamiento no diferían estadísticamente entre sí, se estimaron los *Deff* con las curvas promedio. Los *Deff* obtenidos, con un E% promedio < $10^{-5}$ y un $R^2 \geq 0{,}976$, para modelo de Becker y solución analítica respectivamente fueron: fruta sin tratamiento 1,076 y 1,086 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$; pretratada con solución de NaOH 2,417 y 2,440 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$; pretratada con solución de oleato de etilo 3,840 y 3,865 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$; pretratada con cortes longitudinales 4,580 y 4,013 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$; pretratadas con pinchaduras 4,090 y 4,013 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$. Los *Deff* aumentan con los distintos pretratamientos, siendo mayores y muy próximos entre sí en los pretratamientos con oleato de etilo y los mecánicos, siendo los más altos los de las frutas tratadas mecánicamente que aumenta alrededor de 4 veces comparado con las muestras sin tratar. El pretratamiento menos efectivo es el de NaOH. Los coeficientes obtenidos con el modelo de Becker y con la solución analítica prácticamente no difieren entre sí y tampoco su correlación con los datos experimentales. De acuerdo a los resultados, los pretratamientos que más se adaptan al problema de estos frutos son los mecánicos.

## ABSTRACT

The aim of this work was to determine the effective diffusion coefficient ($D_{eff}$), during the air drying of rosehip (Rosa eglanteria L) fruits pretreated adopting simple models and using them it with variable particle radius as these fruits are changing significantly in size as they dehydrate. The used models were, of Becker and the analytical solution (Fick`s second law). Pre-drying treatments of these fruits decreased significantly the time of dehydration since it was observed in previous work. This fall, of course, modifies the effective diffusion coefficient ($D_{eff}$). Fresh fruits were used, maintained at 2 º C and 90% humidity until use. The pretreatments used were: NaOH solution and ethyl oleate with $K_2CO_3$, slightly deep cuts, longitudinal of cuticle, with bistoury, of fruits and equatorial equidistant punctures, with punch 1.11 mm on the surface of them. Drying of the samples with and without

pretreatment was conducted in an experimental equipment with air at 70 º C, 5 m / s and 5% relative humidity. The moisture content of samples was obtained by discontinuous weighing and volume changes of partially dehydrated fruit by means of geometric (main axes of the fruit) and pycnometric measures. With the geometric measures the volume of the particle was calculated using equation of paraboloids of revolution. With the changes in volume are estimated particle radius variable used in the Becker models and the analytical solution to estimate $D_{eff}$, maximizing $R^2$ and minimizing the average error %. As drying times of repetitions of each pre-treatment did not differ statistically among themselves, were estimated $D_{eff}$ with the average curves. The $D_{eff}$ obtained, with an average E% $<10^{-5}$ and $R^2 \geq 0{,}976$, to Becker's model and analytical solution respectively were: untreated fruit 1,076 and 1,086 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$, pretreated with NaOH solution 2,417 and 2,440 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$, pretreated with ethyl oleate solution 3,840 and 3,865 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$, pretreated with longitudinal cuts 4,580 and 4,013 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$, pretreated with punctures 4,090 and 4,013 $x10^{-10}$ $m^2$ $s^{-1}$.
The $D_{eff}$ increase with the different pre-treatment, being older and very close together in the pre-treatment with ethyl oleate and mechanics. The $D_{eff}$ of the mechanically treated fruit increased about 4 times compared with untreated samples. Pre-treatment less effective was NaOH. The coefficients obtained with the Becker´s and the analytical solution models practically do not differ, nor their correlation with the experimental data. According to the results the most suitable pre-treatments were the mechanics.

**PALABRAS CLAVE**: *secado-pretratamientos-coeficientes de difusión efectivos.*

**KEYWORDS**: *Drying- pretreatments- effective diffusion coefficient.*

## INTRODUCCIÓN

El secado es la operación que más se utiliza para conservar productos alimenticios, ya que con ella se reduce el contenido de agua, inhibiendo el desarrollo de microorganismos y una serie de reacciones de degradación típicas de los productos con actividad de agua elevada, además reduce también el volumen y peso de dichos productos con la consiguiente reducción de costos en transporte y almacenamiento. Por otro lado, el aprovechamiento de los frutos de la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria L*) es una actividad comercial en crecimiento durante los últimos años en la Comarca Andina del Paralelo 42. El mayor aprovechamiento hasta ahora se encuentra en el procesamiento de los frutos para obtener cascarilla deshidratada, con alta demanda tanto nacional como internacional (Vullioud *et al*. 2007).

La deshidratación con aire caliente de alimentos, tanto de origen vegetal como animal, requiere un estudio minucioso de las condiciones de operación, teniendo en cuenta las características deseadas en el producto final. Hoy en día, el secado de frutas y vegetales debe ser rápido y a temperaturas relativamente bajas para minimizar el consumo de energía y la degradación térmica de sus componentes nutricionales y otros atributos de calidad. Una de las principales causas de pérdida de calidad de los frutos de rosa mosqueta deshidratados, son los prolongados tiempos de secado, de 10 a 20 horas en escala industrial y mayor a 12 horas en equipo experimental. Estos frutos comparten una característica única con cerezas, guindas, ciruelas y uvas, que es su cutícula exterior muy impermeable. Esta capa externa ofrece ventajas como la protección a la fruta de factores ambientales y externos (George *et al*. 2004). Generalmente, esta pared es la que controla el flujo de humedad desde el interior del fruto hacia la superficie, proceso crucial durante el secado (Doymaz 2005).

Varios autores proponen la implementación de diferentes tipos de pretratamientos, tanto físicos como químicos, sobre la piel de los frutos con el objetivo de remover la cutícula, para mejorar la difusión de humedad y así disminuir los tiempos de proceso (Femenia *et al*. 1998, Gambella *et al*. 2000, Erenturk *et al*. 2004, Doymaz 2005, Tarhan 2006).

Los tratamientos químicos consisten en la inmersión de los frutos en soluciones, a diferentes temperaturas por determinado tiempo, que normalmente producen una ruptura de la cutícula de las frutas creando poros microscópicos que facilitan la permeabilidad a la humedad. Las emulsiones de esteres de ácidos grasos han sido utilizadas por mucho tiempo como pretratamiento antes del secado (Petrucci *et al*. 1973). Di Mateo *et al*. (2000) informaron que como resultado de la inmersión de uvas en una solución alcalina de oleato de etilo se produce la solubilización de la cera formándose un número de microporos en la cutícula acompañado de una redistribución no uniforme de componentes

de la cera sobre la superficie del fruto. Soluciones de NaOH o KOH también suelen utilizarse para el tratamiento previo al secado de uvas y aceitunas.
Los tratamientos físicos se basan en producir algún tipo de daño mecánico sobre la piel de los frutos, que como es lógico, produce rupturas en la capa impermeable facilitando la llegada de la humedad hasta la superficie del fruto. Los procesos de abrasión de la piel son los pretratamientos físicos mas reportados en la bibliografía, y existe muy poca información sobre cortes superficiales y perforaciones poco profundas con agujas de pequeño diámetro.
Para todos los tratamientos previos al secado de frutas se han informado disminuciones de los tiempos de secado que oscilan entre 20 y 40%.
La mayor parte de la deshidratación de alimentos sólidos tiene lugar en el periodo de velocidad decreciente de secado. Durante este periodo, la velocidad de secado normalmente es gobernada por factores que afectan el movimiento de humedad dentro del alimento. Se han propuesto numerosos modelos matemáticos para representar el secado en el periodo de velocidad decreciente. Algunos son empíricos y se han desarrollado mediante regresión de los datos experimentales. Otros se basan en la hipótesis de que prevalece un mecanismo particular de movimiento de humedad dentro del solido. La más conocida de estas hipótesis es la basada en la suposición de que la humedad migra dentro del sólido por difusión como resultado de una diferencia de concentraciones entre la superficie y el centro del sólido. Se supone que se cumple la segunda ley de Fick de la difusión para este movimiento. Muchas de las soluciones propuestas para esta ley asumen que el valor de la difusividad del líquido es constante durante todo el periodo de velocidad decreciente. Varios autores han sugerido que dicha suposición no es totalmente valida, ya que la difusividad es afectada por el encogimiento que sufren algunos productos sólidos durante el secado, entre otras cosas (Brenan *et al*. 2006).
En un trabajo anterior se observó que los tratamientos previos al secado en frutos de la rosa mosqueta disminuyen significativamente los tiempos de secado y además sufren una considerable reducción de tamaño durante el proceso de deshidratación. Estos dos factores, como es de esperar, modifican los coeficientes de difusión efectivos (*Deff*).
El objetivo de este trabajo fue determinar *Deff*, adoptando modelos simples y utilizándolos con radio de partícula variable, para frutos de la rosa mosqueta con y sin pretratamientos previos al secado con aire caliente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

Se utilizaron frutos frescos de la rosa mosqueta, con un contenido humedad en base seca de 1,07, cosechados en la zona de El Bolsón-Rio Negro- Argentina. La fruta se conservó a 2 ºC y 90% de humedad hasta su uso.

### Pretratamientos

Para este trabajo se realizaron sobre los frutos dos tipos de tratamientos, físicos y químicos, previos al secado, con el objetivo de reducir los tiempos de proceso. Los frutos fueron seleccionados con el fin de uniformar tamaño y color. Una vez hecho esto, la muestra se dividió en 9 grupos, cada uno de ellos fue sometido a uno de los siguientes tratamientos: grupo 1, inmersión en solución acuosa de NaOH con concentración del 1% a temperatura de ebullición por 1,5 minutos. Grupo 2, inmersión en solución acuosa de NaOH con concentración del 1,5% a temperatura de ebullición por 1,5 minutos. Grupo 3, inmersión en solución de oleato de etilo al 2% en solución de carbonato de potasio al 2,5% a una temperatura de 70 ºC por 2 minutos. Grupos 4 y 5, cortes de la cutícula, superficiales, longitudinales, realizados con bisturí de forma equidistante. El grupo 4 recibió 4 cortes y el 5 recibió 6 cortes. Grupos 6, 7 y 8, perforaciones poco profundas realizadas manualmente con punzón metálico de 1,11 mm de diámetro, en forma ecuatorial y en puntos equidistantes del fruto. El grupo 6 recibió 3 perforaciones, el grupo 7, 6 perforaciones y el grupo 8, 12 perforaciones. El grupo 9 no recibió ningún tipo de tratamiento y se utilizo como control. En la **Tabla 1** se muestra la lista de los pretratamientos.

**Tabla 1**. Diferentes pretratamientos realizados sobre los frutos de rosa mosqueta antes de su deshidratación con aire caliente.

| Grupo | Tratamiento |
|---|---|
| Grupo 1 | Inmersión en sol. de NaOH 1%, temperatura de ebullición, por 1,5 min. |
| Grupo 2 | Inmersión en sol. de NaOH 1,5%, temperatura de ebullición por 1,5 min. |
| Grupo 3 | Inmersión en sol. alcalina de oleato de etilo al 2%, a 70ºC por 2 min. |
| Grupo 4 | 4 cortes en la cutícula, longitudinales, superficiales y equidistantes. |
| Grupo 5 | 6 cortes en la cutícula, superficiales, longitudinales y equidistantes. |
| Grupo 6 | 3 perforaciones en la cutícula, superficiales, ecuatoriales y equidistantes. |
| Grupo 7 | 6 perforaciones en la cutícula, superficiales, ecuatoriales y equidistantes. |
| Grupo 8 | 12 perforaciones en la cutícula, superficiales, ecuatoriales y equidistantes. |
| Grupo 9 | Control, sin tratamiento. |

## Equipo de secado

Los frutos enteros (con y sin pretratamiento previo) se deshidrataron en un secadero piloto, con flujo de aire forzado transversal, previamente desarrollado (Ochoa et al. 2002), que permite regular las variables operativas, cuyo esquema se presenta en la **Figura 1**. Tanto la temperatura como la velocidad y contenido de humedad del aire se midieron a la entrada de la cámara de secado. La temperatura se midió con termocuplas de cobre-constantan. La velocidad se midió con un anemómetro Mini Vane CFM Termo Anemometers EXTECH Instruments, mientras que el contenido de humedad se midió con un hidrómetro Hygo Palm de Rotonic Instruments. Para este trabajo, las experiencias se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones operativas:

- Temperatura de aire = 70 ºC
- Velocidad de aire = 5 m $s^{-1}$
- Humedad relativa de aire = 5%

Tanto las muestras pretratadas como el control, fueron colocadas en la bandeja con fondo perforado de la cámara de secado (diámetro 22,5 cm, altura 10 cm), formando una sola capa de frutos monocapa uniformemente distribuida.

Las pérdidas de peso de los frutos parcialmente deshidratados se obtuvieron por pesada discontinua con una balanza analítica digital (± 0,001g), el proceso de secado se continúo hasta peso constante.

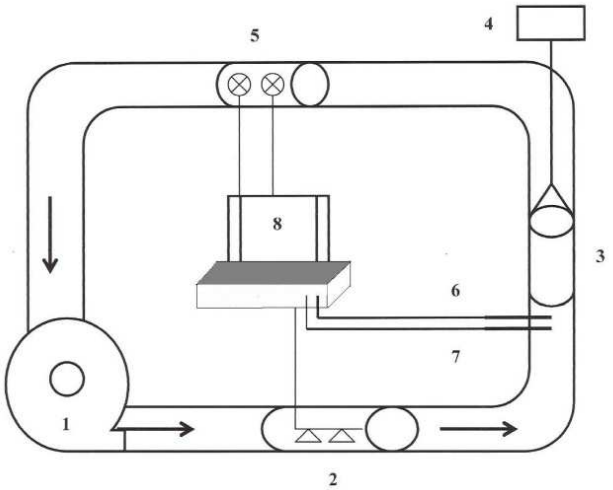


**Figura 1**. Esquema del equipo experimental de secado. 1: Ventilador; 2: estación de humectación del aire; 3: cámara de secado; 4: balanza; 5: calefactor eléctrico de aire; 6: sensor de temperatura de bulbo seco de aire; 7: sensor de humedad relativa de aire; y 8: controlador automático de la temperatura del aire de secado.

## Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos en las diferentes experiencias de secado fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA simple con un $\alpha$=0,05 para determinar la existencia de diferencias significativas dentro de cada tipo de pretratamiento.

## Modelos para estimación del coeficiente de difusividad efectiva (Deff)

En este trabajo se aplicaron dos modelos para la estimación de los *Deff*, la solución analítica de la segunda ley de Fick y el modelo propuesto por Becker.

Si se asume que la difusividad efectiva de la humedad es constante, la solución analítica de la segunda ley de Fick para geometrías esféricas propuesta por Crank en 1975 (Márquez 2003) es de la siguiente forma:

$$X^* = \frac{X - X_e}{X_O - X_e} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{n=\infty} \frac{1}{n^2} Exp\left[-n^2\pi^2\left(\frac{D_{eff}t}{R^2}\right)\right]$$

donde $X^*$ es la humedad adimensional de la muestra, $X$ es el contenido de humedad a un tiempo determinado (kg agua/kg sólido seco), $X_0$ es el contenido de humedad inicial (kg agua/kg sólido seco) y $X_e$ es el contenido de humedad de equilibrio de la muestra (kg agua/kg sólido seco); *Deff* es el coeficiente de difusión efectivo ($m^2\ s^{-1}$); $t$ es el tiempo (h) y $R$ es el radio variable de la partícula (m). La variación del radio de partícula se evaluó mediante la siguiente relación, evaluada experimentalmente mediante métodos picnométricos (desplazamiento de fluidos) y geométricos y por regresión en este trabajo:

$$\frac{R}{R_0} = \left(0{,}2521 + 0{,}7373\ \frac{X}{X_0}\right)^{1/3}$$

donde $R_0$ es el radio inicial del fruto (m) que se consideró como el radio de una esfera de igual volumen que la partícula. El volumen de partícula también se evaluó por medidas geométricas, midiendo los ejes principales de la partícula y calculando su volumen por medio de la ecuación de paraboloide de revolución.

El segundo modelo analizado en este trabajo fue el propuesto por Becker (1959) para esferas. La expresión matemática de este modelo es:

$$X^* = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} a_v \sqrt{D_{eff}t} + 0{,}331\ a_v^2 D_{eff}t$$

donde $a_v$ es el área por unidad de volumen de la partícula ($m^{-1}$), que lógicamente involucra el radio de la misma. Para esferas $a_v = 3/R$, siendo $R$ el radio de partícula, que se considero variable, evaluándose de igual forma que en el modelo anterior.

En ambos casos los coeficientes de difusión fueron estimados comparando las humedades adimensionales predichas por el modelo con los perfiles de humedad obtenidos de las curvas de secado experimentales, usando un procedimiento de aproximación iterativo programando las ecuaciones de los modelos en una planilla de Excel. La validez del ajuste de los modelos fue evaluada maximizando el coeficiente de correlación $R^2$ y minimizando el error por ciento promedio E%.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Características del secado de los frutos de rosa mosqueta

En experiencias previas, se determinó que los tiempos de secado para los pretratamientos correspondientes a diferente cantidad de perforaciones no difieren estadísticamente entre si. Una situación similar ocurrió con los cortes y las diferentes concentraciones de solución de NaOH, por lo que solo se trabajó con las curvas de secado promedio para los pretratamientos antes mencionados.

Las curvas de secado, contenido de humedad en base seca versus tiempo, de frutos de rosa mosqueta pretratados y sin tratar, secados manteniendo constantes las variables operativas del aire se muestran en la **Figura 2**. Como puede observarse en las curvas, el contenido de humedad decrece continuamente con el tiempo de secado. Además, en la **Figura 2**, se observa que el secado de los frutos con y sin pretratamiento ocurre exclusivamente en el periodo de velocidad decreciente. Este comportamiento lleva a considerar a la difusión como el principal mecanismo de migración de humedad en el proceso de secado de los frutos de la rosa mosqueta con y sin tratamiento previo. Por

otro lado, como se esperaba, todos los pretratamientos utilizados disminuyeron los tiempos y por ende aumentaron la velocidad del secado de los frutos de la rosa mosqueta, debido a la reducción de la resistencia al transporte de humedad a través de la capa impermeable. Los frutos que recibieron cortes en la cutícula fueron los que mostraron menor tiempo de secado, seguidos por los que fueron sumergidos en solución alcalina de oleato de etilo y el grupo que recibió perforaciones. El pretratamiento menos efectivo fue la inmersión en solución de NaOH, aunque de todas maneras el tiempo de secado de estos frutos fue menor que el de aquellos que no recibieron tratamiento. El tiempo de secado requerido para reducir la humedad desde un contenido de humedad inicial de 1,07 kg agua/kg sólido seco (b.s.) hasta la humedad deseada en el producto final, aproximadamente 0,1 (b.s.) fue de 12,5 h para las muestras sin tratar, 9 h para las muestras tratadas con solución de NaOH, 7 h para las muestras con perforaciones de la cutícula, y 6 h para las muestras tratadas con solución alcalina de oleato de etilo y cortes de la cutícula. Estos resultados muestran que los tiempos de secado de las muestras pretratadas fueron entre 28-52% más cortos que los de las muestras sin tratar.

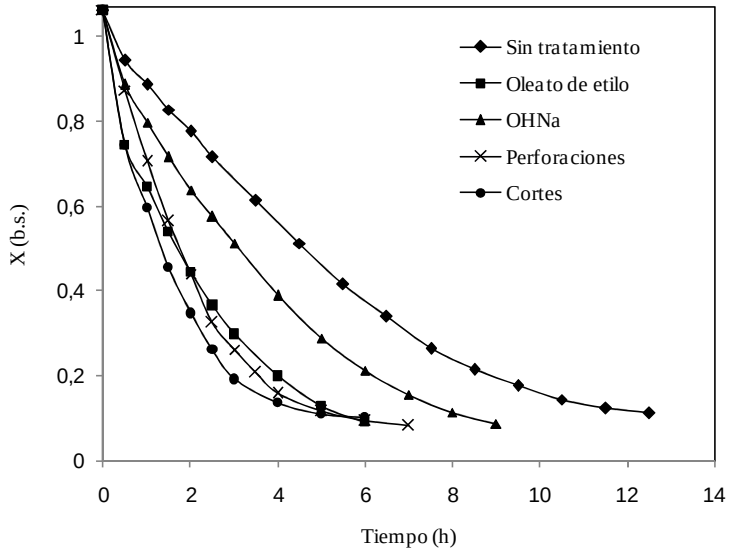


**Figura 2**. Efectos de los diferentes pretratamientos sobre los tiempos de secado de frutos de la rosa mosqueta a 70 ºC, 5% de humedad relativa y velocidad de aire 5 m $s^{-1}$.

## Calculo del coeficiente de difusividad efectiva (Deff)

En las **Figuras 3** y **4** se muestran los valores experimentales de humedad adimensional comparados con los valores estimados por los modelos de difusión (solución analítica y modelo de Becker respectivamente) para el secado de frutos de la rosa mosqueta, teniendo en cuenta el encogimiento volumétrico de la partícula, para los diferentes pretratamientos utilizados y la muestra testigo sin tratar. La correspondencia entre los valores experimentales y los estimados muestra que los dos modelos de difusión utilizados describen apropiadamente el fenómeno estudiado.

En la **Tabla 2** se muestran los $D_{eff}$ obtenidos con el modelo de Becker y la solución analítica, el coeficiente de correlación $R^2$ y el error E% promedio para cada uno de los pretratamientos. Para todos los casos el valor de $R^2$ fue mayor de 0,97 y con errores E% del orden de $10^{-5}$, por lo que ambos modelos ajustan satisfactoriamente con los datos experimentales. Los $D_{eff}$ variaron entre 1,076 x$10^{-10}$ y 4,58 x$10^{-10}$ $m^2s^{-1}$ para la estimación con el modelo de Becker y entre 1,086 x$10^{-10}$ y 4,561 x$10^{-10}$ $m^2s^{-1}$ para la solución analítica. Estos valores están comprendidos dentro los rangos reportados por varios autores para diferentes productos frutícolas. Los valores de difusividad obtenidos para los diferentes pretratamientos con los dos modelos utilizados fueron en todos los casos mayores a los obtenidos para los frutos sin tratar. Los valores mas altos $D_{eff}$ se obtuvieron para los frutos pretratados mecánicamente, seguidos por los tratamientos químicos. Los frutos con cortes superficiales y perforaciones de piel presentaron los coeficientes de difusión más altos, aproximadamente 4 veces mas que los frutos sin tratar, y muy próximos entre si. Dentro de los pretratamientos químicos la solución

alcalina de oleato de etilo fue la que mostró mayor valor de $D_{eff}$, cercano a los valores para tratamientos mecánicos, seguida de la solución de NaOH.

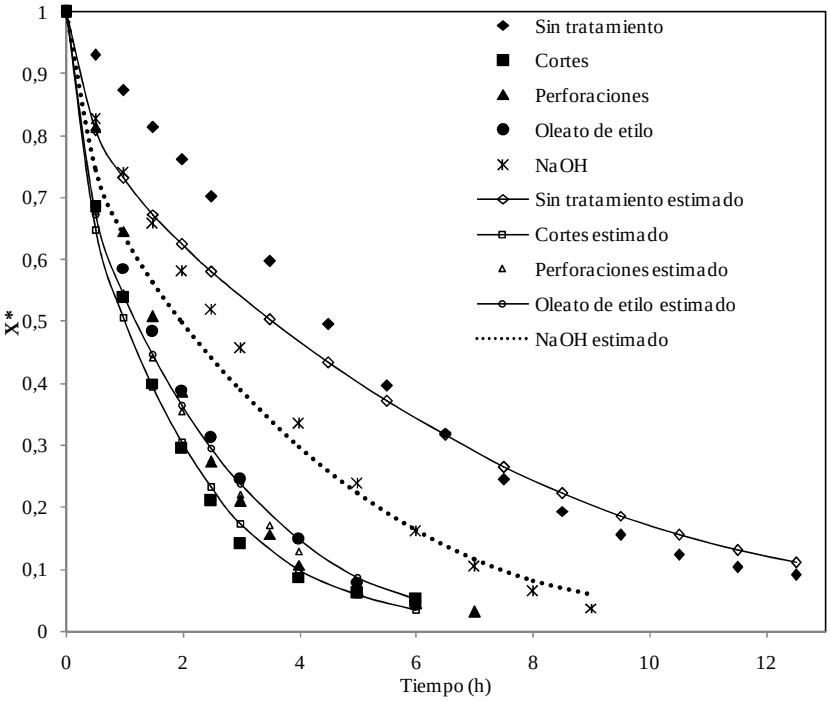


**Figura 3**. Variación de la humedad adimensional experimental y estimada con la solucion analitica para secado de frutos de la rosa mosqueta con diferentes pretratamientos a 70 ºC, 5% de humedad relativa y velocidad de aire 5 m $s^{-1}$.

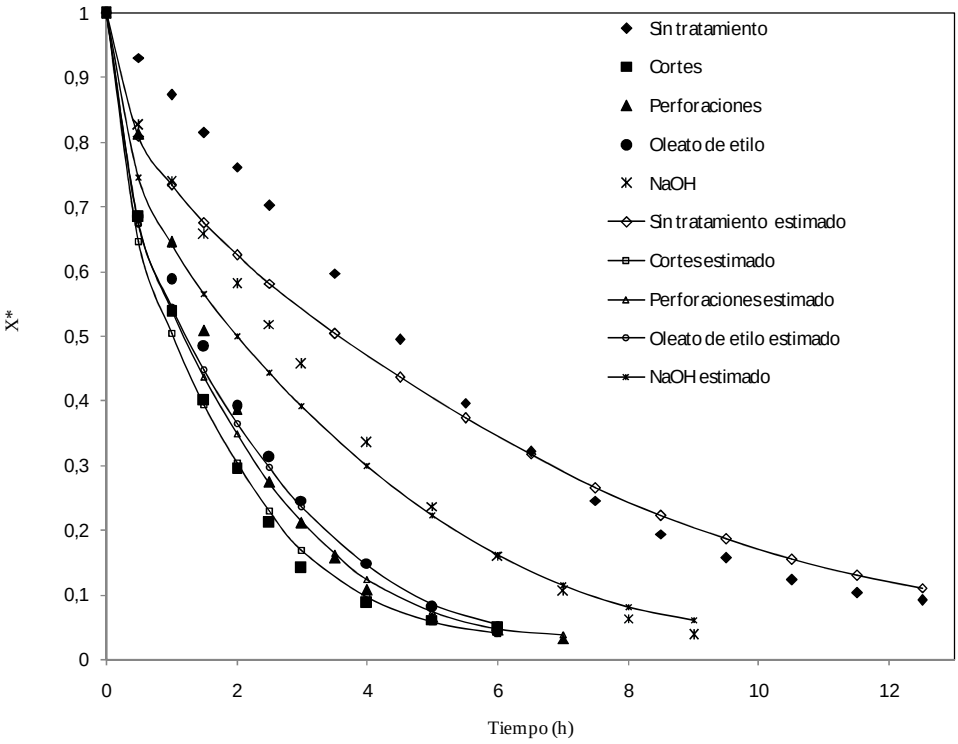


**Figura 4**. Variación de la humedad adimensional experimental y estimada con el modelo de Becker para secado de frutos de la rosa mosqueta con diferentes pretratamientos a 70 ºC, 5% de humedad relativa y velocidad de aire 5 m $s^{-1}$.

**Tabla 2.** Coeficientes de difusión efectivos, coeficiente de correlación $R^2$ y error porciento promedio E% para frutos sin tratar y pretratados por diferentes métodos.

| Tratamiento | Deff ($m^2/s$) x $10^{10}$ | | $R^2$ | | E% promedio x $10^5$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Becker | Solución Analítica | Becker | Solución Analítica | Becker | Solución Analítica |
| Sin pretratamiento | 1,076 | 1,086 | 0,976 | 0,976 | 1,8431 | 0,009367 |
| Pretratada con sol. NaOH | 2,417 | 2,440 | 0,985 | 0,985 | 1,4458 | 0,021651 |
| Pretratada con sol. oleato de etilo | 3,840 | 3,865 | 0,997 | 0,997 | 0,01804 | 0,93857 |
| Pretratada mecánicamente con cortes longitudinales | 4,580 | 4,561 | 0,986 | 0,996 | 2,5882 | 0,47092 |
| Pretratada mecánicamente con perforaciones 1 mm | 4,090 | 4,013 | 0,982 | 0,983 | 5,8951 | 0,077544 |

## CONCLUSIONES

Los $D_{eff}$ aumentan con los distintos pretratamientos, siendo mayores y muy próximos entre sí en los pretratamientos con oleato de etilo y los mecánicos. Los valores más altos fueron los de las frutas tratadas mecánicamente que aumentaron alrededor de 4 veces en relación a las muestras sin tratar. El pretratamiento menos efectivo es el de NaOH. Los coeficientes obtenidos con el modelo de Becker y con la solución analítica prácticamente no difieren entre sí y tampoco su correlación con los datos experimentales. De acuerdo a los resultados, los mejores pretratamientos son los mecánicos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Brennan JG. 2006. Evaporation and Dehydration. En: Brennan JG, editor. Food Processing Handbook. 1ª ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Pag. 71-121.

Di Matteo M, Cinquanta L, Galiero G, Crescitelli S. 2000. Effect of a novel physical pretreatment process on the drying kinetics of seedless grapes. Journal of Food Engineering, 46:83-89

Doymaz I. 2005. Influence of pretreatment solution on the drying of sour cherry. Journal of Food Engineering, Article in press.

Erenturk S, Gulaboglu MS, Gultekin S. 2004. The effects of cutting and drying medium on the vitamin C content of rosehip during drying. Jounal of Food Engineering, 68:513-518.

Femenia A, Sánchez E, Simal S, Rossell C. 1998. Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46 (1):271-276.

Gambella F, Piga A, Agabbio M, Vacca V, D`hallewin G. 2000. Effect of different pre-treatments on drying of green table olives (Ascolana tenera var.). Grasas y aceites, 51(3): 173-176.

George SD St, S. Cenkowski, W.E. Muir. 2004. A review of drying technologies for the preservation of nutritional compounds in waxy skinned fruit. Written for presentation at the 2004 North Central ASAE/CSAE Conference, Canada. Paper Nº MB04-104.

Marquéz CA. 2003. Deshidratación de frutos no tradicionales: Rosa Mosqueta (*Rose Hips*). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España .

Ochoa MR, Kesseler AG, Pirone BN, Márquez CA, De Michelis A. 2002. Volume and area shrinkage of whole sour cherry fruits (Prunus cerasus) during dehydration. Drying technology 20(1): 147-156.

Petrucci V, Canata N, Bolin H, Fuller G, Stafford A. 1973. Use of oleic acid derivatives to accelerate drying of Thompson seedless grapes. Paper presented in the Symposium “Novel Uses of Agricultural Oils” at the AOCS Spring Meeting, New Orleans.

Tarha S. 2006. Selection of chemical and thermal pretreatment combination for plum drying at low and moderate drying air temperatures. Journal of Food Engineering, 79: 255-260.

Vullioud M, Pirone B, Ochoa M, Kesseler A, Márquez CA, De Michelis A. 2007. Avances durante el secado de frutos de la Rosa Mosqueta. Revista Presencia, 51: 5-7.

# Caracterización física del laminado de soja para el diseño de un extrusor reactivo

# Physical characterization of soy flakes for a reactive extruder design

Maroto B (1, 2), Montoya P (2), Grasso F (2), Camusso C (1, 2)

(1) Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
(2) Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina
patmontoya@efn.uncor.edu

## RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo identificar el comportamiento del laminado de soja (de la industria aceitera) en ensayos de compresión uniaxial confinada, para comprender la transformación dentro de un extrusor o un *expander*, equipos normalmente utilizados en el proceso de extracción de aceite. Se estudian además los efectos que producen distintos contenidos de humedad en el laminado y distintas velocidades de compresión. Los ensayos se realizaron en una máquina de ensayos universal INSTRON. Los diagramas de compresión se obtuvieron comparando densidad de la muestra (g/cm$^3$) en función de la presión aplicada (kPa). El modelado matemático se realizó a través del planteo de Kawakita: $P/C = 1/ab+P/a$; donde P: presión aplicada; $C= (V_0-V)/V_0$: grado de reducción de volumen; *a* y *b*: constantes del modelo. Existen diversos métodos experimentales para el estudio de compactación, cada uno de los cuales presenta ventajas y limitaciones inherentes. A la vez, no existe un modelo único que describa el fenómeno de compactación para todo tipo de particulado. Se han propuesto diferentes relaciones matemáticas como el modelo de Walker o de Heckel. La aplicación de cada uno depende de las características del particulado y de las condiciones de compresión. El consenso es que el modelo de Kawakita es el más adecuado para bajas presiones de compactación y medios de alta porosidad. Este modelo ajusta al comportamiento del laminado. Los diagramas de compresión obtenidos presentan la forma característica de este tipo de ensayo. Sin embargo, el laminado con menor humedad, no llega a un valor de densidad máximo constante, por la presencia de poros que permiten un acomodamiento del material por fragmentación, el resto muestra las zonas de reordenamiento y deformación plástica hasta densidad constante. Para el caso de láminas con mayores contenidos de humedad, el agua ocupa sus poros, modifica sus estructuras y durante la compresión estas láminas se deforman desapareciendo todos los espacios vacíos, intra e interparticulares, de la masa compactada. Cuanto mayor es el contenido de humedad, el reordenamiento ocurre a menor presión (el valor 1/b expresado en kPa del modelo corresponde a la presión de fractura) y la densidad final aumenta: deformación plástica con ausencia de fragmentación. La velocidad de compresión más alta produce la mayor densificación para todos los valores de humedad.

## ABSTRACT

The aim of this work is to identify different changes on soy flakes (industrial origin) with Confined Uniaxial Compression Test in order to understand the transformation into an extruder or into an expander, usually used in the extraction oils process. Effects of moisture content into soy flakes and different velocities of compression stress are also studied. Tests were carried out in an INSTRON universal testing machine. Density (g/cm$^3$) - Stress (kPa) relationships were diagramed. The mathematic model used was the Kawakita´s statement: $P/C = 1/ab+P/a$; where P: applied stress; $C = (V_0-V)/V_0$: relative volume decrease; *a* and *b*: constants. Generally, all experimental methods have advantages and limitations, in which only one relationship does not provide an adequate description for the complete compaction process. The selection of any of the actual model is based on the particulate characteristics and the compression conditions as well. There are some models which are frequently used such as the Walker, Heckel and Kawakita ones. This last model can be considered the most suitable for the test conditions: low compaction stresses and high porous media; therefore, soy flakes changes are well described. Plots of density variation with applied stress show the typical form of the compression test. However, flakes with the smallest moisture content do not reach an “ultimate bulk density” due to the presence of interstices and fragmentation. Other samples show reorganization

and plastic deformation stages until constant density. The water fills pores into flakes, modifies their structures and during the compression test, intraparticulate and interparticulate voids disappear. When moisture content is increased, the particulate rearrangement is produced by smaller stress and a higher final bulk density is also reached (the quantity 1/b in kPa is the Kawakita fracture stress). The phenomenon observed in this last condition is plastic deformation without fragmentation.
The highest velocity of compression stress leads to the highest densification in all samples.

**PALABRAS CLAVE**: *particulado, extrusor, compresión, láminas de soja.*

**KEYWORDS**: *particulate, extruder, compression, soy flakes.*

## INTRODUCCIÓN

En la extracción de aceite de soja, se deterioran físicamente las semillas (molienda, acondicionamiento y laminación) para conseguir posteriormente mayor eficacia en la extracción del aceite con solvente.
La liberación del aceite puede aumentar por degradación enzimática de los componentes estructurales de la pared celular de las semillas, sin afectar la calidad del aceite. La transformación que reúne estas características es un ataque enzimático (Domínguez et al. 1995). Un tratamiento enzimático adaptable al proceso industrial podría realizarse mediante “extrusión reactiva” con interacción completa de la solución enzimática y el laminado de soja.
Los extrusores han sido utilizados como prensas continuas para extracción de aceites y para consolidar partículas poliméricas o metálicas, logrando una modificación física. En los últimos años, por las características tecnológicas de estos dispositivos entre las que se destacan: funcionamiento continuo y tratamiento de materiales sólidos o líquidos altamente viscosos, se han adaptado para realizar también modificaciones químicas transformándose en reactores termo-mecano-químicos dentro de los cuales se combinan varias operaciones unitarias simultaneas (Prat et al. 2002).
Los antecedentes sobre "extrusión reactiva" se encuentran en la modificación de polímeros, por ejemplo reacciones de copolimerización (Wu et al. 2007); en extracción de materias vegetales como obtención de hemicelulosa de madera (Prat et al. 2002); en reacciones orgánicas específicas como la modificación de almidón (Barron et al. 2000); llegando a procesos de extrusión reactiva enzimática (Will Chen et al. 2006).
Para diseñar un extrusor u optimizar sus condiciones de operación, es necesario identificar los fenómenos que se producen en el material y obtener un modelo adecuado para su descripción (Le Roux y Vergnes 1995).
Se debe conocer el flujo del particulado, los mecanismos de compactación (que dependen de las interacciones de contacto entre las partículas) y la formación de enlaces que dan resistencia al compacto (Salman et al. 2007).
Durante la extrusión, el material particulado es compactado, luego se transforma en una mezcla aglomerada y finalmente se obtiene una fase homogénea (Barron et al. 2001).
Las condiciones de manipulación que marcan el cambio de un estado a otro se pueden obtener a través de un ensayo de reometría, donde se identifican los cambios en la fuerza de deslizamiento en función de la fuerza axial aplicada. Así, los cambios en el coeficiente de fricción pueden mostrar el valor de presión a la cual una muestra disgregada debe ser sometida para pasar a ser una muestra homogénea. Para obtener las presiones axiales de trabajo se deben realizar preliminarmente ensayos de compresión que caractericen la compresibilidad del material y definan la presión a la cual el material pasa de un estado de reagrupamiento a un estado de deformación (Le Roux y Vergnes 1995).
Este trabajo tiene como objetivo identificar el comportamiento de laminado de soja (obtenido de la industria aceitera) sometido a ensayos de compresión. Estos estudios se aplicarán para comprender los fenómenos de transformación que se producen en un extrusor reactivo. Se estudian los efectos que producen la variación en el contenido de humedad del laminado y la variación de la velocidad de compresión sobre los fenómenos que se producen durante el ensayo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

Se utilizó laminado de soja de producción industrial (ACEITERA BUNGE S. A. Tancacha- Córdoba).

## Análisis químico

Se determinó el contenido de humedad del laminado de soja (% m/m) por técnica de secado Carter-Simon (Pearson 1993).

**Ensayo de compresión uniaxial confinada**

Se utilizó una celda cilíndrica de acero inoxidable de 62,39 mm de diámetro interno y 24,05 mm de altura. Se cargó la celda con cada muestra y se registró el peso.

Los ensayos se realizaron aplicando la carga a través de una platina sobre la superficie superior libre de la muestra, en una máquina universal de ensayo INSTRON – modelo 4486 con capacidad máxima de 300 kN, equipada con celda de carga de 50 kN a temperatura ambiente.

Se registraron los valores de desplazamiento en función de carga aplicada hasta un valor máximo (teniendo en cuenta una variación de desplazamiento no significativa).

Los diagramas de compresión correspondientes a cada muestra se obtuvieron comparando densidad de la muestra ($g/cm^3$) en función de fuerza aplicada (kPa).

**Diseño Experimental**

Considerando las variables a estudiar, se realizó un diseño bifactorial: (A) velocidad de carga aplicada (mm/s) con dos niveles y (B) humedad (% m/m) con cuatro niveles. El primer valor de humedad fue el contenido en el laminado (6,37%), el resto de los valores de humedad (20%, 30%, 40%) y los valores de velocidades (1 mm/s, 4 mm/s) se tomaron teniendo en cuenta datos bibliográficos (Le Roux y Vergnes 1995, Sánchez Girón et al.1998, Levy y Kalman 2001).

El contenido de humedad se ajustó por sprayado uniforme de agua destilada al laminado, antes de realizar la compresión.

**Modelado**

El modelado matemático se realizó a través del planteo de Kawakita: $P/C = 1/ab + P/a$; *d*onde P: fuerza aplicada; $C = (V_0 - V)/V_0$: grado de reducción de volumen; *a* y *b*: constantes del modelo.

## Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron por triplicado y se obtuvieron valores promedio de densidad en función de fuerza aplicada. La validación del modelo utilizado se realizó por análisis del coeficiente de correlación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando se grafica la densidad como función de la presión de compactación, la curva muestra dos regiones distintivas: a bajas presiones ocurre un reagrupamiento o reordenamiento de partículas y la segunda porción corresponde a las modificaciones en la densidad por remoción de poros interaglomerados o deformación (Salman et al. 2007).

La **Figura 1** y la **Figura 2** muestran el comportamiento del laminado para los distintos grados de humedad a velocidades de compresión de 1 mm/s y 4 mm/s respectivamente.

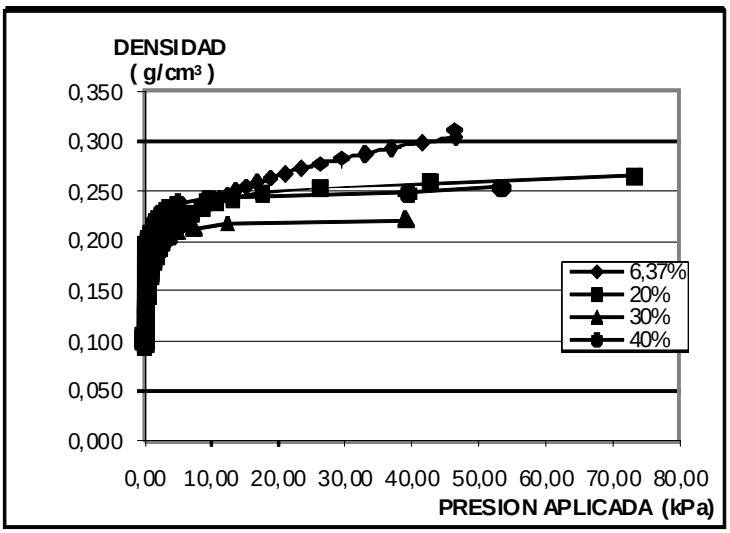


**Figura 1**. Diagramas de compresión a velocidad 1 mm/s.

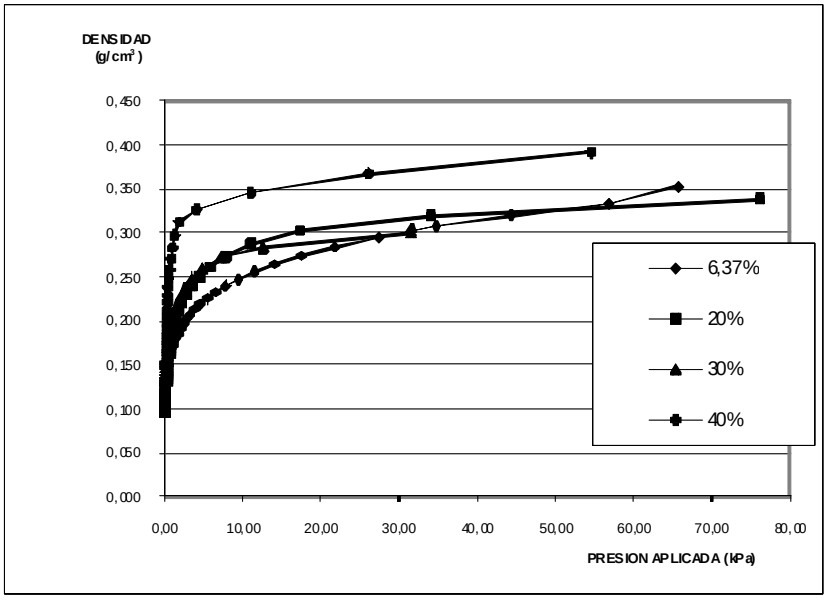


**Figura 2**. Diagramas de compresión a velocidad 4 mm/s.

El laminado sin ajuste de humedad sufrió un aumento de densidad con el aumento de la presión aplicada, sin llegar a un valor máximo constante. Este comportamiento se debió probablemente a la presencia de poros que permitieron un acomodamiento permanente del material por fragmentación a las presiones ensayadas. En las muestras con mayor contenido de agua y a las dos velocidades ensayadas, se observaron las zonas de reordenamiento y deformación. Cuanto mayor fue el contenido de humedad, la zona de reordenamiento se dio a menor presión. Esto se produce porque el agua ocupa los poros de las láminas modificando las condiciones del material y con el aumento de la presión hay deformación plástica en lugar de fragmentación desapareciendo también los poros intergranulares (Yan y Barbosa-Cánovas 2001).

La muestra con 20% de humedad mostró un comportamiento intermedio, es decir un reagrupamiento similar a las muestras de 30% y 40% por un lado y por el otro, su deformación plástica fue baja y presentó fragmentación similar a la muestra con el menor contenido de humedad. Esta baja deformación plástica se debió a que la cantidad de agua no fue suficiente para modificar el material. Este análisis se deduce por el hecho de que a cierto valor de presión, la densidad de esta muestra igualó o superó el valor de densidad máxima de la muestra con 40% de humedad.

Para todos los valores de humedad, se obtuvieron mayores valores de densidad a la velocidad de 4 mm/s con respecto a la velocidad de aplicación de 1 mm/s. La mayor velocidad produce mayores densidades porque durante la densificación (fragmentación y llenado de espacios vacíos para lamina 6,37%; deformación plástica para el laminado 40%) la presión afecta primero a una capa de material en contacto con la superficie donde se la aplica. Esta capa densa transmite la fuerza a otra porción vecina, hasta llegar al fondo de la celda. Durante el ensayo las primeras capas densas siguen recibiendo la presión por lo que se densifican más. A menor velocidad las partículas afectadas por la presión transmiten la fuerza a vecinas generándose un efecto en toda la masa de la muestra (Azhdar et al. 2006).

El modelo para caracterizar el comportamiento del laminado fue adecuado teniendo en cuenta los coeficientes de correlación obtenidos. La **Tabla 1** muestra los valores obtenidos y las **Figuras 3** y **4** las representaciones gráficas del modelo para las velocidades de 1 mm/s y 4 mm/s respectivamente.

Con este modelo, se puede predecir un valor de presión para obtener una densidad requerida (Denny 2002).

El valor 1/b expresado en kPa del modelo se aproxima a la presión de fractura relacionado con la resistencia a la compresión del material y el coeficiente a se relaciona con la porosidad intersticial de la muestra antes del ensayo (Salman et al. 2007). Los valores de 1/b obtenidos para la velocidad de 1mm/s fueron inferiores a los obtenidos a mayor velocidad por el efecto que la presión produjo en toda la masa de la muestra.

**Tabla 1.** Valores del modelo de Kawakita.

| Humedad (% m/m) / Velocidad | 6,37% | 20% | 30% | 40% |
|---|---|---|---|---|
| 1 mm/s | a= 0,5812<br>1/b= 1,6108<br>$R^2$= 0,9964 | a= 0,6413<br>1/b= 0,5234<br>$R^2$= 0,9994 | a= 0,5832<br>1/b= 0,2683<br>$R^2$= 0,9984 | a= 0,6334<br>1/b= 0,2308<br>$R^2$= 0,9984 |
| 4 mm/s | a= 0,6161<br>1/b= 1,6021<br>$R^2$= 0,9975 | a= 0,7225<br>1/b= 0,8549<br>$R^2$= 0,9996 | a= 0,6961<br>1/b= 0,3098<br>$R^2$= 0,9998 | a= 0,7502<br>1/b= 0,3041<br>$R^2$= 0,9986 |

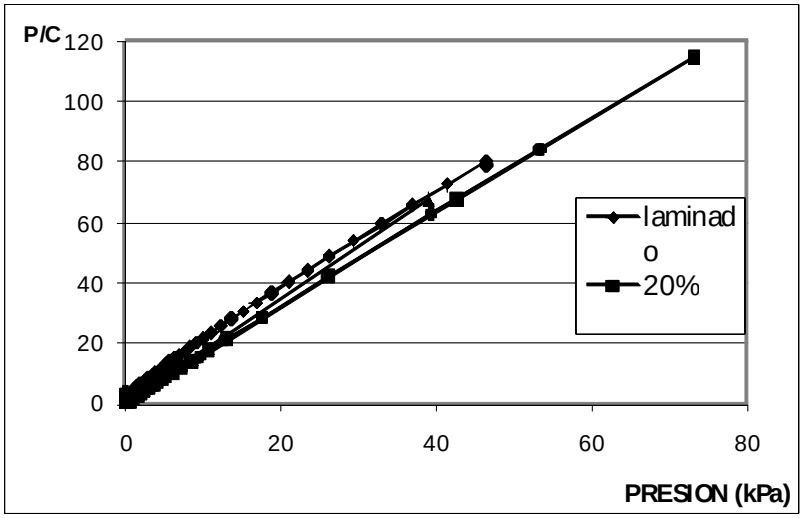


**Figura 3**. Modelo de Kawakita a velocidad 1 mm/s.

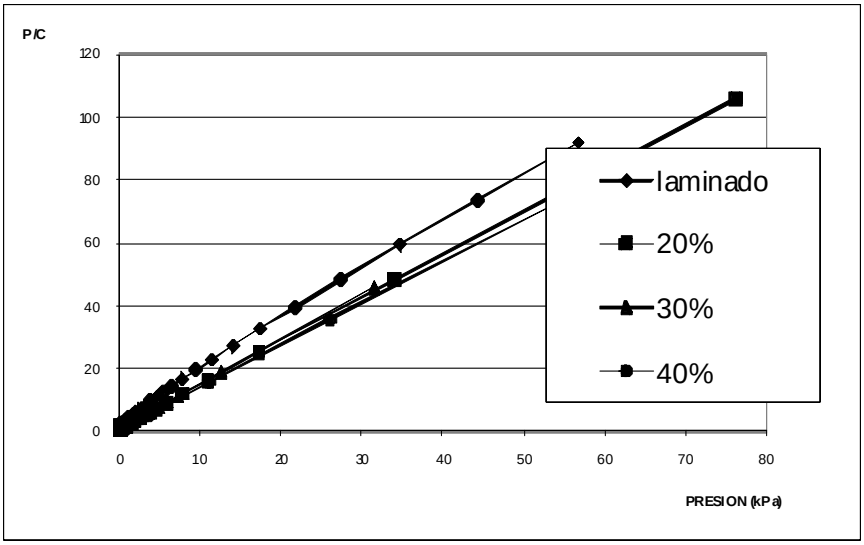


**Figura 4**. Modelo de Kawakita a velocidad 4 mm/s.

## CONCLUSIONES

Un cierto número de estados pueden identificarse durante la compactación de un material particulado: luego del llenado de la celda, el particulado se encuentra en un estado de empaquetamiento libre. Con

la aplicación de fuerza axial las partículas son capaces de trasladarse y rotar unas con respecto a otras desarrollando un empaquetamiento denso, el cual se considera terminado cuando el reordenamiento ha finalizado. El próximo paso de densificación se produce por el contacto e interacción entre partículas vecinas; en el proceso algunos materiales pueden deformarse y romperse. El contacto entre partículas es cerrado y se forman poros aislados. Durante este fenómeno la densidad aumenta y se utiliza usualmente para definir el estado del material. Hay también una contribución al cambio en el mecanismo de compresión con el procedimiento de compresión (Salman et al. 2007).
El comportamiento del laminado de soja, coincidió exactamente con la descripción bibliográfica sobre materiales particulados. Estos valores obtenidos son de gran valor para definir ensayos reométricos más complejos y para relacionar los resultados en el tratamiento del laminado con los parámetros de diseño y condiciones de funcionamiento de un extrusor. El primer tramo del tornillo del equipo debe generar un valor de presión de deformación plástica en una longitud reducida para que el fenómeno de reagrupamiento no afecte la capacidad del equipo, ya que la zona activa del dispositivo es la que trabaja sobre el estado homogéneo del material.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Aceitera BUNGE S. A. Tancacha - Provincia de Córdoba por el aporte del laminado de soja y al Ayudante Alumno Esteban Córdoba.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azhdar B, Stenberg B, Kari L. 2006. Determination of dynamic and sliding friction, and observation of stick-slip phenomenon on compacted polymer powders during high-velocity compaction. Polymer Testing, 25: 1069-1080.

Barron C, Buleon A, Colona P, Della Valle G. 2000. Structural modifications of low hidrated pea starch subjected to high thermomechanical processing. Carbohidrate Polymers, 43: 171-181.

Barron C, Bouchet B, Della Valle G. Gallant D, Panchot V. 2001. Microscopical study of the destructuring of waxy maize and smooth pea starches by shear an heat at low hidration. Journal of Cereal Science, 33: 289-300.

Denny P. 2002. Compaction equations: a comparison of the Heckel and Kawakita ecuations. Powder Technology, 127: 162-172.

Dominguez H, Núñez M, Lema J. 1995. Enzyme-assisted hexane extraction of soya bean oil. Food Chemistry, 54: 223-231.

Le Roux D, Vergnes B. 1995. A thermomechanical approach to pasta extrusion. Journal of Food Engineering, 26: 351-368.

Levy A, Kalman H. 2001. Handbook of Conveying and Handling of Particulate Solids. Vol.10. Elsevier. pag. 860.

Prat L, Guiraud P, Rigal L, Gourdon C. 2002. A one dimensional model from the prediction of extraction yields in a two phases modified twin-screw extruder. Chemical Engineering and Processing, 41: 743-751.

Pearson D. 1993. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos. Acribia S. A. Zaragoza (España). Pag. 323.

Salman A.D, Hounslow M.J, Seville, JP. 2007. Granulation. Elsevier Science. pag 1373.

Sánchez-Girón V, Andreu E, Hernanz J. 1998. Response of five types of soil to simulated compaction in the form of confined uniaxial compression tests. Soil & Tillage Research, 48: 37-50.

Will Chen C, Trong-Ming D, Hsiao-Feng, Y. 2006. Enzimatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hidroxybutyrate-co-3-hidroxyvalerte) by Haloferax mediterranei. Process Biochemistry, 41: 2280-2296.

Wu L, Jia Y, Sun S, Zhang G, Lijia G. 2007. An Study on reactive extrusion processes of block copolymer. Materials Science & Engieneering A, 455-456: 221-226.

Yan H, Barbosa-Cánovas G. 2001. Density changes in selected agglomerated food powders due to high hydrostatic pressure. Lebensm-Wiss. u.-Technolog., 34: 495-501.

# Estudio de las propiedades reológicas de la resina extraída de las hojas y tallos de *Grindelia Chiloensis*

# Rheological properties of the resin extracted from leaves and stems of *Grindelia Chiloensis*

Martínez LM (1), De La Osa González O (1), Pollio ML (1) (2)

(1) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña 352, B1876BXD, Bernal, Argentina
(2) Consejo de Investigaciones Científicas, Prov. De Bs. As. (CIC).
lmartinez@unq.edu.ar

## RESUMEN
El objetivo principal de este trabajo fue determinar las características reológicas de la resina extraída en diclorometano de las hojas y tallos de la planta de Grindelia Chiloensis, especie nativa de la región patagónica, la que por sus propiedades adhesivas y su carácter inocuo tiene gran potencial como tackificador (agente modificador de la pegajosidad) en la formulación de pegamentos a utilizar en envases para alimentos. La resina cruda obtenida en diclorometano se purificó con alcohol separando una fracción de cera que presenta una temperatura de ablandamiento de 70 ºC y estabilidad térmica de aproximadamente 200 ºC, la resina refinada se caracterizó por FTIR la que presento bandas características de ácidos a 1735 $cm^{-1}$ y una estabilidad térmica medida por análisis térmico superior a 120 ºC. Los estudios reológicos de las resinas cruda y refinada se realizaron en un reómetro rotacional de cilindros concéntricos, con dispositivo para pequeñas muestras (SC-R13) a temperaturas entre 70 °C y 90 °C. Los datos experimentales se ajustaron con el modelo de Newton y el de Ostwald. Se graficaron curvas de tensión de corte versus la velocidad de deformación por corte para ambas y se observó que los valores de la viscosidad son mayores para la resina refinada (entre 1,48 a 0,31 Pa s) que para la resina cruda (entre 0,51 a 0,17 Pa seg) en todo el rango de temperatura estudiadas.

## ABSTRACT
The aim of this work was to study the rheological characteristics of the resin extracted with dichloromethane from of the leaves and stems of the *Grindelia Chiloensis* plant, native Patagonia species, the one who by his adhesion properties and his non toxicity has a big potential like tackifiers in the formulation of glues to use in containers for foods. The crude resin was purified with ethanol separating waxes fraction. This fraction presents a softening point of 70 °C and a thermal stability of about 200 °C. The purified resin was analyzed by FTIR. It shows characteristics peaks of acids at 1735 $cm^{-1}$. The thermal stability, determined by thermal analysis, was 200 °C. The rheological studies of the crude and purified resin were performed in a rotator rheometer in the range 70 – 90 °C. Experimentals results were adjusted by Newton – Oswald model. Viscosity values obtained from shear stress versus shear rates curves, shows that purified resin has greater values (between 1.48 to 0.31 Pa s) than crude resin which values are 0.51 to 0.71 Pa s, at all temperatures analyzed.

**PALABRAS CLAVE**: *Reología, resina, Grindelia.*

**KEYWORDS**: *rheology, resin, Grindelia.*

## INTRODUCCIÓN
La tendencia mundial a la protección del medio ambiente y las nuevas regulaciones internacionales imponen la búsqueda de nuevos materiales que produzcan un impacto ambiental mínimo. Un gran número de los productos usados en la fabricación de envases, adhesivos, pinturas y tintas, provienen de la petroquímica y producen un alto impacto ambiental (Gandini 1996, 1998). Para evitar este impacto, una estrategia económica y ecológicamente atractiva es el uso de materiales provenientes de recursos naturales renovables como fuentes de materias primas.

En particular, en la fabricación de adhesivos se utilizan bases sintéticas como acetatos, acrilatos, poliuretanos, vinílicos, poliolefinas modificadas y copolímeros de estos y bases naturales de origen animal y vegetal como caseína, dextrina, almidones modificados, derivados de celulosa y resinas de pino (Ashley et al. 1995).
En particular la resina de pino está comprendida dentro de las llamadas resinas basadas en terpenos con lo cual pueden ser modificadas con sustancias químicas, como por ejemplo fenol, para producir una colección de productos. Contiene además ácidos grasos, que esterificados, son menos polares y de menor peso molecular (Jackson et al. 2005). Los estudios de sus propiedades térmicas, mecánicas y reológicas demuestran la versatilidad de la resina de pino (Petrie 2005).
La *Grindelia* Willd. (Asteraceae) es un género americano que comprende alrededor de 63 especies. Hoffman y Mc Laughlin (1986) seleccionaron a la *Grindelia comporum Green* como una especie promisoria para el suroeste de los Estados Unidos. Su resina, compuesta por ácidos diterpénicos del grupo labdano, podrían reemplazar a las de pino (*Pinus* sp.) (Loeber 1990).
Desde el año 1992 se siembra en la Patagonia Argentina *Grindelia chiloensis* en condiciones de secano con el objetivo de encontrar nuevas opciones productivas que reemplacen a la agricultura y ganadería que llevó a la degradación de la tierra (Ravetta 1998). Esta especie, nativa de la Patagonia, puede rendir hasta un 25% de resinas terpénicas extraídas de las hojas (Zavala et al. 2000). También produce resina sobre la superficie de las flores y tallos (Guerreiro et al. 1981, Bohlmann et al. 1982, Timmermann et al. 1984). El ácido grindélico (**Figura 1**) y los ácidos labdano tipo diterpénicos constituyen el 65% al 75% de la resina cruda que se extrae de la planta.

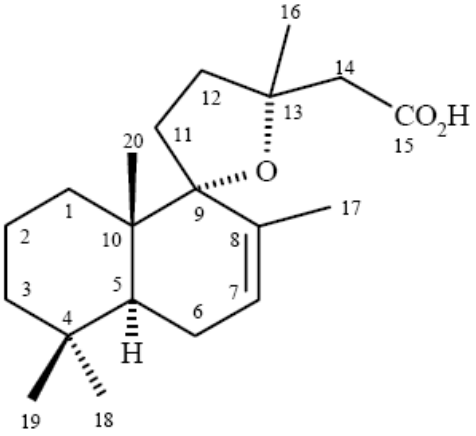


**Figura 1**. Acido Grindelico.

Los antecedentes en la Argentina con la resina que produce el género *Grindelia* se refieren principalmente al estudio de optimización de crecimiento y desarrollo del cultivo teniendo en cuenta como resultado el mejoramiento en la producción de biomasa y resina (Ravetta 1996, 1998, 2000, 2005).
Existen trabajos sobre la caracterización química de la composición de resina de *Grindelia* de diversas especies, enfocados a la separación e identificación estructural por IR y RMN de algunas especies de ácidos diterpénicos encontrados en la resina (Guerreiro et al. 1981, Hanson 2001, Ahmed et al. 2001). Otros trabajos estudiaron la re1ación entre la solubilidad de estos ácidos diterpénicos con su toxicidad y como se reduce la misma (Patoine 1997, Peng 2000).
Para lograr la aplicación de la resina de *Grindelia Chiloensis* como tackificador (modificador de adherencia) dada su alta pegajosidad, es necesario profundizar en el estudio de las propiedades mecánicas, térmicas y reológicas de este producto.
La reología es la ciencia que estudia las deformaciones y la fluidez de la materia (Barnes 1993), que juegan un papel vital en todos los procesos de adhesión. Estos procesos incluyen aplicación; fluidez superficial; topología de penetración en superficie y poros; difusión entre interfases; solidificación y resistencia a la aplicación de esfuerzos externos e internos.
Existen tres propiedades de los polímeros que rigen la respuesta reológica de los materiales como ser composición química, estructura molecular y volumen molecular libre. Por ende el comportamiento

reológico de los polímeros involucra varios fenómenos, los cuales pueden estar relacionados a dichas propiedades. Los fenómenos que se presentan son: flujo viscoso, elasticidad gomosa, viscoelasticidad y elasticidad de enlace (Barnes 2000).
Es por ello, que el objetivo de este trabajo es profundizar en el estudio del comportamiento de flujo de la resina cruda y refinada obtenida de la planta de *Grindelia chiloensis*, así como también, ampliar el conocimiento sobre su estructura y estabilidad térmica, con el fin de analizar su potencial uso en la fabricación de adhesivos de origen natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Extracción y Refinación

Las plantas se cortan y se realiza una extracción con diclorometano (Anedra, Argentina) en un reactor tipo bach, se filtra y la fase líquida se seca a vacío obteniéndose la resina cruda. Para su refinación, se re-disuelve en metanol anhidro (Anedra, Argentina) en caliente y luego se la filtra, logrando la separación de las ceras. Al filtrado se le agrega carbón activado (cada 100 g de resina se utilizan 7 g de carbón de tamaño de partículas del 75% ≤40 μm) y se calienta por 30 minutos, se filtra nuevamente y a la solución obtenida se le evapora el solvente en un evaporador rotatorio a temperaturas entre 60-70 ºC, obteniéndose la resina refinada. Las ceras obtenidas por filtración se secan en estufa a una temperatura no superior a los 60 °C para eliminar los restos de metanol. La determinación de punto de fusión de las ceras se realizó por medio de un equipo IONOMEX de 100W.

### Espectrometría infrarrojo por transformada de Fourier

La resina cruda y refinada fue caracterizada por espectroscopia FTIR en un equipo Bruker Tensor 27 con una resolución de 1 $cm^{-1}$. Los espectros se realizaron por duplicado a partir de la muestra en forma directa con la utilización de un sistema ATR del tipo Bruker Golden Gate Diamond, sin tener que utilizar una disolución de la muestra.

### Análisis termogravimétrico

Se estudio la estabilidad y descomposición térmica de la resina de *Grindelia* cruda, refinada y la fracción de ceras, teniendo en cuenta la pérdida de masa en función de la variación de temperatura. Las curvas TGA y DTGA se obtuvieron a través del método de análisis dinámico a una velocidad de calentamiento de 10 ºC/min desde la temperatura de equilibrio hasta los 700 ºC en una atmósfera de nitrógeno. Las determinaciones fueron realizadas por duplicado para cada muestra, en un equipo analizador termogravimétrico Q500 de la firma TA Instruments, EU.

### Análisis Reológico

Las resinas de grindelia cruda y refinada fueron colocadas en estufa durante 10 horas a 60 ºC. Una muestra de 8 mL de muestra directa de resina fue utilizada en el reómetro rotacional de cilindros concéntricos Brookfield modelo RV-DV III+ (Brookfield Engineering Laboratories, EUA). El reómetro dispone de un sistema automático de adquisición de datos y de control de operación mediante el software Rheocalc v3.1, registrando, cada 120 segundos, los valores de temperatura, viscosidad aparente, tensión de corte, torque, RPM así como tasa de deformación. Para los ensayos se utilizó un *spindle* SC4-27 y el dispositivo SSA tipo SC-R13 especialmente diseñado para pequeñas cantidades de muestras. Mediante este ultimo dispositivo, por el cilindro fijo y encamisado se hizo circular agua cuya temperatura fue controlada por un baño termostático (Julabo MD, modelo 33). Las determinaciones fueron hechas en duplicado, utilizándose para cada repetición y para cada temperatura una muestra nueva. Las velocidades rotacionales fueron mantenidas dentro de un intervalo de 10 a 200 rpm y los ensayos se realizaron a las temperaturas de 70, 75, 80, 85 y 90 ºC con tiempo de estabilización de la muestra de 10 minutos para cada una.

### Análisis Estadístico

Los resultados experimentales fueron procesados para su tratamiento matemático y estadístico y su posterior exposición gráfica de los resultados por el programa OriginLab 7.0. Este programa nos permite el ajuste de los puntos experimentales con curvas predeterminadas que puedan responder a distintas leyes, como la Ley de la potencia y la Ley de Newton, utilizados en este caso para estudiar el comportamiento al flujo de las resinas cruda y refinada de Grindelia

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del tratamiento de las hojas y tallos de la planta de *Grindelia Chiloensis* se obtuvieron tres fracciones, de la inicial en diclorometano por secado se obtiene la resina cruda (I), por precipitación al preparar la solución alcohólica se logra la cera (II) y de la extracción del alcohol de dicha solución se llega a la resina refinada (III).

### Estabilidad térmica

Todos los productos fueron analizados por termogravimetria y las **Figuras 2**, **3** y **4** corresponden a sus termogramas. En todos los casos, se observa que las perdidas de masas comienzan posterior a los 100 ºC. Para las fracciones de resinas (I y III) su estabilidad esta posterior a los 140 ºC y para la cera su resistencia térmica es superior. Si bien la temperatura de fusión de la cera se determinó próximo a los 70 ºC, dada la estructura es de esperar que esta tenga una estabilidad térmica superior a los 200 ºC. De estos resultados, se estableció el rango de temperaturas de trabajo para el estudio reológico de las fracciones de resinas, ya que es necesario que este se lleve a cabo a temperaturas inferiores al comienzo de su degradación térmica.

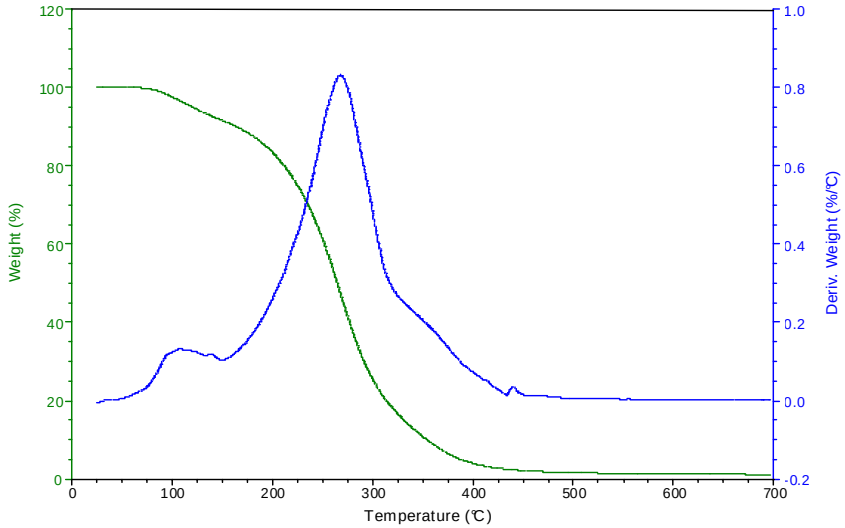


**Figura 2**. Termograma de TG y DTG de la resina Grindelia cruda.

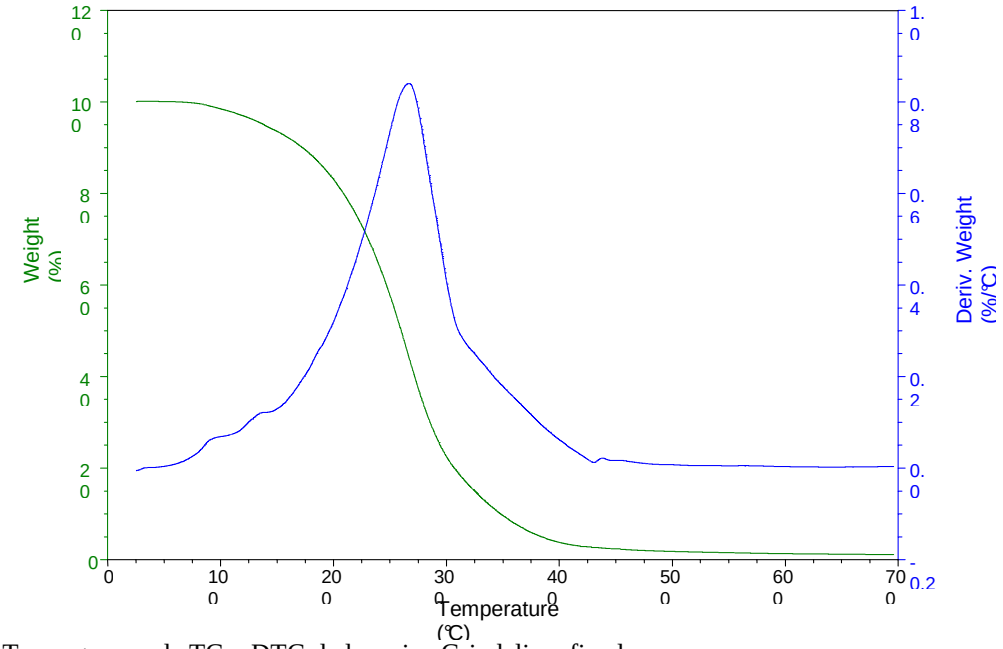


**Figura 3**. Termogramas de TG y DTG de la resina Grindelia refinada.

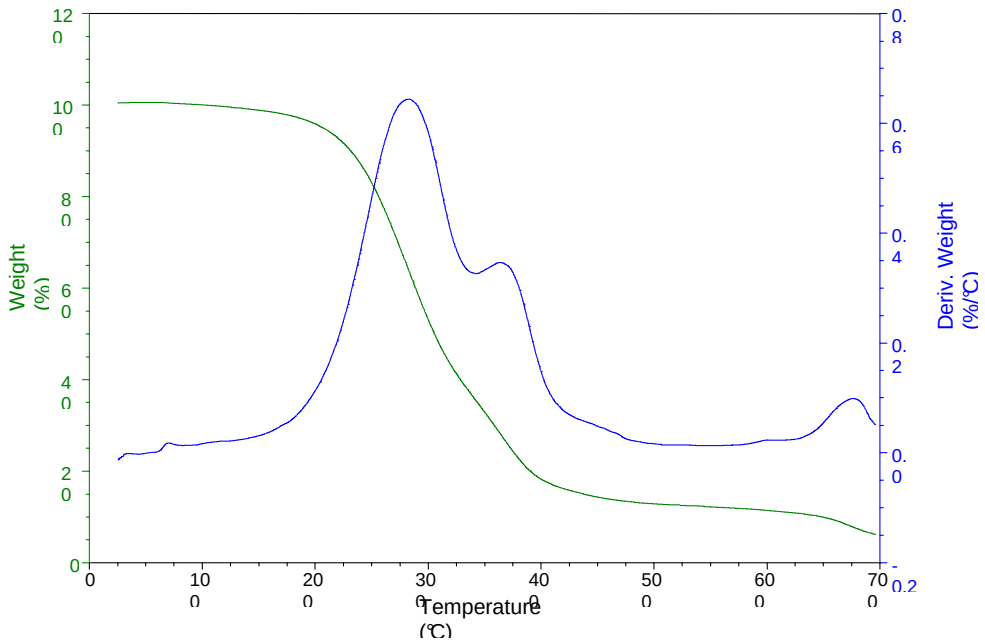


**Figura 4**. Termograma de TG y DTG para la fracción de cera obtenida durante el refinamiento de la resina de Grindelia.

## Análisis estructural por FTIR

Los espectros FTIR para la resina cruda y refina se observan en la **Figura 5**. En la región de 2950 a los 2860 $cm^{-1}$ se aprecian las bandas antisimétrica y simétricas de los grupos metil y metilenos, las bandas en 1454 y 1440 $cm^{-1}$ corresponden a la deformación del $CH_2$ y en 1370-1380 al grupo dimetilo, la región de 1225 a 988 se encuentran para ambos las bandas características de la vibraciones de valencia del grupo C-O- del carboxilo. La principal diferencia espectral para ambas resinas se puede observar en la banda correspondiente a la estructura del C=O, para la resina cruda aparece a 1704 $cm^{-1}$ y para la resina refinada se observa a 1732 $cm^{-1}$ lo que indica que el proceso de refinado ha provocado un corrimiento a mayores longitudes de onda de la banda correspondiente al grupo carboxilo, este efecto esta vinculado con una mayor coordinación electrónica de los electrones libres de los grupos diénicos. Por otro lado, en la resina cruda se observa un doblete asimétrico en 735 $cm^{-1}$ y 701 $cm^{-1}$ el cual esta relacionado con la estructura del OH del grupo ácido y para la muestra de *Grindelia* refinada esa señal desaparece, estos cambios en los espectros podrían estar relacionados con una metilación del grupo ácido durante el tratamiento con alcohol a temperatura durante la refinación.

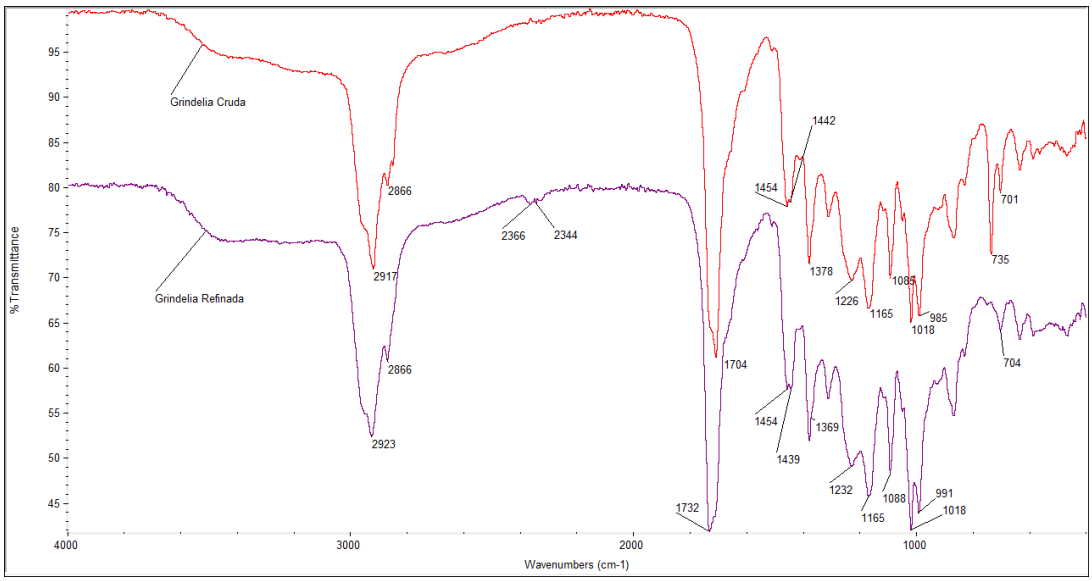


**Figura 5**. Espectros FTIR de la Grindelia cruda y refinada.

## Comportamiento reológico

Los resultados obtenidos del comportamiento de flujo de la resina de grindelia cruda y refinada se pueden observar en la **Figura 6** y **7,** en los cuales se han representado los puntos experimentales de la tensión de corte τ (*shear stress*) versus la velocidad de deformación por corte γ (*shear rate*).

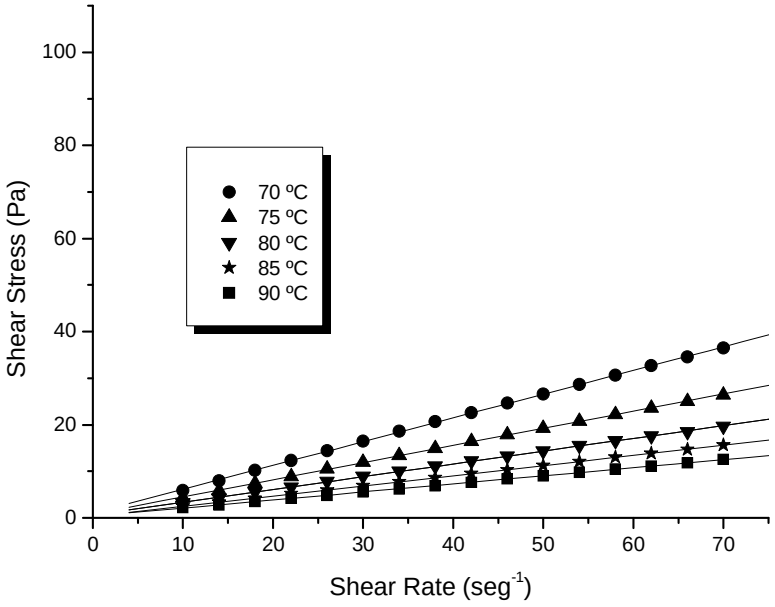


**Figura 6.** Valores experimentales de tensión de corte versus velocidad de deformación por corte para la resina de G*rindelia* cruda. Las curvas continuas corresponden al ajuste por la Ley de Newton.

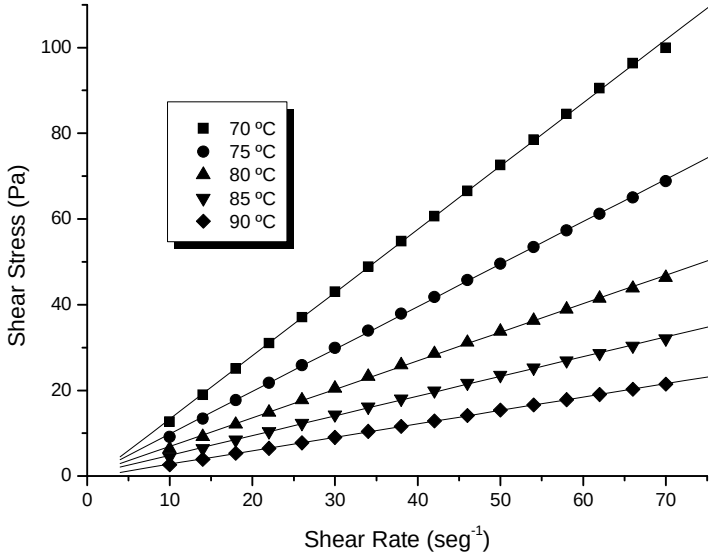


**Figura 7.** Valores experimentales de tensión de corte versus velocidad de deformación por corte para la resina de *Grindelia* refinada. Las curvas continuas corresponden al ajuste por la Ley de Newton.

A modo de buscar un modelo matemático que describa una ley de variación de los puntos experimentales se aplico el modelo de Newton ya que la ecuación de una recta define al parámetro viscosidad μ, sinónimo de fricción interna. Dicha viscosidad es una medida de la resistencia a fluir. Le ecuación responde a la forma:

$$\tau = \mu \cdot \frac{du}{dt} = \mu \cdot \gamma$$

donde:
$\tau$: el esfuerzo cortante [Pa].
$\gamma$: la velocidad de deformación [$s^{-1}$].
No obstante, se ha probado con otro modelo de ajuste de los datos experimentales correspondiente a un fluido pseudoplástico. Dicho modelo responde a la Ley de Potencia (Ostwald):

$$\tau = K \cdot \gamma^n$$

donde:
$\tau$: el esfuerzo cortante [Pa].
$\gamma$: la velocidad de deformación [$s^{-1}$].
*K*: Consistencia, cuyas dimensiones dependen del valor de n.
*n*: índice de fluidez, valor adimensional.

Los datos experimentales para las resinas cruda (**Figura 6**) y refinada (**Figura 7**) con sus respectivas curvas de ajuste por el modelo de Newton muestran una buena correlación de datos obteniéndose valores de viscosidad (m) para la resina cruda entre 0,51 a 0,17 Pa s y entre1,48 a 0,31 Pa s para la resina refinada. Los valores mencionados surgen de analizar el valor de la pendiente de la recta de ajuste.
A pesar que se observa, a partir de las curvas, un comportamiento acentuadamente newtoniano, se buscó aplicar un modelo que define el comportamiento pseudoplástico de flujo. Este es el caso del modelo de Ostwald para ambas resinas (**Figuras 8** y **9**) en donde los parámetros K (consistencia) y n (índice de fluidez) definen las formas de las curvas.

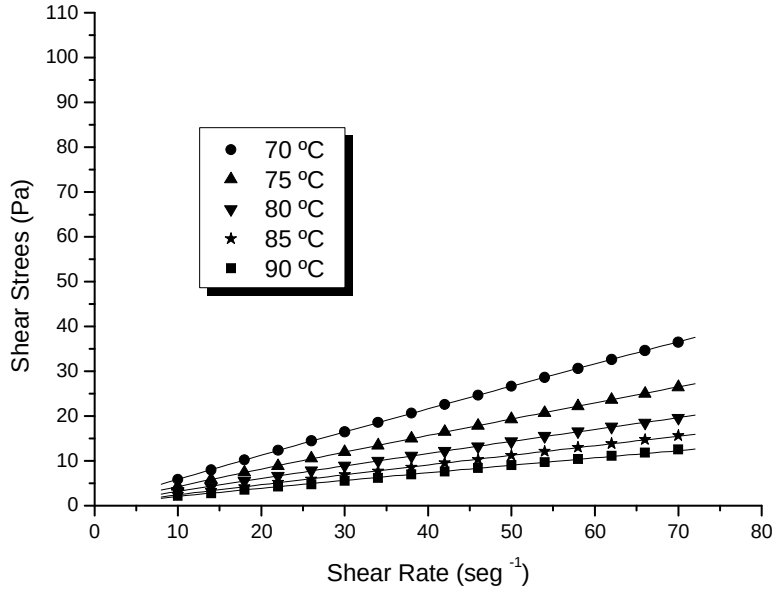


**Figura 8.** Valores experimentales de tensión de corte versus velocidad de deformación por corte para la resina de *Grindelia* cruda. Las curvas continuas corresponden al ajuste por la Ley de la Potencia.

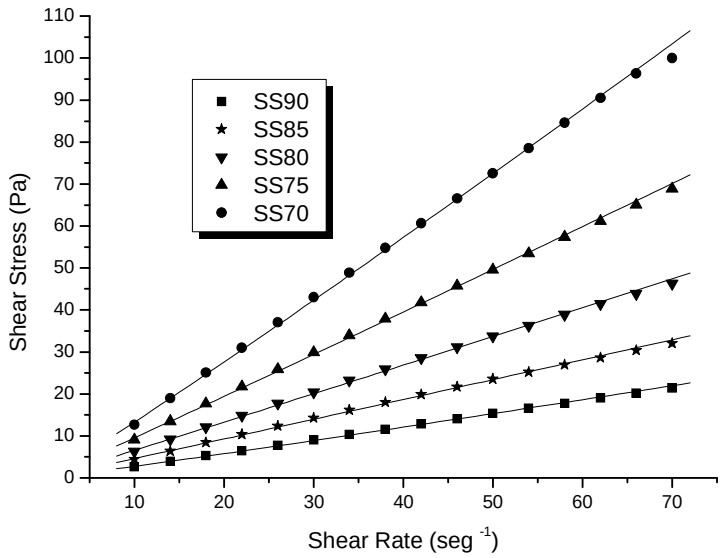


**Figura 9**. Valores experimentales de tensión de corte versus velocidad de deformación por corte para la resina de *Grindelia* refinada a distintas temperaturas. Las curvas continuas corresponden al ajuste por la Ley de la Potencia.

La determinación de los valores K y n para la ley de Potencia se observan en las **Figuras 10** y **11**, en donde, a partir del grafico log (*shear stress*) versus log (*shear rate*) se hace un ajuste lineal de los valores y la pendiente define el valor de n mientras que el valor de K queda definido por el antilogaritmo de la ordenada al origen de la recta de ajuste. Para cada temperatura se realiza el mismo procedimiento señalado anteriormente. Los parámetros de ajuste de ambos modelos se muestran en las **Tablas 1** y **2** respectivamente para todo el rango de temperaturas estudiadas, así como el valor del coeficiente de correlación $R^2$ y la desviación estándar.

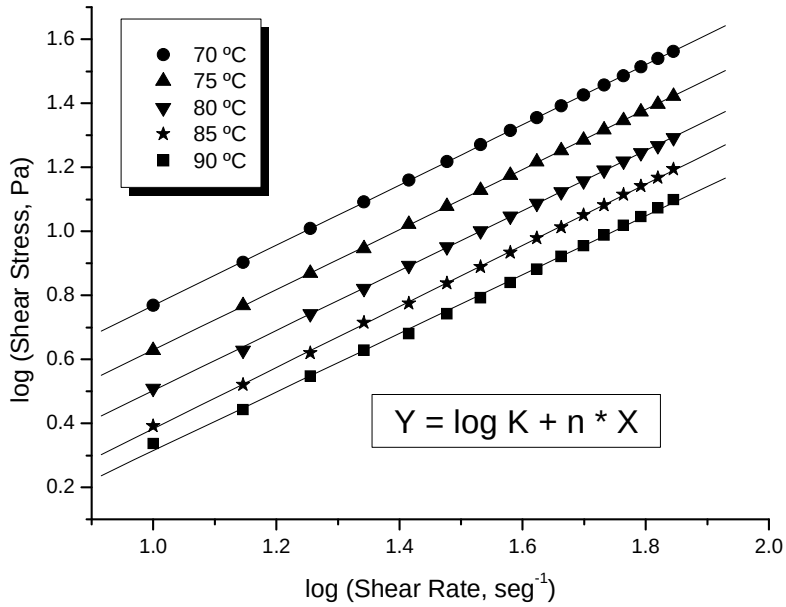


**Figura 10**. Correlaciones para la determinación de los parámetros n y K del modelo de la ley de la Potencia para resina cruda

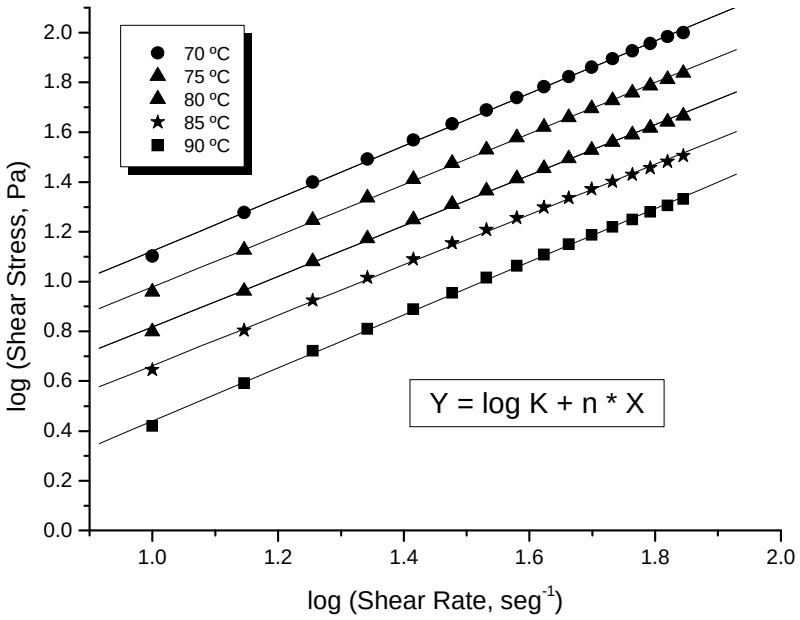


**Figura 11.** Correlaciones para la determinación de los parámetros n y K del modelo de la ley de la Potencia para resina refinada.

**Tabla 1**. Parámetros de la Ley de Newton para resina de *Grindelia* cruda y refinada.

| Parámetros de Ley de Newton | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| T (ºC) | Resina *Grindelia* Cruda | | | Resina *Grindelia* Refinada | | |
| | Viscosidad (Pa s) | $R^2$ | SD | Viscosidad (Pa s) | $R^2$ | SD |
| 70 | 0,51 | 0,9998 | 0,16984 | 1,48 | 0,9998 | 0,5870 |
| 75 | 0,37 | 0,9998 | 0,13314 | 0,99 | 0,9998 | 0,3177 |
| 80 | 0,27 | 0,9997 | 0,11622 | 0,67 | 0,9997 | 0,3356 |
| 85 | 0,22 | 0,9999 | 0,04139 | 0,46 | 0,9995 | 0,2727 |
| 90 | 0,17 | 0,9999 | 0,04310 | 0,31 | 0,9999 | 0,0764 |

**Tabla 2**. Parámetros de la Ley de Newton para resina de *Grindelia* cruda y refinada.

| Parámetros de Ley de Ostwald o Ley de Potencia | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T (ºC) | Resina Cruda | | | | Resina Refinada | | | |
| | n | Log K | $R^2$ | SD | n | Log K | $R^2$ | SD |
| 70 | 0,941 | 0,17287 | 0,9999 | 0,00118 | 1,055 | 0,06805 | 0,9995 | 0,00813 |
| 75 | 0,939 | 0,30920 | 0,9999 | 0,00189 | 1,026 | 0,04716 | 0,9995 | 0,00778 |
| 80 | 0,937 | 0,43536 | 0,9998 | 0,00378 | 1,016 | 0,19858 | 0,9995 | 0,00840 |
| 85 | 0,955 | 0,57168 | 0,9998 | 0,00410 | 1,011 | 0,34841 | 0,9998 | 0,00410 |
| 90 | 0,917 | 0,60313 | 0,9992 | 0,00906 | 1,067 | 0,62739 | 0,9996 | 0,00827 |

Comparando los parámetros estadísticos de los ajustes para los dos modelos testados, se obtuvo la mejor correlación con el uso del modelo de la Ley de la Potencia.

Las **Figuras 6** a **9**, muestran un aumento de la viscosidad para la resina refinada contra la resina cruda. Esto puede estar debido a las interacciones que se producen entre los componentes de la resina y la cera vegetal separada durante la refinación. Es evidente que los resultados apuntan a que en ausencia de la cera aumentan las fuerzas cohesivas entre los componentes de la resina. En el rango de las temperaturas seleccionadas para el estudio, la fracción de cera y resina constituyen una sola fase, lo que implica una gran interacción entre todos los componentes de la mezcla ya que de no ser así se separarían en fase ambos componentes.

Considerando uno de los parámetros de la ley de Ostwald, se muestra el efecto de la variación de la consistencia con la temperatura (**Figura 12**). Se puede apreciar que a medida que aumenta la temperatura disminuye el valor de la consistencia para ambas muestras hasta un valor crítico en el cual las fuerzas de cohesión de ambos sistemas llegan niveles semejantes, con el aumento de la temperatura. Esto corrobora lo señalado anteriormente, en relación a las mayores fuerzas de interacción entre resina-resina que las que ocurren entre resina – cera.

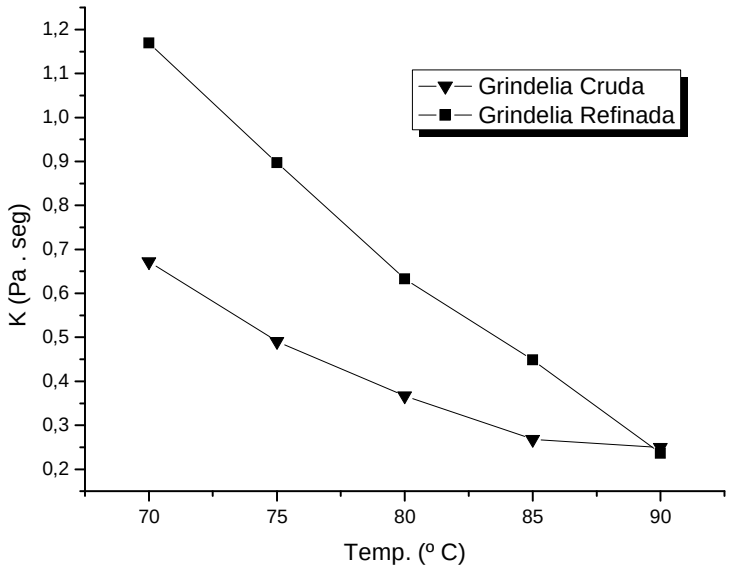


**Figura 12**. Variación de la consistencia K con la temperatura.

## CONCLUSIONES

Se logro obtener resina refinada por medio de la separación de las ceras a partir de la resina cruda extraída de hojas y tallos de la Grindelia Chiloensis. Los resinas cruda y refinada responden a distintas propiedades reológicas a partir de considerar la separación de las ceras.

El comportamiento de flujo de las resinas cruda y refinada de grindelia chiloensis mostraron, a las temperaturas estudiadas, que pueden ser utilizadas como componentes (tackificadores) para la formulación de adhesivos, fundamentalmente del tipo hot melt o PSA (presion sensible adhesive)

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo para la concreción y presentación de este trabajo a la Universidad Nacional de Quilmes y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Buenos Aires.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed AA, Mahmoud AA, Ahmed UM, El-Bassuony AA, Abb El-Razk MH, Pare PW, Karchesy J. 2001. Manoyl Oxide r-Arabinopyranoside and Grindelic Acid Diterpenoids from *Grindelia integrifolia*. J. Nat. Prod. 64: 1365-1367.

Ashley R., Cochran M. 1995. Adhesives in packaging. Int. J. Adhesion and Adhesives 15: 101-108.

Barnes HA. 2000. Handbook of elementary rheology. Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, University of Wales, editors. Aberystwyth, USA.

Barnes HA, Hutton JE, Walters K. 1993. An introduction to rheology. England, Elsevier Science Publishers.

Bartoli A, Puga E, Tortosa, RD. 1994. El cultivo de Grindelia en condiciones de secano. Proc. III Int. Conf. New Industrial Crops and Products. Catamarca, Argentina. pp: 432-434.

Cheng SZD. 2002. Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry. En Applications to polymers and plastics, volume 3. Department of Polymer Science. University of Akron. Elsevier Science B.V.

Gandini A, Belgacem M. 1998. Polymer International 47: 267.

Golluscio RA, Giraudo C, Borrelli P, Montes L, Siffredi G, Cechi G, Nakamatsu V, Escobar J. 1999. Utilización de los recursos naturales en la Patagonia. Consorcio DHV-Swedforest. Desertificación en la Patagonia.

Graf RT, Koenig JL, Ishida H. Introduction to optics and infrared spectroscopic techniques. Department of Molecular Science. Case Western Reserve University, editors. Cleveland.

Guerreiro EJ, Kavka JR, Saad MA, Giordano OS. 1981. Acidos diterpenicos en *Grindelia pulchella* y *G. chiloensis* Cabr. Rev. Latinoam. Quim. 12:77-81.

Hanson J. 2001.The development of strategies for terpenoid structure Determination. Nat. Prod. Rep.18:607–617.

Hoffmann JJ. 1985. Resinous plants as an economic alternative to bioenergy plantations. Energy 10:1139-1143.

Hoffmann JJ, McLaughlin SP. 1986. Grindelia camporum: Potential cash crop for the arid southwest. Econ. Bot. 40:162-169.

Hoffmann JJ, Kingsolver BE, McLaughlin SP, Timmermann BN. 1984. Production of resins by arid-adapted astereae. En: Timmermann, Stellink and Loewus, editores. Phytochemical adaptations to stress. New York: Plenum, pag 251-271.

Loeber, G. Rosin and rosin resins as raw materials for the pressure sensitive adhesive tape industry. AFERA Congress, Florence, Italy, 1990.

Leonardi C, Marin DG. 2005. Some applications of molecular rheology: polymer formulation and molecular design. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics. 28: 50-61.

Patoine A, Manuel J, Guiot S R 1997. Toxicity reduction and renoval of dehydroabietic and abietic acid in a continuous anaerobic reactor. Wat. Res. 4: 825-831.

Peng G, Roberts J. 2000. Solubility and toxicity of resin acids. Wat. Res. 10: 2779-2785.

Petrie EM. Cure monitoring of adhesives. Special Chem 4 Adhesives, March 2, 2005.

Ravetta DA, Goffman F, Pagano G, McLaughlin SP. 1996. Grindelia chiloensis resin and biomass production in its native environment. Industrial Crops and Products 5: 235-238.

Ravetta DA, Anouti A, McLaughlin SP. 1996. Resin production of Grindelia accesions under cultivation. Industrial Crops and Products 5: 197-201.

Ravetta DA, McLaughlin SP, O'Leary JW. 1997. Evaluation of salt tolerance and resin production in coastal and central valley accesions of Grindelia species (Asteraceae). Madroño (U.S.A.) 44:74-88.

Ravetta DA, McLaughlin SP, O'Leary JW. 1997. Evaluation of salt tolerance and resin production in coastal and central valley accesions of Grindelia species (Asteraceae). Madroño (U.S.A.) 44:74-88.

Ravetta DA, Soriano A. 1998. Alternatives for the development of new industrial crops for Patagonia. Ecologia Austral 8:297-307.

Timmermann BN, Luzbetak DJ, Hoffmann JJ, Jolad SD, Schram KH, Bates RB, Klenck RE. 1983. Grindelane diterpenoids from Grindelia camporum and Chrysothamnus paniculatus. Phytochemistry 22:523-525.

Timmermann BN, McLaughlin SP, Hoffmann JJ. 1987. Quantitative variation of grindelane diterpene acids in 20 species of North American Grindelia. Biochemical Systematics and Ecology 15: 401-410.

Zafar SI, Shah WH, Rehman ZU. 1994. Studies on achene germination, transplantability, saltinity tolerance, and cultivation of gumweed (Grindelia camporum) in hot and semi-arid conditions. Field Crops Research 37: 77-84.

Zavala JA, Ravetta DA. 2000. The effect of irrigation regime and biomass and resin production in *Grindelia chiloensis*. Field crops research 3943:1-10.

# Identificación de una levadura con capacidad macerante y caracterización parcial de sus carbohidrasas exocelulares

# Identification of a yeast with maceration capacity and partial characterization of the extracellular carbohydrolases

Martos MA (1), Zubreski ER (1), Combina M (2),Vita CE (3), Hours RA (3)

(1) FCEQyN, UNAM. Posadas, Argentina Félix de Azara 1552. (3300) Posadas, Misiones.
(2) EEA Mendoza, Centro Regional Mendoza. San Juan, INTA.
(3) CINDEFI (UNLP; CCT-La Plata, CONICET).
amartos@fceqyn.unam.edu.ar

## RESUMEN

Estudios previos demostraron que una levadura autóctona, aislada de frutas cítricas, produce extractos enzimáticos con capacidad macerante de tejidos vegetales (papa, mandioca). El objetivo del presente estudio fue identificar dicha levadura por métodos moleculares e identificar las actividades enzimáticas posiblemente involucradas en el proceso de maceración.

La identificación de la levadura se realizó mediante amplificación de la región entre los genes 18S rRNA y 28S rRNA utilizando los primers ITS1 e ITS4, seguido de digestión con enzimas de restricción (*Hinf I, Cfo I* y *Hae III*). El fragmento amplificado, 5.8S-ITS rRNA, fue secuenciado para confirmar su identidad.

La levadura fue identificada como *Pichia anomala.* En sobrenadantes de cultivo se detectaron dos isoenzimas con actividad de poligalacturonasa (PG) de tipo endo; no se detectó actividad de pectinliasa, pectatoliasa, pectinesterasa, celulasa ni xilanasa.

## ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that enzymatic extracts from a wild-type yeast isolated from citrus fruit peels display macerating activity of plant tissues (i.e. potato, cassava, etc.).

The aim of the present study was to identify the wild-type yeast by molecular methods and characterize the enzymatic activities possibly involved in the maceration process.

Molecular identification of the wild-type yeast was performed by amplification of the 18S and 28S rRNA regions using ITS1 and ITS4 primers followed by digestion with restriction enzymes (*Hinf I, Cfo I* and *Hae III*). The species assignation was also confirmed by sequence analyses of the 5.8S-ITS rRNA region.

The wild-type yeast was identified as Pichia anomala. Two isoenzymes with PG activity were found in culture supernatants, whereas cellulase, xylanase, pectinlyase, pectatelyase and pectinesterase activities were not detected.

**PALABRAS CLAVE**: *Pichia anomala, poligalacturonasa, maceración.*

**KEYWORDS**: *Pichia anomala, polygalacturonase, maceration.*

## INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas se encuentran principalmente en la pared celular primaria y en la región intercelular de los tejidos vegetales. Estas sustancias son hidrolizadas por enzimas pécticas, que se pueden encontrar en los mismos vegetales o bien ser producidas por diferentes microorganismos (García *et al*. 2002). Las enzimas pécticas constituyen un sistema enzimático que incluye esterasas y enzimas depolimerizantes. Entre las esterasas se encuentra pectinesterasa (PE) y entre las depolimerizantes se incluyen poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). PE hidroliza los ésteres metílicos de la molécula de pectina liberando metanol. PG y PL actúan sobre los enlaces glicosídicos, por hidrólisis en el caso de PG o por β-eliminación formando oligosacáridos ácidos insaturados en el caso de PL. Las PG se clasifican según su modo de acción en: endo-poligalacturonasas (endo-PG), que

hidrolizan los enlaces glicosídicos internos α-1,4 del ácido péctico produciendo una rápida caída en la viscosidad, y en exo-poligalacturonasas (exo-PG), que actúan sobre el extremo no reductor del sustrato, liberando ácido monogalacturónico (Rombouts y Pilnik 1980).
Las enzimas pécticas microbianas son de interés comercial. Algunas tienen la capacidad de liberar sustancias pécticas cementantes de la pared celular de las plantas produciendo la maceración de tejidos vegetales (Kashyap *et al*. 2000, Ranveer *et al*. 2005, Nighojkar 2006). La maceración enzimática presenta algunas ventajas sobre la disgregación mecánica ya que conserva intactos aromas, pigmentos y otros componentes celulares, pues las células que los contienen no se destruyen. Este tratamiento es de interés en la producción de néctares de frutas, en la elaboración de purés vegetales (papa, zanahoria, etc.) y de alimentos infantiles en general, así como también en el tratamiento preliminar del café, cacao y fibras de plantas con el fin de eliminar la pulpa de fruta no deseada (Call *et al*. 1985, Ishii 1971, Nakamura *et al*. 1995).
Estudios previos demostraron que una levadura autóctona, aislada de frutas cítricas en Misiones, que crece en un medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono e inductor de la actividad pectinolítica, produce enzimas exocelulares con capacidad macerante de tejidos vegetales (papa, mandioca). El objetivo del presente estudio fue identificar dicha levadura por métodos moleculares e identificar las actividades enzimáticas posiblemente involucradas en el proceso de maceración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

Se utilizó la cepa 111 aislada en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UNAM, a partir de frutas cítricas en descomposición.

### Medios de cultivos

**Mantenimiento**. Extracto de levadura (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), 5 g/l; triptona (Bacto/Becton Dickinson and Co, Sparks, Md.) 5 g/l; glucosa bacteriológica (Britania, Buenos Aires), 10 g/l; agar (Britania), 18 g/l; pH: 5,0.
**Producción de enzimas**. Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco/Becton Dickinson and Co, Sparks, Md., EE.UU), 6,7 g/l; glucosa bacteriológica (Britania), 5,0 g/l y pectina cítrica (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), 5,0 g/l (Blanco *et al*. 1999). El medio de cultivo con sus componentes fue esterilizado a 121 ºC, 1 atm., durante 15 min., excepto la solución de YNB, la que se esterilizó en forma separada por filtración a través de membranas de celulosa (0,45 µm, Sartorius AG, Goettingen).

### Identificación de la cepa 111

La extracción de ADN se realizó aplicando extracción química/mecánica con fenol (Hoffman y Winston 1987). Se realizó PCR del fragmento 5.8S-ITS utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), seguido de digestión con enzimas de restricción (*Hinf* I, *Cfo* I y *Hae* III) (5.8S-RFLP) (Invitrogen S.A.) (Guillamón *et al*. 1998, Fernández Espinar *et al*. 2000). Los resultados de RFLP fueron contrastados con la base de datos para identificación de levaduras (UV-CSIC, 2009). El fragmento amplificado fue secuenciado para confirmar su identidad utilizando el kit comercial Premix Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, Warrington, UK), según las instrucciones del proveedor basado en el método de Sanger. La reacción de secuenciación se analizó en un equipo 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Warrington, UK). Las secuencias fueron comparadas mediante BLAST (Basic Lineal Alignment Search Tool) en las bases de datos disponibles en la página web del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) (NCBI, 2009).

### Producción de enzimas

Se inocularon frascos Erlenmeyer de 500 ml que contenían 95 ml del medio de fermentación con 5 ml de inóculo ($DO_{620}$ = 0,96). Los mismos se incubaron a 30 °C con agitación (150 rpm). Luego de 3 días se centrifugó el cultivo a 4.000 rpm durante 10 min, a 5 ºC. El sobrenadante se conservó a – 18 °C hasta su utilización como fuente de enzima extracelular. Parte del sobrenadante se liofilizó y disolvió en buffer ácido acético-acetato de Na (AcB) (20 mM, pH 5,0), utilizando un décimo del volumen de suspensión original, para preparar sobrenadante concentrado 10 ×.

## Determinación de actividades enzimáticas

**Actividad PG, celulasa y xilanasa**. Los sustratos empleados fueron ácido poligalacturónico (APG) (P-3889, Sigma), carboximetilcelulosa (CMC) (C-4947, Sigma) o xilano (X-4252, Sigma) al 0,2 % en buffer AcB (20 mM, pH 5,0). Para la determinación se incubaron 1,45 ml de la solución de sustrato con 50 µl de sobrenadante del cultivo (dilución 1/10 v/v para PG o concentrado 10 × para las otras actividades enzimáticas) a 37 °C durante 10 min y se determinó la concentración de los grupos reductores liberados con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (D-0550, Sigma) (Miller 1959). Como referencia se utilizó ácido galacturónico (AG) (G-2125, Sigma) para la determinación de PG y glucosa (G-8270, Sigma) para la actividad de celulasa y xilanasa. En los casos en que no se detectó actividad en 10 min de incubación, se repitió el ensayo con incubación durante 24 h para verificar si había hidrólisis de los sustratos. Una unidad enzimática (UE) de PG se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol del monómero por min en las condiciones de ensayo.

**Actividad pectinliasa y pectatoliasa**. Como sustratos se emplearon pectina de citrus (P-9135, Sigma) y APG al 0,5 % en AcB (20Mm, pH 5,0) para medir actividad pectinliasa (PL) y pectatoliasa (PAL), respectivamente. Para las determinaciones se incubaron 500 µl de la solución de sustrato con 10 µl del sobrenadante concentrado 10 ×; se registró continuamente la variación de absorbancia a 235 nm con un espectrofotómetro Beckman DU 640, a 37 ºC, hasta los 30 min (Albersheim 1966).

**Actividad PE**. Se determinó por cambio de color de una solución de verde de bromocresol (Anedra) durante el curso de la reacción a 37 ºC. La mezcla de reacción consistió en 500 µl de la solución de sustrato (10 vol de pectina de citrus (P-9135, Sigma) 0,5 % en agua y 1 vol de verde de bromocresol 0,02 % en agua, la solución se ajustó a pH 5,0) y 10 µl del sobrenadante concentrado 10×. La medida espectrofotométrica se efectuó a 614 nm (Villariño *et al*. 1993).

## Modo de acción de PG

Para estudiar el cambio de viscosidad resultante de la acción de PG sobre APG se colocaron 8,7 ml de solución de APG 0,5 % en buffer AcB (20 mM, pH 5,0) y 0,3 ml del sobrenadante de cultivo (dilución 1/10 v/v) en un viscosímetro Cannon-Fenske serie 100. La mezcla de reacción se incubó a 37 ºC y se midió el porcentaje de reducción de viscosidad en función del tiempo de reacción. Se determinó la concentración de los grupos reductores liberados con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), según se describió más arriba. El análisis de los productos de hidrólisis se hizo por cromatografía en capa delgada, colocando 10 µl de la mezcla de reacción inactivada (100 ºC por 5 min) en placas de Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany); la cromatografía fue realizada de modo ascendente con n-butanol: ácido acético: agua (9:4:7 v/v/v). Como patrón se utilizó AG. La detección de los productos de reacción se realizó pulverizando sobre la placa una solución al 3 % de ácido fosfomolíbdico y 10 % de $H_2SO_4$ en etanol; las placas fueron calentadas por 5 min a 105 °C para desarrollar color.

## Análisis de proteínas por cromatografía líquida

El sobrenadante de cultivo concentrado 10 × se desionizó en columna PD-10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala) equilibrada con AcB (20 mM, pH 5,0). Las muestras (1 ml) se inyectaron en una columna MonoQ (Amersham Pharmacia Biotech), acoplada a un FPLC AKTA (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con el mismo buffer. Las proteínas fueron eluídas con buffer de equilibrio seguido por un gradiente de NaCl (0 - 0,5 M). El caudal fue 1 ml/min. Se colectaron fracciones de 1 ml, a las que se determinó actividad PG.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Identificación

En la **Tabla 1** se muestran los perfiles de amplificación y restricción para la cepa estudiada y el perfil de restricción de la especie que más homología presentó en su patrón de restricción con la cepa 111. La restricción mostró un patrón diferente a las cepas de referencia disponibles en la base de datos del GeneBank (NCBI, 2009), lo que se atribuye a una posible mutación en un nucleótido que modifica un sitio de restricción de la enzima **Cfo** I (Tabla 1), por lo que la identidad del aislamiento fue confirmada mediante secuenciación. La levadura aislada fue identificada como *Pichia anomala* por el perfil de restricción obtenido y la homología en la secuencia de nucleótidos del fragmento 5.8S-ITS.

**Tabla 1:** Perfiles de amplificación y restricción de la levadura 111 y de *Pichia anómala.*

| **Cepa** | **Amplificado** | ***Hinf I*** | ***Cfo I*** | ***Hae III*** |
|---|---|---|---|---|
| 111 | 600 | 320 + 280 | 290 + 260 | 600 |
| *Pichia anomala* | 630 | 320 + 270 | 630 | 630 |

## Caracterización parcial de actividad enzimática exocelular

*Pichia anomala* fue capaz de producir PG (52 UE/ml) en medio líquido, con glucosa y pectina de citrus como fuente de carbono y energía e inductor, respectivamente. No se detectó actividad PL ni PAL en los sobrenadantes de cultivo concentrados. Luego de 24 h de incubación no se evidenció cambio de color del indicador de pH en los tubos que contenían pectina de citrus y verde de bromocresol, indicando ausencia de actividad PE. Tampoco se detectaron otras enzimas capaces de hidrolizar polímeros de la pared celular, como ser celulasa y xilanasa,

Resultados similares fueron obtenidos con *Kluyveromyces marxianus*, una levadura aislada del medio de fermentación de la pulpa de café (García *et al*. 2002) y otra levadura de la misma especie pero aislada del medio de fermentación de cacao (Schwan *et al*. 1997), cuyos extractos enzimáticos presentaron actividad PG sin actividad de PL o PAL detectables. Sin embargo, algunas levaduras pueden producir liasas, tal es el caso de *Kluyveromyces fragilis*, levadura aislada también de la fermentación de la pulpa del café (García *et al*. 2002).

En la cromatografía de intercambio aniónico (**Figura 1**) se detectó la elución de dos proteínas con actividad PG (fracción 1 a 4 y fracción 8 a 11), lo que se atribuye a dos isoenzimas con esa actividad.

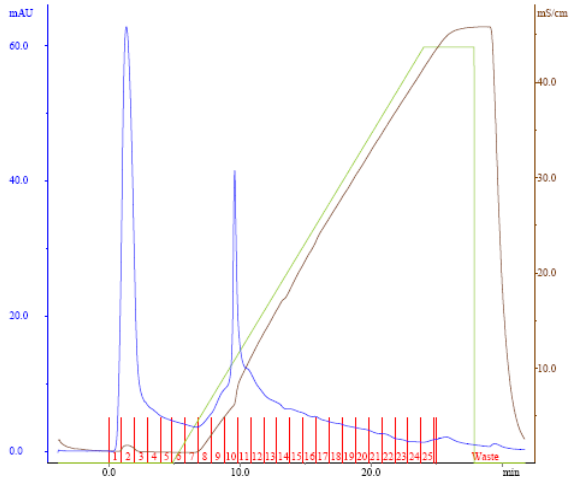


**Figura 1**. Perfil de elución del sobrenadante de cultivo de *P. anómala* obtenido en la cromatografía de intercambio iónico.

## Modo de acción de PG

La **Figura 2** muestra la reducción de viscosidad e incremento de grupos reductores en función del tiempo de reacción de una solución de APG al por acción del sobrenadante de cultivo de *P. anomala*. El sobrenadante rápidamente redujo la viscosidad de la solución de APG. La viscosidad disminuyó cerca de un 50 % en 10 min cuando solamente el 9 % de los enlaces glicosídicos del sustrato fueron hidrolizados. Este comportamiento es característico de las PG que actúan por un mecanismo de tipo endo (endo-PG) (Call y Emeis 1985, Yoshitake *et al*. 1994). La cromatografía en capa delgada de los productos de hidrólisis de APG mostró que el polímero fue inicialmente hidrolizado a oligómeros, formándose además pequeñas cantidades de AG cuya concentración fue aumentando con el tiempo de reacción. Resultados similares fueron informados para PG producidas por *Kluyveromyces wickerhamii* (Moyo *et al*. 2003), *K. marxianus* (Schwan *et al*. 1997) y *Candida macedoniensis* (Call *et al*. 1985), las que actuaron sobre los enlaces glicosídicos al azar.

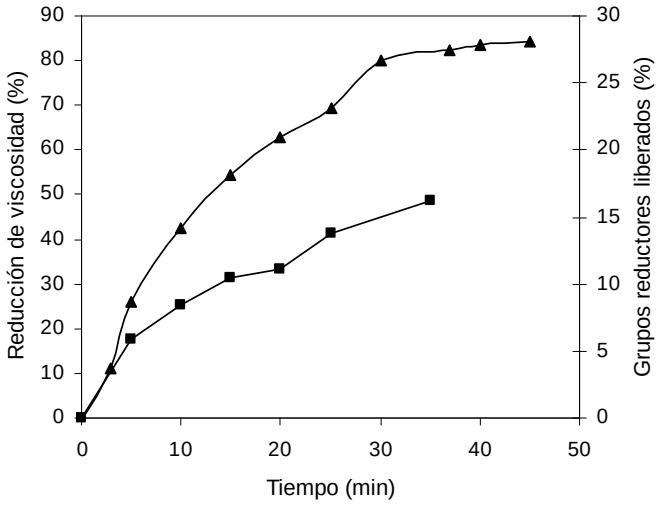


**Figura 2:** Hidrólisis de ácido poligalacturónico con sobrenadante de cultivos de de *P. anomala*.
-▲-: reducción de viscosidad. -■-: grupos reductores liberados.

## CONCLUSIONES

La levadura aislada fue identificada como *Pichia anomala*. Los resultados obtenidos mostraron que esta levadura posee un sistema pectolítico constituido fundamentalmente por dos isoenzimas con actividad poligalacturonasa., cuyo modo de acción es preferentemente del tipo endo, las que serían responsables de la capacidad de maceración de los tejidos vegetales de esta cepa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Albersheim P, Neukom H, Deuel H. 1960. Splitting of pectin chain molecules in neutral solutions. Arch. Biochem. Biophys., 90: 46-51.

Blanco P, Sieiro C, Villa TG. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. Mini Review. FEMS Microbiol. Lett.., 175: 1-9.

Call HP, Walter J, Emeis CC. 1985. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. J. Food Biochem., 9: 325-348.

NCBI, 2009. Centro Nacional de Información de Biotecnología. Instituto Nacional de Salud (NIH) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Fernández Espinar MT, Esteve Zarzoso B, Querol A, Barrio E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek, 78: 87–97.

García AR, Balbín MI, Cabrera JC, Castelvi A. 2002. Actividad endopoligalacturonasa de un preparado de la levadura *Kluyveromyces marxianus* aislada de la pulpa de café. Cultivos Tropicales, 23: 67-72.

Guillamón JM, Sabate J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer ITS region. Arch. Microbiol., 169: 387–392.

Ishii S, Yokotsuka T. 1971. Maceration of plant tissues by pectin trans-eliminase. J. Agric. Food Chem., 20: 787–791.

Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently release autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. Gene, 57: 267-272.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2000. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technol., 77: 215-227.

Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426 –428.

Moyo S, Gashe BA, Collison EK, Mpuchane S. 2003. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. Int. J. Food Microbiol., 85: 87-100.

Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food Sci., 60:468-472.

Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. Process Biochem., 41: 1136-1140.

Ranveer SJ, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem., 40: 2931–2944.

Rombouts FM, Pilnik W. 1980. Microbial Enzymes and Bioconversions. Ed. A.H. Rose. Academic Press, London. Vol. 5.

Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. Enzyme Microb. Technol., 21:234-244.

(UV-CSIC) 2009. Universidad de Valencia–Centro Superior de Investigaciones Científicas.. Base de datos para la identificación de levaduras utilizando 5.8S-ITS RFLP. http://yeast-id.com.

Vilariño C, Del Giorgio JF, Hours RA, Cascone O. 1993. Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. Lebensm-Wiss U-Technol., 26: 107-110.

Yoshitake S, Numata T, Katsuragi T, Hours RA, Sakai T. 1994. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. J. Ferment. Bioeng., 77:370-375.

# Influencia de la concentración de sacarosa y lactosa sobre la coagulación enzimática de micelas de caseína bovina inducida por quimosina

# Sucrose and lactose concentration influence on the enzymatic coagulation of bovine casein micelle induced by chymosin

Messa MM, Risso PH

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina
phrisso@yahoo.com.ar

## RESUMEN

En la leche, las caseínas (CN) se encuentran formando parte de partículas coloidales estables más o menos esféricas, de 80 a 680 nm de diámetro, llamadas micelas de caseína (MC). La estabilidad de la suspensión coloidal se debe a la repulsión electrostática entre partículas de similar carga neta negativa y a la repulsión estérica generada por la porción hidrofílica de kappa-CN que sobresale de la superficie micelar a modo de pelos. La quimosina escinde dicho extremo hidrofílico, ocasionando agregación espontánea de las micelas de para-caseína formadas (MpC), por pérdida de la repulsión estérica y disminución de su carga neta. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la concentración de sacarosa (S) o lactosa (L) (0 a 20 g/L) sobre la etapa de agregación luego de la hidrólisis enzimática de las MC, y su efecto sobre la estructura de los agregados formados. Se estudió la cinética de agregación inicial de las partículas luego de la adición de quimosina a una suspensión de MC (0,2 g/L); se determinó la velocidad inicial de agregación o floculación ($v_i$). Se calculó la dimensión fractal ($D_f$) de los agregados formados. Se determinó la viscosidad de las soluciones de azúcares. Se observó un aumento de $D_f$ de los agregados en presencias de los azúcares, con un máximo a 7 g/L de S y 5 g/L de L. Se puede inferir que la presencia de los azúcares genera dos efectos opuestos: la disminución de la agregación debido al aumento de viscosidad del medio, lo que limita la difusión de las partículas de MpC; y el aumento de la interacción proteína-proteína por exclusión preferencial del azúcar de la interfase micela-solución favoreciendo así la asociación interparticular. Del balance entre ambos efectos simultáneos depende el estado final de los agregados formados. La formación de agregados menos compactos en presencia de L que de S, a la misma concentración, puede ser atribuida a que el medio con L tiene mayor viscosidad que el medio con S.

## ABSTRACT

In natural milk, caseins (CN) occur as stable colloidal particles roughly spherical, with a diameter ranging from 80 to 680 nm, known as casein micelles (MC). The colloidal stability is due to the electrostatic repulsion between particles with the similar negative charge and to the steric repulsion caused by the hydrophilic portion of kappa-CN which protrude from the CM surface like a “hairy layer”. Chymosin splits up this hydrophilic moiety producing the spontaneous aggregation of para-casein micelles (MpC), due to the steric destabilization and the decrease of its net charge. The aim of this research was evaluate the effect of the sucrose (S) or lactose (L) concentrations (0 to 20 g/L) on the aggregation stage after the enzymatic hydrolysis of MC, and its effect on the structure of aggregates formed. The kinetic of the initial aggregation of particles after the addition of chymosin to a MC suspension (0,2 g/L) was studied; the initial aggregation or flocculation rate ($v_i$) was determined. The fractal dimension of formed aggregates ($D_f$) was estimated. We determined the variation of the medium viscosity due to sugars addition. L produced the biggest increase of viscosity for a same concentration of sugars. It was observed an increment of $D_f$ of aggregates in presence of sugars, with a maximum at 7 g/L of S and 5 g/L of L; $D_f$ of aggregates diminished in presence of higher sugars concentrations. It can be inferred that the presence of sugars generate two opposite effects: the aggregation decrease due to the increment of the medium viscosity limiting the diffusion of MpC particles; and the increase of protein-protein interaction because of the preferential exclusion of the sugar from the micelle-solution interface favouring the inter particular association. The final state of formed aggregates depends of the balance between both effects. The formation of aggregates less

compact in the presence of L than in the presence of S, at the same concentration, can be attributed to the medium with L has higher viscosity than the medium with S.

**PALABRAS CLAVE**: *micelas de caseína, coagulación enzimática, sacarosa, lactosa.*

**KEYWORDS**: *casein micelles, enzymatic coagulation, sucrose, lactose.*

## INTRODUCCIÓN

Las micelas de caseína (MC) de la leche son partículas coloidales más o menos esféricas, de diámetro variable, que comprenden de 20 a 150.000 moléculas de los distintos tipos de caseínas (CN), con alto contenido de material inorgánico formado principalmente por iones calcio y fosfato, altamente hidratadas y con elevado volumen por unidad de masa. Los distintos modelos propuestos hasta hoy para la estructura micelar pueden resumirse en dos propuestas: el modelo de "submicelas" y el modelo de "malla o red" (Walstra 1999).

Cualquiera sea el modelo aceptado, la estabilidad de las MC está relacionada con la repulsión electrostática que tiene lugar entre las cargas negativas de las MC y a factores estéricos vinculados con la porción hidrofílica de las cadenas de κ-CN que sobresalen de la superficie micelar a modo de "pelos" (Tuinier y de Kruif 2002).

Durante la coagulación enzimática, la quimosina contenida en el cuajo hidroliza las cadenas κ-CN de la superficie micelar (primera etapa) desencadenando la floculación o agregación de las micelas de paracaseína (MpC) por pérdida de la estabilidad estérica y disminución de su carga neta (segunda etapa) con formación de un gel semi-firme, del que luego, en la sinéresis, comienza a separarse el suero (tercera etapa) (Carlson *et al.* 1987a y b).

La presencia de cosolutos capaces de producir incremento en la viscosidad del medio puede influir sobre la velocidad de la etapa de agregación de las MpC durante la coagulación enzimática. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la concentración de sacarosa (S) y lactosa (L) sobre la etapa de agregación, luego de la hidrólisis enzimática de las MC y las consecuencias de este efecto sobre la estructura de los agregados formados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Las suspensiones de MC fueron suspensiones de leche descremada deshidratada SVELTY (Nestlé Argentina S.A., Buenos Aires) reconstituida al 10% P/V en una solución de $CaCl_2$ 5 mM. Se determinó la concentración proteica mediante el método de Kuaye (1994). Se le agregó azida sódica como preservante microbiano en concentración 0,01-0,02% P/V y se almacenó 24 h a 4 °C antes de ser usada.

Como enzima proteolítica se utilizó cuajo líquido comercial (Hansen), proveniente del abomaso de terneros mamones, donado por COTAR S.A. (Rosario, Argentina). La actividad coagulante de leche de esta preparación es 0.03 RU, donde 1 RU es la actividad requerida para coagular en 100 s 10 ml de una suspensión de leche deshidratada reconstituida en $CaCl_2$ 10 mM a pH no ajustado (aproximadamente 6,4), en condiciones especificadas (estándar IDF 110A:1987).

### Métodos

Se prepararon diluciones de MC (0,2 g/L) en buffer Tris-HCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM, pH 6,4. A estas diluciones de les agregó S o L (0 a 20 g/L). La suspensión de la enzima se preparó por dilución 1/8 V/V del cuajo en agua destilada.

La coagulación enzimática se inició por adición de 100 μl de suspensión de quimosina a 3 mL de las diluciones de MC, con o sin S o L. En estas condiciones, con exceso de enzima, la etapa de agregación (segunda etapa) determina la velocidad del proceso de coagulación enzimática. Se realizaron espectros de absorción, a 35°C, en el rango de 450 a 650 nm, antes y después de adicionada la quimosina y en función del tiempo, cada 0,5 o 1 min, y hasta aproximadamente los 20-25 min, tiempo en que se alcanzó un valor de absorbancia (A) constante. Se utilizó un espectrofotómetro UV/visible con arreglo de diodo SPEKOL 1200 (Analytik Jena AG, Jena), con portacubetas termostatizable. En dicho rango de longitud de onda (λ), las medidas de A estiman la turbidez (τ) del sistema, ya que no hay absorción de los grupos cromóforos proteicos. Se calculó la velocidad inicial de la etapa de agregación ($v_i$) como

$(\partial\tau/\partial t)_0$ para cada concentración de S y L. El grado de compactación de los agregados formados se evaluó como dimensión fractal ($D_f$) de los mismos, máximo valor del parámetro $\beta$ (Horne 1987). En un trabajo anterior se ha demostrado la correlación lineal entre $\beta$ y el tamaño medio de las partículas medido por dispersión dinámica de la luz (Risso *et al*. 2007). Este parámetro se puede calcular a partir de la pendiente de gráficos log $\tau$ vs. log $\lambda$, midiendo $\tau$ en el rango 450-650 nm, rango en donde no hay absorción de los grupos cromóforos proteicos, a cortos intervalos de tiempo, durante el tiempo necesario para alcanzar un máximo de $\tau$ durante la agregación de las MC, utilizando la ecuación siguiente:

$$\beta = 4{,}2 + \frac{\partial \log \tau}{\partial \log \lambda}$$

Se calculó la viscosidad relativa de cada dilución de MC con o sin agregado de S o L con la ecuación $\eta_r = \rho t/\rho_0 t_0$, siendo $\rho$ la densidad de la dilución, $\rho_0$ la densidad del buffer sin azúcar, t y $t_0$ el tiempo de escurrimiento de la dilución y del tampón, respectivamente. Los tiempos de escurrimiento se midieron con un viscosímetro de Ostwald termostatizado a 35 °C.

## Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado. El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa Sigma-Plot Versión 10.0 (Systat Software, Inc.). Las relaciones entre variables fueron analizadas estadísticamente por análisis de correlación. Se aplicó análisis de regresión a los gráficos log $\tau$ vs. log $\lambda$.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La velocidad inicial de agregación de las partículas hidrolizadas por quimosina y la turbidez máxima alcanzada dependieron de la concentración de S o L presente (**Tabla 1**). La $D_f$ de los agregados obtenidos aumenta en presencia de los azúcares hasta una concentración 7 g/L de S y 5 g/L de L (**Tabla 2**). Por encima de dichos valores, la $D_f$ de los coágulos disminuye. Esto implica que los agregados formados aumentan progresivamente el grado de compactación a medida que aumenta la concentración de ambos azúcares hasta una determinada concentración y tienen un comportamiento inverso por encima de la misma. Los valores de $D_f$ en presencia de S siempre fueron mayores que en presencia de L, para todas las concentraciones ensayadas. La **Tabla 3** muestra el aumento regular de $\eta_r$ al aumentar la concentración de azúcares, siendo este incremento mayor para L.

**Tabla 1.** Velocidad inicial de agregación ($v_i$) de las MpC y turbidez máxima ($\tau_{máx}$)alcanzada en presencia de sacarosa (S) o lactosa (L).

| Concentración de S (g/L) | $v_i$ ($min^{-1}$) | $\tau_{máx}$ | Concentración de L (g/L) | $v_i$ ($min^{-1}$) | $\tau_{máx}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,0 | 0,11 ± 0,01 | 0,413 ± 0,003 | 0,0 | 0,11 ± 0,01 | 0,413 ± 0,003 |
| 1,0 | 0,09 ± 0,03 | 0,470 ± 0,002 | 1,0 | 0,08 ± 0,02 | 0,428 ± 0,001 |
| 3,0 | 0,08 ± 0,01 | 0,472 ± 0,002 | 3,0 | 0,08 ± 0,01 | 0,430 ± 0,002 |
| 5,0 | 0,06 ± 0,02 | 0,487 ± 0,005 | 5,0 | 0,06 ± 0,01 | 0,496 ± 0,001 |
| 7,0 | 0,06 ± 0,01 | 0,494 ± 0,002 | 7,0 | 0,09 ± 0,02 | 0,515 ± 0,002 |
| 10,0 | 0,10 ± 0,03 | 0,492 ± 0,001 | 10,0 | 0,12 ± 0,03 | 0,474 ± 0,004 |
| 15,0 | 0,15 ± 0,03 | 0,437 ± 0,002 | 15,0 | 0,15 ± 0,03 | 0,447 ± 0,003 |
| 20,0 | 0,24 ± 0,02 | 0,443 ± 0,001 | 20,0 | 0,17 ± 0,02 | 0,436 ± 0,005 |

**Tabla 2.** Dimensión fractal ($D_f$) de los agregados obtenidos en función de la concentración de sacarosa (S) o lactosa (L) adicionada.

| Concentración de azúcar (g/L) | $D_f$ en presencia de S | $D_f$ en presencia de L |
|---|---|---|
| 0,0 | 2,330 ± 0,003 | 2,330 ± 0,003 |
| 1,0 | 2,411 ± 0,005 | 2,366 ± 0,005 |
| 3,0 | 2,420 ± 0,003 | 2,370 ± 0,007 |
| 5,0 | 2,500 ± 0,008 | 2,435 ± 0,005 |
| 7,0 | 2,525 ± 0,002 | 2,424 ± 0,003 |
| 10,0 | 2,470 ± 0,005 | 2,380 ± 0,007 |
| 15,0 | 2,435 ± 0,005 | 2,392 ± 0,007 |
| 20,0 | 2,464 ± 0,004 | 2,391 ± 0,008 |

**Tabla 3.** Viscosidad relativa ($\eta_r$) en función de la concentración de azúcar adicionada

| Concentración de azúcar (g/L) | $\eta_r$ en presencia de S | $\eta_r$ en presencia de L |
|---|---|---|
| 0,0 | 1,000 ± 0,002 | 1,000 ± 0,002 |
| 1,0 | 1.002 ± 0,001 | 1.003 ± 0,002 |
| 3,0 | 1.004 ± 0,001 | 1.005 ± 0,001 |
| 5,0 | 1.010 ± 0,001 | 1.015 ± 0,001 |
| 7,0 | 1.008 ± 0,002 | 1.021 ± 0,002 |
| 10,0 | 1.017 ± 0,001 | 1.027 ± 0,002 |
| 15,0 | 1.031 ± 0,001 | 1.037 ± 0,001 |
| 20,0 | 1.040 ± 0,002 | 1.049 ± 0,002 |

El análisis de estos resultados estaría indicando la existencia simultánea de dos efectos opuestos. Por un lado, la disminución de la agregación debido al aumento de $\eta_r$, que limita la difusión y por ende disminuiría el número total de choques efectivos entre las partículas de MpC, efecto que prevalece en presencia de concentraciones mayores a 7 g/L de S o 5 g/L de L. Por otro lado, la introducción de la proteína en una solución de azúcares de bajo peso molecular es termodinámicamente desfavorable y produce la agregación y/o precipitación de las moléculas de proteína (Arakawa y Timasheff 1982, Timasheff 1994, Belyakova *et al* 2003). El origen de este fenómeno puede ser una repulsión específica entre un sitio determinado de la proteína y el azúcar o un efecto inespecífico que desplaza el azúcar hacia el seno de la solución respecto de la superficie interfacial, produciendo un aumento de la tensión superficial del agua en la interfase proteína-solución. Esto conduce a la exclusión del azúcar de dicha interfase y lleva al sistema a reducir la superficie de contacto entre proteína y agua. La exclusión preferencial de los azúcares produce una zona de exclusión en el entorno proteico la que tiende a reducirse para hacer mínima la energía libre del sistema, promoviendo la auto-asociación de las MpC y, por lo tanto, la floculación de las mismas (Timasheff 1992). Este efecto sería el que predomina en presencia de concentraciones inferiores a 7 g/L de S o 5 g/L de L. El hecho de que en presencia de L se forman agregados menos compactos que en presencia de S, se puede explicar por la menor difusión de las MpC en el primer caso debido a la mayor viscosidad del medio.

## CONCLUSIONES

Sacarosa y lactosa afectaron el proceso de floculación de las MC hidrolizadas con quimosina. Estos azúcares generan dos efectos simultáneos opuestos: el aumento de la viscosidad del medio que disminuye la difusión de las partículas hidrolizadas dificultando su agregación y la exclusión preferencial de dichos sacáridos de la interfase MC-solución favoreciendo la floculación. El estado final de los agregados formados depende del balance entre ambos efectos simultáneos. La naturaleza del azúcar y su concentración condicionan el efecto prevaleciente.


## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Rosario.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arakawa T, Timasheff S. 1982. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21: 6536-6544.

Belyakova LE, Antipova AS, Semenova MG, Dickinson E, Merino LM, Tsapkina EN. 2003. Effect of sucrose on molecular and interaction parameters of sodium caseinate in aqueous solution: relationship to protein gelation. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 31: 31-46.

Carlson A, Hill C, Olson N. 1987a. Kinetics of milk coagulation: I. The kinetics of kappa casein hydrolysis in the presence of enzyme deactivation. Biotechnology and Bioengineering, 29: 582-589.

Carlson A, Hill C, Olson N. 1987b. The kinetics of milk coagulation: IV. The kinetics of the gel-firming process. Biotechnology and Bioengineering, 29: 612-624.

Horne DS. 1987. Determination of the fractal dimension using turbidimetric thechniques. Application to aggregatting protein systems. Faraday Discussions, Chemical Society, 83: 259-270.

Kuaye AY. 1994. An ultraviolet spectrophotometric method to determine milk protein content in alkaline medium. Food Chemistry, 49: 207-211.

Risso PH, Relling VM, Armesto MS, Pires MS, Gatti CA. 2007. Effect of size, protein composition and heat treatment on the colloidal stability of proteolyzed bovine casein micelles. Colloid and Polymer Science, 285: 1435-1536.

Timasheff SN. 1992. Water as ligand: Preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. Biochemistry, 31: 9857-9864.

Timasheff SN. 1994. Preferential interactions of water and cosolvents with proteins. In Gregory RB. Protein-solvent interactions. Ed. Marcel Dekker, New York, USA, Cap. 11, p. 445-482.

Tuinier R, de Kruif CG. 2002. Stability of casein micelles in milk. Journal of Chemistry and Physics, 117: 1290-1295.

Walstra P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist?. International Dairy Journal, 9: 189-192.

# Proteólisis secundaria y bioformación de flavour en quesos por cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos

# Secondary proteolysis and flavour development in cheeses by adjunct cultures of mesophilic lactobacilli

Milesi MM, Wolf IV, Bergamini CV, Hynes ER

Instituto de Lactología Industrial, UNL-CONICET, Santa Fe, Argentina. cvberg@fiq.unl.edu.ar

## RESUMEN

Los cultivos adjuntos de lactobacilos mesófilos están compuestos por cepas de bacterias lácticas de origen no fermento, aisladas de quesos y cuidadosamente seleccionadas, que a diferencia del fermento iniciador, no cumplen el rol tecnológico de acidificar la leche o la cuajada. Su principal objetivo está dirigido a controlar el crecimiento de la microflora adventicia potencialmente perjudicial, a fin de obtener productos de calidad satisfactoria y constante. Asimismo, aquellos adjuntos que presenten atributos metabólicos interesantes pueden ser utilizados para incrementar la producción de compuestos de aroma y sabor, o para acelerar el proceso de maduración de los quesos. En el presente trabajo se evaluó la contribución de dos cepas de lactobacilos mesófilos aisladas de quesos, *Lactobacillus casei* I90 y *Lb. plantarum* I91, a la proteólisis secundaria y a la bioformación de compuestos de flavour en un modelo de queso Cremoso miniatura. Para ello, se elaboraron quesos bajo condiciones microbiológicas controladas, con o sin adición de *Lb. plantarum* I91 o *Lb. casei* I90; como fermento primario se empleó un cultivo liofilizado de *Streptococcus thermophilus*. Durante la maduración de los quesos, ambos cultivos adjuntos incrementaron el contenido total de aminoácidos con respecto a los controles, y modificaron el perfil de aminoácidos libres, al aumentar significativamente la concentración de varios aminoácidos, entre ellos el ácido aspártico. Los quesos inoculados con las cepas en estudio se caracterizaron por presentar una mayor concentración de diacetilo y acetoína. También se verificó un aumento del ácido láctico, pero ningún incremento del ácido acético, que puede ocasionar efectos de flavour desfavorables y atípicos. En los quesos testigos, por otra parte, se encontraron mayores concentraciones de ésteres. El análisis multivariante de los perfiles de ácidos orgánicos y compuestos volátiles, confirmó una clara diferenciación entre quesos con y sin fermentos adjuntos a los 60 días de maduración. El mayor contenido de ácido aspártico en los quesos con cultivos adjuntos, sumado al aumento en la concentración de diacetilo y acetoína, sugieren un incremento en el catabolismo de este aminoácido, con la producción de los compuestos volátiles derivados. Finalmente, mediante ensayo sensorial triangular simple se demostró que ambas cepas mejoraron los atributos sensoriales del queso Cremoso miniatura, al intensificar la nota "aroma a manteca", deseable en esta variedad. *Lb. casei* I90 y *Lb. plantarum* I91 evidenciaron un buen desempeño en la bioformación de aroma y la intensificación de la peptidólisis en quesos, lo que se asocia con una mejora en la calidad sensorial del alimento y un tiempo de maduración reducido.

## ABSTRACT

Adjunct cultures of mesophilic lactobacilli consist of strains of non-starter lactic acid bacteria, isolated from good quality cheeses and carefully selected, that unlike starter cultures, are not aimed to acidify milk or curd during cheese-making. Their main objective is to increase the control over cheese microbiota to avoid the growth of potentially spoiling microorganisms, providing quality and consistency to the final products. Besides, adjunct cultures that possess interesting metabolic attributes can be addressed to increase the production of compounds that influence on aroma and taste, or to accelerate cheese ripening. In this work, we assessed the contribution to secondary proteolysis and flavour biogeneration of two strains of mesophilic lactobacilli isolated from cheese: *Lactobacillus casei* I90 and *Lactobacillus plantarum* I91. For that purpose, miniature cheeses were obtained under controlled microbiological conditions, with or without an adjunct culture of *Lb. plantarum* I91 or *Lb. casei* I90; as primary starter, a lyophilized culture of *Streptococcus thermophilus* was used. During cheese ripening, both adjunct cultures increased free amino acids total content and modified free

amino acids profile, by selectively increasing some amino acids, among them aspartic acid. Cheeses inoculated with the strains tested were characterized by a higher concentration of diacetyl and acetoin. Lactic acid was also increased by adjunct cultures, but this effect was not verified for acetic acid, which is an advantage as the later can cause atypical aroma and off-flavours. On the other hand, in control cheeses it was verified a higher amount of esters than in adjunct-treated cheeses. Multivariate analysis on organic acids and volatile compounds confirmed a clear differentiation between cheeses with and without adjunct cultures. The increased content in aspartic acid in the cheeses with added lactobacilli, plus the raise verified in diacetyl and acetoin concentration, suggested an increase in the catabolism of aspartic acid, with the production of the derived aroma compounds. Finally, a triangular "sniffing" test showed that sensory attributes of adjunct-treated cheeses were improved as regard to the controls, by intensifying the buttery aroma, desirable in this cheese variety. Both *Lb. casei* I90 and *Lb. plantarum* I91 showed a good performance as adjunct cultures by influencing positively on cheese flavour development and cheese peptidolysis, biochemical events associated with the improvement of the sensory quality and the reduction of ripening time.

**PALABRAS CLAVE**: *cultivos adjuntos para quesería, aminoácidos libres, aroma.*

**KEYWORDS**: *adjunct culture, cheese-making, free amino acid, aroma.*

## INTRODUCCIÓN

Los fermentos adjuntos para quesería se definen como cultivos lácticos que se agregan a la leche con un fin diferente a la acidificación. Muchos de ellos consisten en lactobacilos mesófilos aislados de quesos de buena calidad, seleccionados en base a sus propiedades tecnológicas. Los adjuntos se han propuesto como una estrategia para aumentar el control sobre la microbiota del queso y los fenómenos bioquímicos de la maduración, de manera de obtener productos de calidad satisfactoria y constante. Por otro lado, estos cultivos pueden incrementar la velocidad de maduración, especialmente a través del aumento de la proteólisis secundaria, o contribuir a la formación de compuestos de aroma y sabor en quesos, incidiendo así de manera directa en la calidad de los productos (Crow *et al.* 2001).

El catabolismo de los aminoácidos es la ruta metabólica más importante en la biogeneración del flavour de la mayoría de los quesos. Las bacterias lácticas inician esta transformación principalmente mediante una etapa de transaminación. La reacción es catalizada por la enzima aminotransferasa, que transforma el aminoácido en su correspondiente cetoácido en presencia de un aceptor de grupo amino. Se han aislado aminotransferasas de bacterias lácticas con actividad específica sobre ácido aspártico, aminoácidos ramificados y aminoácidos aromáticos; además, algunas de estas enzimas presentan actividad sobre metionina (Yvon 2006). Luego de la transaminación, los α-cetoácidos se constituyen en compuestos intermediarios centrales, que pueden ser hidrogenados a α-hidroxiácidos, decarboxilados a aldehídos, o convertirse en acetil-CoA ésteres. A su vez estos últimos pueden ser transformados en ácidos carboxílicos. Los aldehídos pueden dar lugar a ácidos carboxílicos o alcoholes. Todos los compuestos mencionados, con excepción de los α-hidroxiácidos, contribuyen al aroma del queso (Smit 2004, Yvon 2006).

En cuanto a la proteólisis secundaria, su principal contribución al aroma del queso es la de proveer precursores para la formación de compuestos volátiles, esto es, aminoácidos libres. Además, esta transformación puede tener un impacto directo en el sabor, mediante la formación o degradación de péptidos de gusto amargo (Fox 2003).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la contribución de dos cepas de lactobacilos mesófilos aislados de quesos, *Lactobacillus plantarum* I91 y *Lactobacillus casei* I90, a la proteólisis secundaria, el desarrollo de compuestos volátiles y el aroma en quesos blandos. Para ello, las cepas seleccionadas se ensayaron como cultivos adjuntos en un modelo de queso Cremoso miniatura elaborado en condiciones asépticas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivos adjuntos

Se utilizaron cultivos adjuntos de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, ambas cepas aisladas en el Instituto de Lactología Industrial de un queso Tybo de buena calidad de dos meses de maduración. Las

cepas fueron objeto de estudios *in vitro* en los que demostraron propiedades tecnológicas adecuadas para su uso en quesería y potencial como organismos probióticos (Bude-Ugarte *et al.* 2006, Briggiler-Marcó *et al.* 2007). Las cepas se cultivaron *overnight* en caldo MRS a 34 ºC (dos cultivos sucesivos) a partir del stock, mantenido a -80 ºC en caldo MRS suplementado con glicerol (15% v/v) como crioprotector. Una alícuota del cultivo *overnight*, suficiente para proveer $10^6$ UFC/ml en la leche de elaboración de quesos, se centrifugó a 8000 g y 4 ºC por 20 min. El pellet se lavó dos veces con buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7), y se resuspendió en leche descremada estéril inmediatamente antes de adicionar a la leche de elaboración.

## Elaboración de miniquesos

Se llevaron a cabo dos experiencias de elaboración de quesos miniatura, uno para cada cepa en estudio, *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90, que se identificaron como Experiencia 1 y Experiencia 2, respectivamente. Cada experiencia consistió en cuatro elaboraciones de queso miniatura, que se efectuaron en días distintos y con leche diferente. Se trabajó en condiciones microbiológicamente controladas, de acuerdo al procedimiento descripto por Milesi *et al.* (2007). En cada elaboración se obtuvieron 4 miniquesos de unos 200 g cada uno, a partir de 2 L de leche pasteurizada (65 ºC - 30 min): dos controles (C1 y C2, según la experiencia) que contenían únicamente *Streptococcus thermophilus* como fermento primario, y dos quesos experimentales que fueron adicionados del fermento primario *S. thermophilus* y de un fermento adjunto: *Lb. plantarum* I91 (E1) o *Lb. casei* I90 (E2) según la experiencia. Los quesos se envasaron al vacío y se maduraron a 5 ºC por 60 días. Durante el moldeo (tiempo 0) y luego de 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración, se tomaron muestras para el análisis de los productos.

## Análisis de quesos

### Composición global y pH

La composición global y el pH de los quesos se determinaron a los tres días de maduración por métodos normalizados. Se cuantificó humedad por secado en estufa (102 ± 1 ºC), materia grasa por butirometría y contenido de proteínas según el método de Kjeldahl (IDF 1982, IDF 1997 y IDF 1993, respectivamente).

### Recuentos microbiológicos

Se efectuaron recuentos microbiológicos en muestras de 0, 3, 15, 30, 45 y 60 días de maduración. Las bacterias lácticas del *starter* se enumeraron en agar leche descremada - Skim Milk Agar (SMA) después de incubar a 37 ºC 48 h (Frank *et al.* 1993). Los lactobacilos se enumeraron en agar MRS después de 48 h a 34 ºC en condiciones de microaerofilia. Las bacterias coliformes se contaron en agar Bilis Rojo Violeta (BRVA) después de 24 h de incubación a 32 ºC (Christen *et al.* 1993), y los hongos y levaduras en agar YGCA luego de 5 días a 25 ºC (Frank *et al.* 1993).

### Cromatografía líquida

La proteólisis secundaria se evaluó por medio del contenido individual y total de aminoácidos libres (AAL). Ambos se determinaron en muestras de queso de 3 y 60 días por una metodología de cromatografía líquida descripta por Bergamini (2007).

Por otro lado, se determinaron ácidos orgánicos y acetoína en los quesos; se utilizó una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H de 300 x 7,8 mm de forma iónica hidrógeno, con fase estacionaria compuesta de estireno-divinilo benceno (Bio-Rad, CA, USA). La separación cromatográfica se llevó a cabo bajo un flujo isocrático de 0,6 mL/min de ácido sulfúrico 0,01 M, a 65 ºC. La detección se realizó a 210 nm para ácido cítrico, pirúvico, succínico, láctico, acético y a 285 nm para los ácidos orótico y úrico. La acetoína y el ácido propiónico, que no se separan totalmente, se cuantificaron considerando el área a ambas longitudes de onda, considerando que la acetoína absorbe a 210 y 285 nm mientras que el ácido propiónico sólo absorbe a 210 nm. Para la cuantificación, se construyeron curvas de calibrado utilizando patrones de los ácidos orgánicos (Sigma Aldrich). Las muestras consistieron en extractos de queso soluble en agua: 5,00 g de muestra se disgregaron con 15 mL de agua destilada, se mantuvo en un baño maría a 40 ºC durante 1h, se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos y finalmente se trasvasó a un matraz de 25 mL, previo filtrado a través de papel de filtrado rápido. Una alícuota de este extracto fue filtrada a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Millex, Millipore, São Paulo, Brazil), y un volumen de 60 µL se inyectó en el HPLC. Se analizaron quesos de 3 y 60 días.

Para las dos metodologías de cromatografía líquida aplicadas (aminoácidos libres y ácidos orgánicos) se utilizó un equipo HPLC que consta de una bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector

manual y detector UV/vis. Se dispone también de una interfase analógica y computadora provista de la aplicación Turbochrom®, para la adquisición y procesamiento de datos cromatográficos, todo de Perkin Elmer Series 200 (Perkin Elmer, Norwalk, Estados Unidos).

**Cromatografía gaseosa**

Los compuestos volátiles se determinaron mediante extracción en fase sólida en el espacio libre de cabeza de muestras de queso de 3 y 60 días, seguida de cromatografía gaseosa. Las muestras de queso (5 g) se colocaron en recipientes de vidrio de 30 mL cerrados herméticamente con un sello de aluminio y un septum de teflón. Los recipientes se prepararon el día previo al análisis y se mantuvieron refrigerados a 4 ºC. Antes del análisis las muestras se termostatizaron a 40 ± 1°C por 10 min, luego de lo cual se introdujo la fibra SPME (1cm x 50/30μm Stable-Flex DVB/CAR/PDMS, Supelco, Bellafonte, PA) mediante un *holder* manual (Supelco, Bellafonte, PA) y se expuso en contacto con el espacio de cabeza de la muestra por 30 min.

Con el objetivo de identificar los compuestos volátiles, la separación se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con una columna PE-Wax (polietilenglicol, 60 m, 0,25 mm diámetro interno, 0,25 μm espesor de film) acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Shimadzu QP-5000). La espectrometría de masas se realizó en el modo de ionización por impacto de electrones, bajo las siguientes condiciones: potencial de ionización 70 eV, temperatura de la fuente 260 °C, rango de adquisición 42 a 300 m/z y velocidad de barrido 250 amu/seg. Se programó la temperatura de columna según el perfil: 45 °C (4min), 5 °C/min hasta 150 °C (35 min), 8 °C/min hasta 250 °C (12,5 min). Los compuestos volátiles adsorbidos en la fibra se desorbieron térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases durante la inyección de la muestra, 5 min a 250 °C. La inyección se llevó a cabo en modo *splitless*, y la válvula del *split* se abrió 5 min después de la inyección (*split* 1:60). Los compuestos se identificaron por comparación de los espectros con la biblioteca de espectros de compuestos patrones del equipo. La identidad de aquellos analitos presentes en bajos niveles, por debajo de los límites de detección del MS, se halló por comparación de los tiempos de retención, inyectando estándares (Sigma Aldrich); en este caso la detección fue con ionización de llama (FID), de mayor sensibilidad. También se utilizó esta metodología para confirmar la identidad de los compuestos individualizados por la biblioteca.

Todas las inyecciones se repitieron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Series 9000 con el objetivo de cuantificar los picos en los cromatogramas, expresando el resultado en unidades arbitrarias de área, y a los fines de comparar los perfiles de los distintos quesos. Este cromatógrafo está equipado con inyector *split/splitless* y acoplado a un detector de ionización de llama (FID). La separación se llevó a cabo en la misma columna y bajo las mismas condiciones descriptas para el CG-MS. Todas las muestras se inyectaron por duplicado.

**Aroma**

El aroma de los quesos se valoró al final de la maduración mediante un ensayo sensorial triangular según lo descripto por Milesi *et al.* (2007). El objetivo de este test es determinar la muestra diferente entre tres provistas (dos iguales y una distinta); en este caso se utilizó para comparar el aroma de los quesos con lactobacilos adjuntos y con el de los controles (prueba de *sniffing*). Se ampliaron los requerimientos a los panelistas con respecto al ensayo triangular simple, ya que se les solicitó describir las diferencias halladas (AFNOR, NF V09-013, 1995).

## Análisis estadístico

Los datos de composición global, recuentos microbiológicos y aminoácidos libres se analizaron por ANOVA de una vía con un nivel de confianza de 95%, y las medias se compararon mediante test post-hoc cuando las diferencias halladas resultaron significativas. Los perfiles de péptidos, aminoácidos libres, ácidos orgánicos y compuestos volátiles se analizaron por el método de componentes principales (ACP) (Bergamini *et al.* 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los quesos con cultivos adjuntos no fueron significativamente diferentes de los controles en lo que hace a su composición global y pH. En las muestras de ambas experiencias, la humedad estuvo comprendida entre 50,54 – 52,09 %, mientras los rangos de contenido de proteínas y materia grasa fueron de 19,23 – 20,13 % y 23,60 – 25,67 %, respectivamente. El pH se mantuvo entre 5,17 y 5,29 en todos los casos. Estos valores son similares a los informados previamente para quesos miniatura y son

también representativos de quesos Cremoso comerciales (Milesi *et al.* 2007)
En la **Tabla 1** se presentan los resultados de recuentos microbiológicos. El fermento láctico *S. thermophilus* alcanzó niveles de $10^9$ UFC/g después de la elaboración de quesos, que se mantuvieron constantes durante la maduración. Este resultado se verificó en quesos de las dos experiencias, ya sea con lactobacilos agregados o controles, lo que sugiere que las cepas de lactobacilos no mostraron interacciones positivas o negativas con el fermento primario.

**Tabla 1.** Recuentos de la microflora láctica y no láctica durante la maduración de los quesos Cremoso controles y experimentales. C1 y C2: quesos controles de las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1 y E2: quesos experimentales con *Lb. plantarum* I91 (experiencia 1) y *Lb. casei* I90 (experiencia 2), respectivamente[a].

| | **Tiempo de maduración (días)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **0** | **3** | **15** | **30** | **45** | **60** |
| **EXPERIENCIA 1** | | | | | | |
| **Queso C1** | | | | | | |
| Fermento primario | 8,5 ± 0,8 | 9,1 ± 0,3 | 9,2 ± 0,4 | 9,3 ± 0,4 | 9,2 ± 0,3 | 9,2 ± 0,5 |
| NSLAB | 2,4 ± 0,5 | 2,7 ± 0,4 | 3,5 ± 0,4 | 4,2 ± 0,2 | 4,4 ± 0,3 | 4,4 ± 0,2 |
| Coliformes | 4,3 ± 0,2 | 4,2 ± 0,4 | 3,5 ± 0,2 | 3,2 ± 0,3 | 2,7 ± 0,2 | 2,4 ± 0,2 |
| Hongos y levaduras | 1,1 ± 0,2 | 2,5 ± 0,2 | 3,2 ± 0,3 | 3,7 ± 0,3 | 4,2 ± 0,3 | 4,5 ± 0,5 |
| **Queso E1** | | | | | | |
| Fermento primario | 8,8 ± 0,9 | 9,2 ± 0,4 | 9,2 ± 0,5 | 9,3 ± 0,3 | 9,3 ± 0,4 | 9,3 ± 0,3 |
| *Lb. plantarum* I91 | 7,2 ± 0,8 | 7,6 ± 0,5 | 8,1 ± 0,4 | 8,4 ± 0,4 | 8,6 ± 0,4 | 8,6 ± 0,3 |
| Coliformes | 3,2 ± 0,3 | 3,0 ± 0,3 | 2,9 ± 0,2 | 2,6 ± 0,2 | 2,3 ± 0,3 | 1,8 ± 0,3 |
| Hongos y levaduras | 1,2 ± 0,2 | 2,1 ± 0,4 | 2,6 ± 0,4 | 3,0 ± 0,3 | 3,3 ± 0,3 | 3,3 ± 0,3 |
| **EXPERIENCIA 2** | | | | | | |
| **Queso C2** | | | | | | |
| Fermento primario | 8,7 ± 0,2 | 9,4 ± 0,3 | 9,5 ± 0,3 | 9,5 ± 0,4 | 9,5 ± 0,3 | 9,5 ± 0,3 |
| NSLAB | < 10 | < 10 | < 10 | < 10 | 1,8 ± 0,6 | 2,5 ± 0,4 |
| Coliformes | 3,7 ± 0,3 | 3,4 ± 0,4 | 3,0 ± 0,4 | 2,3 ± 0,3 | 2,1 ± 0,2 | 2,0 ± 0,4 |
| Hongos y levaduras | 1,3 ± 0,2 | 1,3 ± 0,5 | 1,8 ± 0,6 | 2,7 ± 0,3 | 3,9 ± 0,3 | 4,6 ± 0,2 |
| **Queso E2** | | | | | | |
| Fermento primario | 8,7 ± 0,3 | 9,4 ± 0,2 | 9,5 ± 0,4 | 9,4 ± 0,3 | 9,5 ± 0,2 | 9,5 ± 0,4 |
| *Lb. casei* I90 | 7,4 ± 0,1 | 7,9 ± 0,3 | 8,0 ± 0,3 | 7,9 ± 0,3 | 8,0 ± 0,3 | 7,9 ± 0,2 |
| Coliformes | 2,9 ± 0,5 | 2,8 ± 0,4 | 2,5 ± 0,3 | 1,7 ± 0,4 | 1,0 ± 0,3 | 0,6 ± 0,3 |
| Hongos y levaduras | 1,3 ± 0,3 | 1,7 ± 0,4 | 1,9 ± 0,3 | 2,9 ± 0,4 | 3,1 ± 0,4 | 3,4 ± 0,3 |

[a] Se presentan los valores medios ± desviación estándar de cuatro elaboraciones para los quesos de cada experiencia.

El número de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 aumentó desde la concentración inicial de $10^6$ UFC/mL en la leche hasta $10^7$ UFC/g en los quesos experimentales recién elaborados, y luego un orden más a los 3 días, para seguir constante hasta el final de la maduración. Esta tendencia confirma los resultados de estudios previos acerca de estos cultivos, en los que se ha demostrado una buena capacidad para crecer en el queso y mantener una elevada viabilidad, frente a diversos fermentos primarios y tecnologías de elaboración (Briggiler-Marcó *et al.* 2007, Milesi *et al.* 2008, Milesi 2009). Se han encontrado resultados similares para otras cepas de lactobacilos de origen NSLAB, pertenecientes a las mismas especies estudiadas en este trabajo (Hynes *et al.* 2003).
En los quesos controles de ambas experiencias, los lactobacilos adventicios se mantuvieron en bajos niveles ($< 10^4$ UFC/g en la experiencia 1 y $< 10^2$ en la experiencia 2); este recuento implica una diferencia de al menos 4 órdenes en la población de lactobacilos de las muestras experimentales y controles, un pre-requisito para individualizar efectos bioquímicos atribuibles a cada adjunto ensayado.
Los coliformes mostraron números iniciales entre $10^3$ y $10^4$ UFC/g en ambas experiencias, pero decrecieron significativamente durante la maduración. Por el contrario, el número inicial de hongos y levaduras en quesos con y sin adjunto fue despreciable, pero los recuentos se elevaron hacia el final de

la maduración hasta $10^4$ y $10^3$ UFC/g en quesos controles y experimentales, respectivamente. En las dos experiencias se verificó que los recuentos de coliformes y hongos y levaduras fueron menores en los quesos con fermentos adjuntos que en los quesos controles al final de la maduración; este resultado sugiere que *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 fueron efectivos para controlar el desarrollo de microflora indeseable. Un efecto antagónico similar fue observado recientemente por Ortigosa *et al.* (2006) y Herreros *et al.* (2007) para otros lactobacilos de origen NSLAB.

Las **Figuras 1A** y **1B** muestran el perfil de AAL de los quesos Cremoso miniatura de las experiencias 1 y 2, respectivamente. En todos los tipos de queso el contenido total de AAL aumentó con el tiempo de maduración. Los quesos con y sin lactobacilos adjuntos presentaron niveles similares de AAL al inicio de la maduración, pero luego de 60 días se encontraron diferencias significativas, especialmente en la experiencia 1. De hecho, el contenido de AAL fue el doble en los quesos con adición de *Lb. plantarum* I91 que en los respectivos controles, mientras que en presencia de *Lb. casei* I90 solamente se verificó un incremento del 42%.

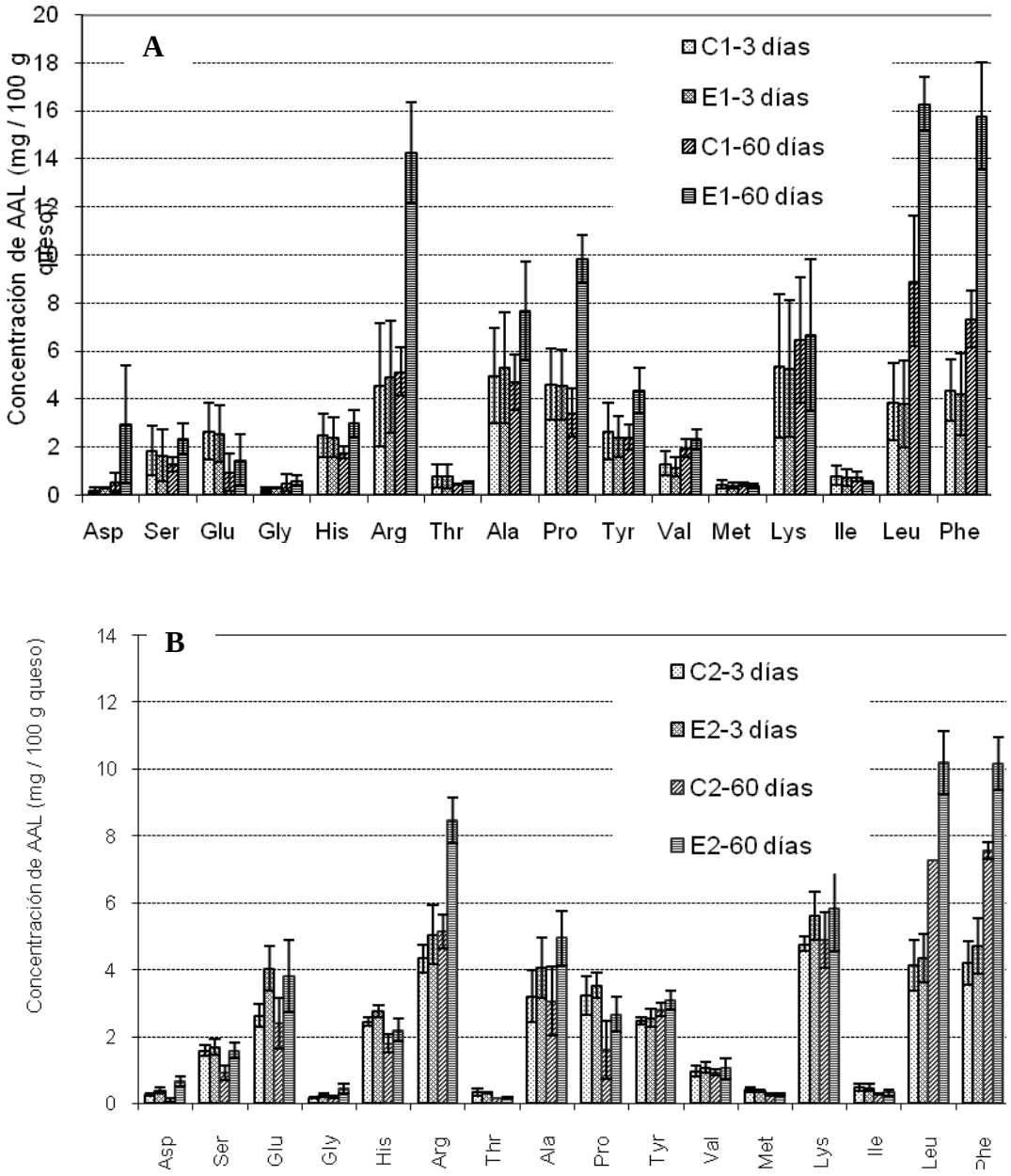


**Figura 1**. Perfiles de AAL de los quesos Cremoso miniatura de la experiencia 1 (A) y experiencia 2 (B) a los 3 y 60 días de maduración. C1 y C2: quesos controles de las experiencias 1 y 2, respectivamente. E1: queso experimental con *Lb. plantarum* I91 (experiencia 1), E2: queso experimental con *Lb. casei* I90 (experiencia 2).

En quesos con el agregado de *Lb. plantarum* I91, la concentración de algunos aminoácidos a los 60 días fue significativamente mayor que en los controles; ellos fueron: serina, histidina, arginina, treonina, prolina, tirosina, leucina y fenilalanina. También la concentración de aspártico fue mayor en quesos con *Lb. plantarum* I91, aunque no se detectaron diferencias significativas. En el caso de *Lb. casei* I90, los quesos que lo contenían mostraron una concentración significativamente mayor de ácido aspártico, serina, arginina, leucina y fenilalanina con respecto a los controles, siempre tras 60 días de maduración. La concentración de alanina fue superior también, aunque no difirió significativamente.
La variabilidad entre los perfiles de AAL de diferentes réplicas fue elevada; esto es común en este tipo de estudio donde los fenómenos bioquímicos relevados incluyen moléculas que son continuamente producidas y/o degradadas por la maquinaria enzimática presente en el ecosistema. A pesar de esto, el incremento en algunos aminoácidos, atribuible a la acción del adjunto, resultó tan elevado que fue posible detectar tendencias, y hallar diferencias significativas.
Para resumir, puede indicarse que *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 tuvieron influencia en la proteólisis secundaria de queso blando ya que causaron un incremento significativo de la cantidad de AAL y provocaron una modificación en el perfil de los mismos, un evento bioquímico favorable a la aceleración del tiempo de maduración. La influencia de *Lb. plantarum* I91 fue mayor, lo que destaca la importancia de la especie y la cepa en esta actividad bioquímica, y confirma estudios previos en esta línea (Fernández de Palencia *et al.* 1997, Hynes *et al.* 2003, Morea *et al.* 2007).
Al igual que con los perfiles de AAL, la concentración de cada ácido orgánico detectado en los quesos presentó gran variabilidad entre las diversas réplicas de elaboración, lo que no es sorprendente ya que estos compuestos son intermediarios en diversos caminos metabólicos activos durante la maduración del queso (Buffa *et al.* 2004). La variabilidad también obedece a la composición inicial de la leche de elaboración (Lues *et al.* 2000).
El ácido láctico es el principal producto de la fermentación de la lactosa, y fue el mayoritario en todos los quesos, lo que ya ha sido determinado para otras variedades (Buffa *et al.* 2004). En cuanto al ácido cítrico, si bien la mayor parte se pierde en el suero, constituyó el segundo ácido mayoritario, lo que puede deberse al alto contenido de humedad del queso Cremoso. En otros tipos, como el Halloumi, no se ha detectado ácido cítrico, mientras que en Cheddar, como en nuestro caso, es el segundo ácido en orden de concentración luego del láctico (Kaminarides *et al.* 2007).
En la experiencia 1, se detectaron diferencias significativas en los niveles de ácido láctico y acetoína entre quesos controles y experimentales de 60 días; los quesos con *Lb. plantarum* I91 contenían mayor cantidad (datos no incluidos). En la experiencia 2, también se detectaron diferencias significativas al final de la maduración en algunos compuestos: la acetoína presentó mayores niveles en los quesos con *Lb. casei* I90 que en los controles, en cambio el ácido orótico fue mayor en los controles (datos no incluidos).
Se aplicó ACP a los resultados de cada experiencia, utilizando como variables los valores de las áreas de los picos de los compuestos analizados. En la primera experiencia, se extrajeron cuatro componentes principales (CP) con un *eigenvalue* mayor a uno, que explicaron 84,9 % de la variancia total. En la **figura 2A** se muestra el gráfico de scores de las muestras para los dos primeros CP, que extrajeron el 58,4 % de la variancia. En dicho gráfico, se observa que las muestras de tres días fueron muy similares entre sí, mientras que las de 60 días presentaron una mayor variabilidad. Las muestras se separaron a lo largo del CP1 de acuerdo al tiempo de maduración. Como puede observarse, analizando conjuntamente el gráfico de los *loadings* (Figura 2B), las muestras al final de la maduración se caracterizaron por un incremento de los ácidos propiónico y pirúvico y una disminución del ácido succínico (que no fue detectado en los quesos de 60 días). Por otro lado, a lo largo del CP2 se observó una agrupación diferencial de las muestras de 60 días de acuerdo al tipo de queso: los quesos experimentales se caracterizaron por los compuestos acetoína y ácido láctico, mientras que el ácido acético fue más típico de los quesos controles. En la segunda experiencia, se extrajeron tres CP que explicaron 85,3 % de la variancia total. En el gráfico de scores sobre los dos primeros CP (**Figura 3A**), se observó que las muestras de quesos con *Lb. casei* I90 de 60 días de maduración se separaron del resto de los quesos. En este caso, puede deducirse del análisis conjunto de los gráficos de *scores* y *loadings* (**Figuras 3A** y **3B**, respectivamente) que los quesos con lactobacilos adjuntos se diferenciaron de los controles al final de la maduración por poseer mayores valores de ácido propiónico, pirúvico y acetoína.

En síntesis, a pesar de la alta variabilidad observada, pudo constatarse que la producción de ácidos orgánicos y acetoína difirió entre quesos controles y experimentales al final de la maduración. Uno de los compuestos determinantes de dicha diferenciación fue la acetoína, un importante compuesto de *flavour*, deseable para esta variedad de queso. Por otro lado, las diferencias observadas en los niveles de ácidos orgánicos no generaron ningún defecto de aroma o textura en los quesos experimentales.

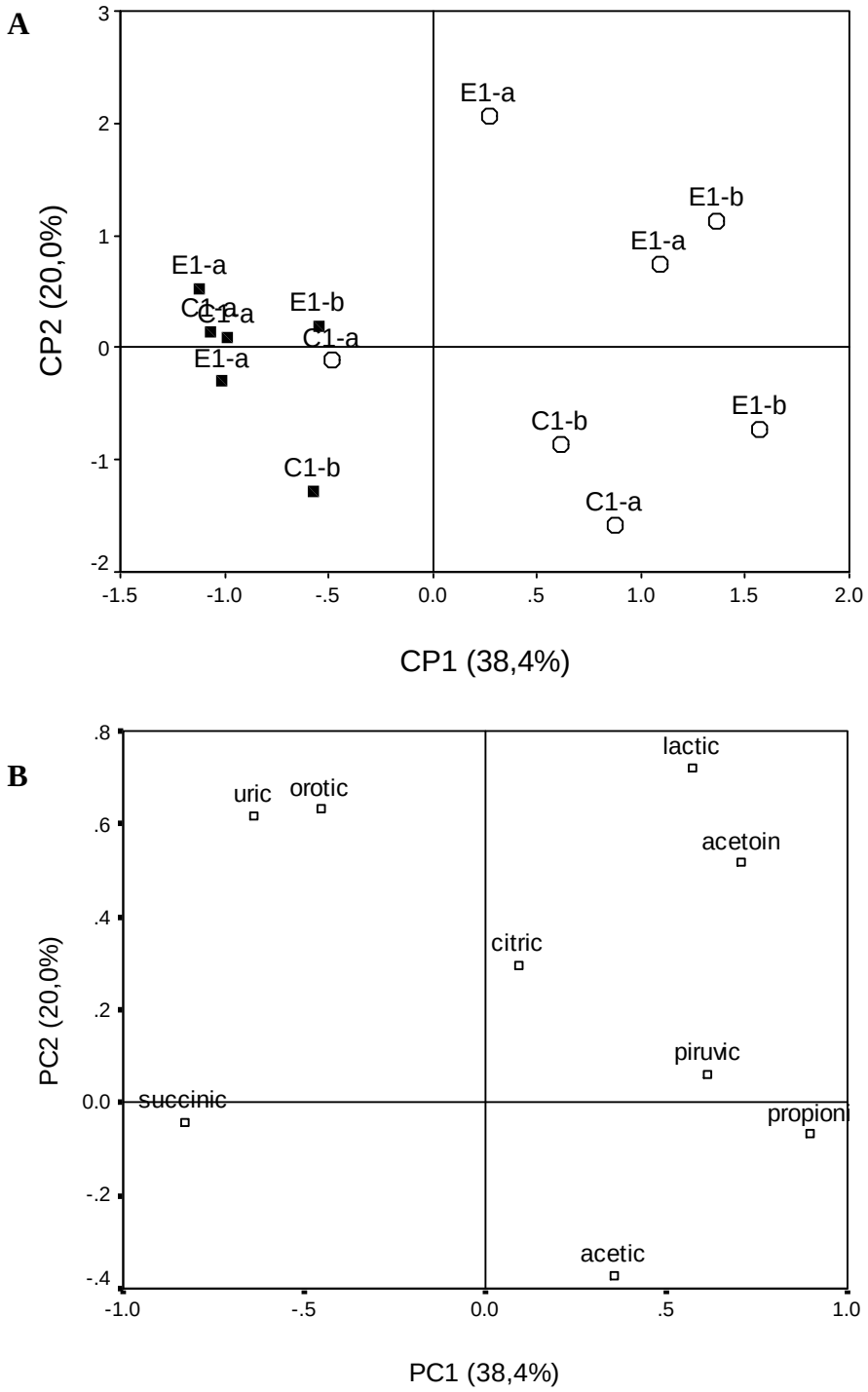


**Figura 2**. Análisis por componentes principales de los ácidos orgánicos y acetoína de los extractos acuosos de quesos de la experiencia 1 a 3 (■) y 60 (○) días de maduración. A) Gráfico de scores para CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C1) y experimentales con *Lb. plantarum* I91 (E1). Las letras a y b en el rótulo de las muestras indican la réplica de elaboración. B) Gráfico de loading de las variables.

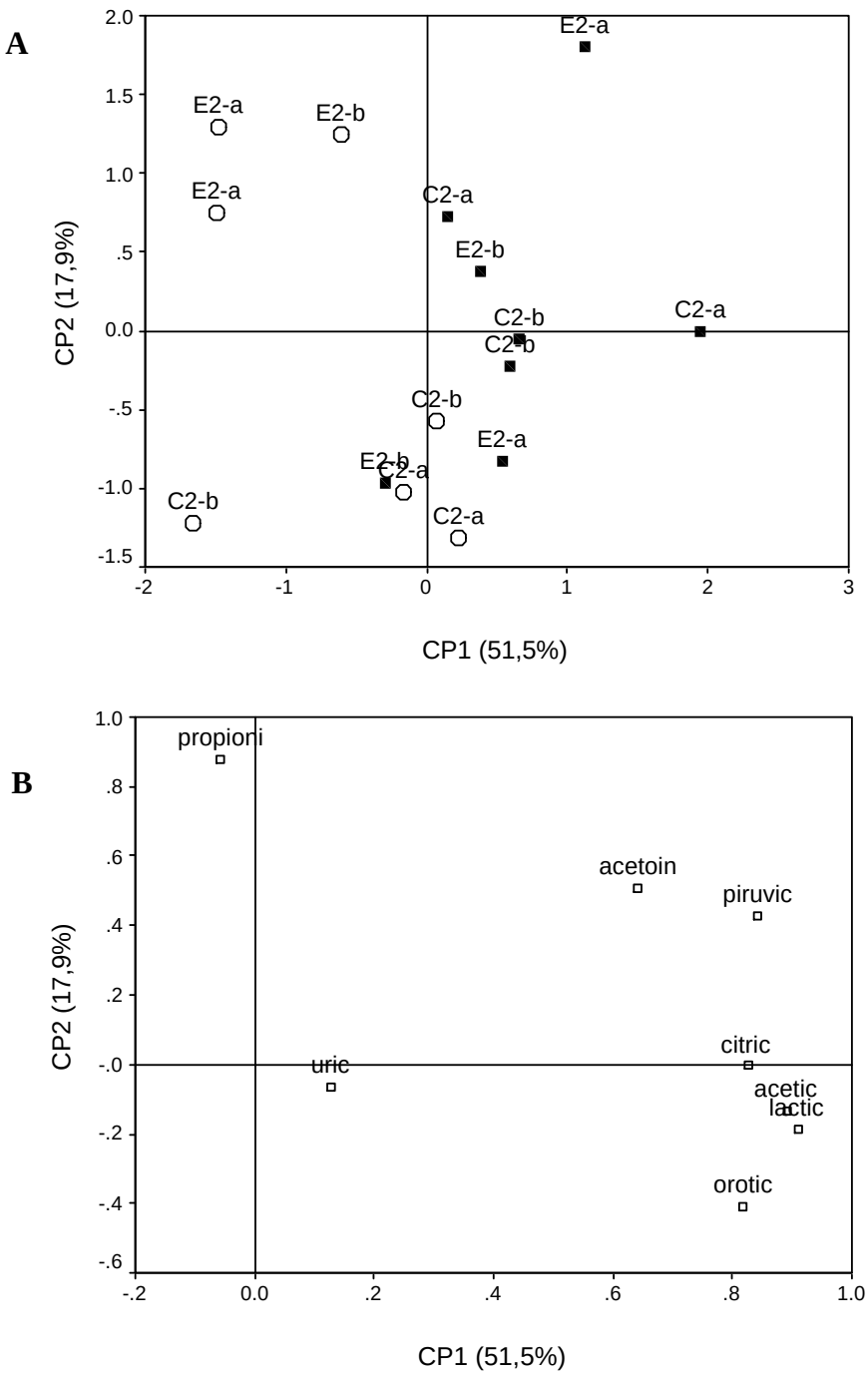


**Figura 3**. Análisis por componentes principales de los ácidos orgánicos y acetoína de los extractos acuosos de quesos de la experiencia 2 a 3 (■) y 60 (○) días de maduración. A) Gráfico de scores para CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C2) y experimentales con *Lb. casei* I90 (E2). Las letras a y b en el rótulo de las muestras indican la réplica de elaboración. B) Gráfico de loading de las variables.

Para el análisis de los perfiles de compuestos volátiles, se aplicó ACP utilizando como variables independientes las áreas de los picos de los cromatogramas correspondientes a aquellos compuestos que presentaban altas comunalidades.

Para la experiencia 1, se extrajeron los dos primeros CP, que explicaron el 95,4% de la variancia total. La **Figura 4A** muestra el gráfico de los *scores* de las muestras, en el que se aprecia la baja variabilidad entre los quesos de 3 días. Como en el caso anterior, las muestras se distribuyeron a lo largo de CP1 de acuerdo al tiempo de maduración, y los quesos de 60 días se separaron a lo largo de CP2 sobre la base del tipo de queso (con o sin adjunto de *Lb. plantarum* I91). El gráfico de los *loadings* (**Figura 4B**)

indica que las variables con alta influencia en CP1 fueron 2-propanona, 2-hexanona, etanol, acetato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, ácido butírico y ácido hexanoico, mientras que 2-metil 1-propanol, 3- metil 1-butanol y 2-fenil etanol mostraron alta correlación con CP2. Para la experiencia 2 también se extrajeron dos CP, que explicaron el 93,4% de la variancia total. La distribución de las muestras en CP1 vs. CP2 (**Figura 5A**) muestra que los quesos se agruparon por edad en CP1, y que la influencia del adjunto se observó en CP2 para los quesos de 60 días, aunque esta tendencia se apreció solamente en una de las dos réplicas de elaboración. El gráfico de los loadings (**Figura 5B**) reveló que 2-propanona, diacetilo, etanol, acetato de metilo, acetato de etilo y ácido butírico mostraron alta correlación con CP1, mientras que la influencia de 2-hexanona, 2-heptanona, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo fue baja para este CP. Los compuestos volátiles de mayor impacto en CP2 fueron 1-pentanol, butirato de etilo, hexanoato de etilo y ácido isovalérico, seguidos de acetoína, 3-metil 1-butanol y octanoato de etilo, con una contribución menor.
Las principales diferencias en el perfil de volátiles de quesos con agregado de lactobacilos adjuntos y sus respectivos controles fueron observadas para algunos ésteres, diacetilo y acetoína, todos compuestos de gran importancia en el *flavour*.

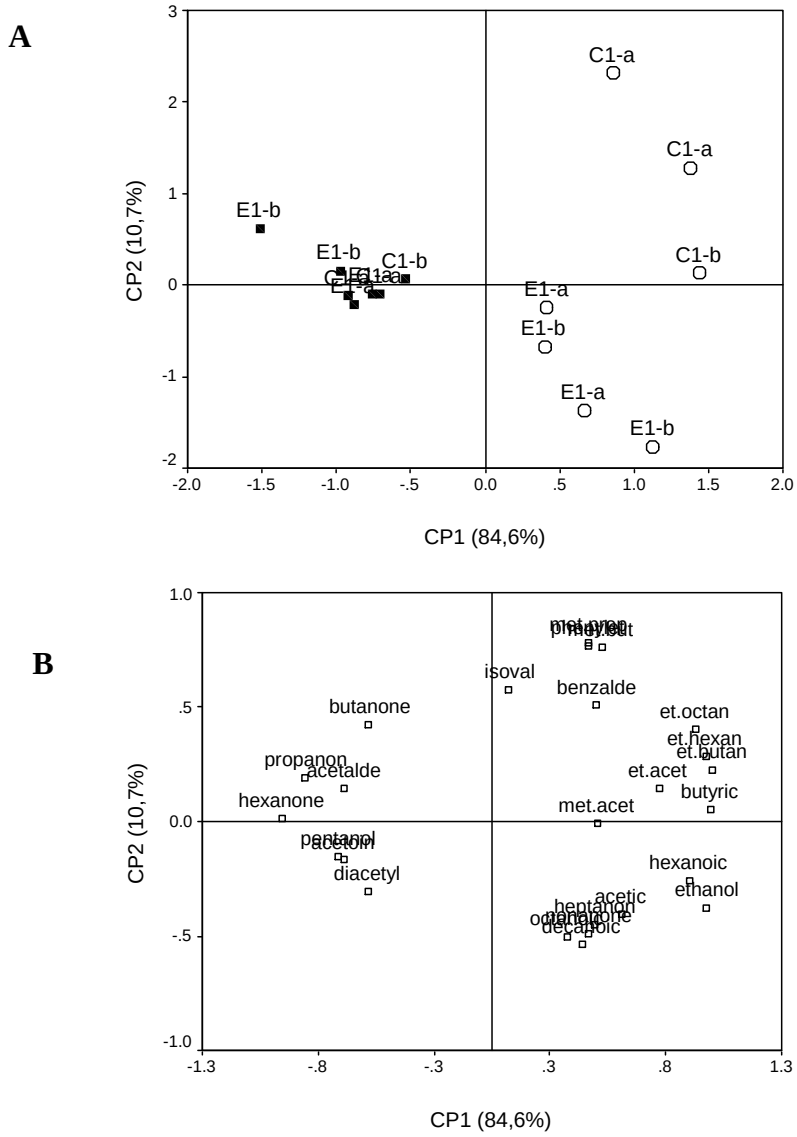


**Figura 4**. Análisis por componentes principales de los compuestos volátiles de los quesos en la experiencia 1 a 3 (■) y 60 (○) días de maduración. A) Gráfico de scores para CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C1) y experimentales con *Lb. plantarum* I91 (E1). Las letras a y b en el rótulo de las muestras indican la réplica de elaboración. B) Gráfico de loading de las variables.

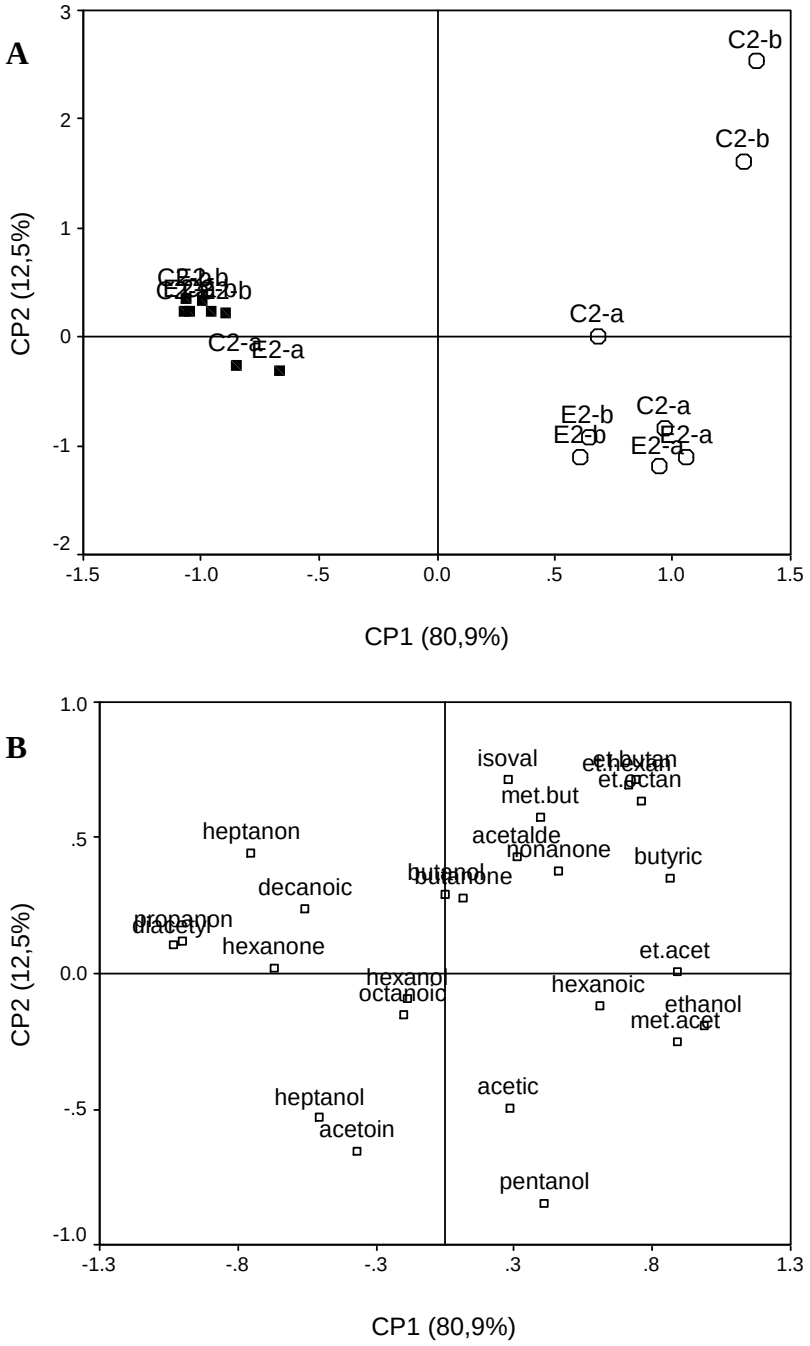


**Figura 5**. Análisis por componentes principales de los compuestos volátiles de los quesos en la experiencia 2 a 3 (■) y 60 (○) días de maduración. A) Gráfico de scores para CP1 vs. CP2 de los quesos controles (C2) y experimentales con *Lb. casei* I90 (E2). Las letras a y b en el rótulo de las muestras indican la réplica de elaboración. B) Gráfico de loading de las variables.

En ambas experiencias, la concentración de hexanoato de etilo, butirato de etilo y octanoato de etilo fue mayor en los quesos control que en los que contenían adjuntos. Este tipo de compuestos volátiles ha sido asociado a la actividad de flora no láctica en quesos, especialmente levaduras, dado que las actividades enzimáticas ligadas a su producción son infrecuentes en bacterias lácticas, aunque se han reportado para algunas cepas (Yvon 2006). En el presente estudio, los mayores niveles de ésteres en quesos controles son coincidentes con los recuentos más elevados de hongos y levaduras en estas muestras.

Las **Figuras 6A** y **6B** muestran gráficos de cajas y bigotes que representan el contenido de diacetilo y acetoína, respectivamente, para quesos de 60 días de las dos experiencias. El contenido de diacetilo en

quesos con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 fue de 2,3 y 3,5 veces mayor que en los controles, respectivamente (**Figura 6A**). La adición de ambos adjuntos también resultó en un aumento de la concentración de acetoína, que fue en promedio dos veces mayor en quesos experimentales que en controles (**Figura 6B**). La capacidad de producir diacetilo y acetoína a partir de los ácidos cítrico y aspártico fue demostrada para algunas cepas de lactobacilos mesófilos mediante estudios *in vitro* (Le Bars and Yvon 2007, Skeie *et al.* 2008) y en una pasta estéril de queso (Kieronczyk *et al.* 2004).

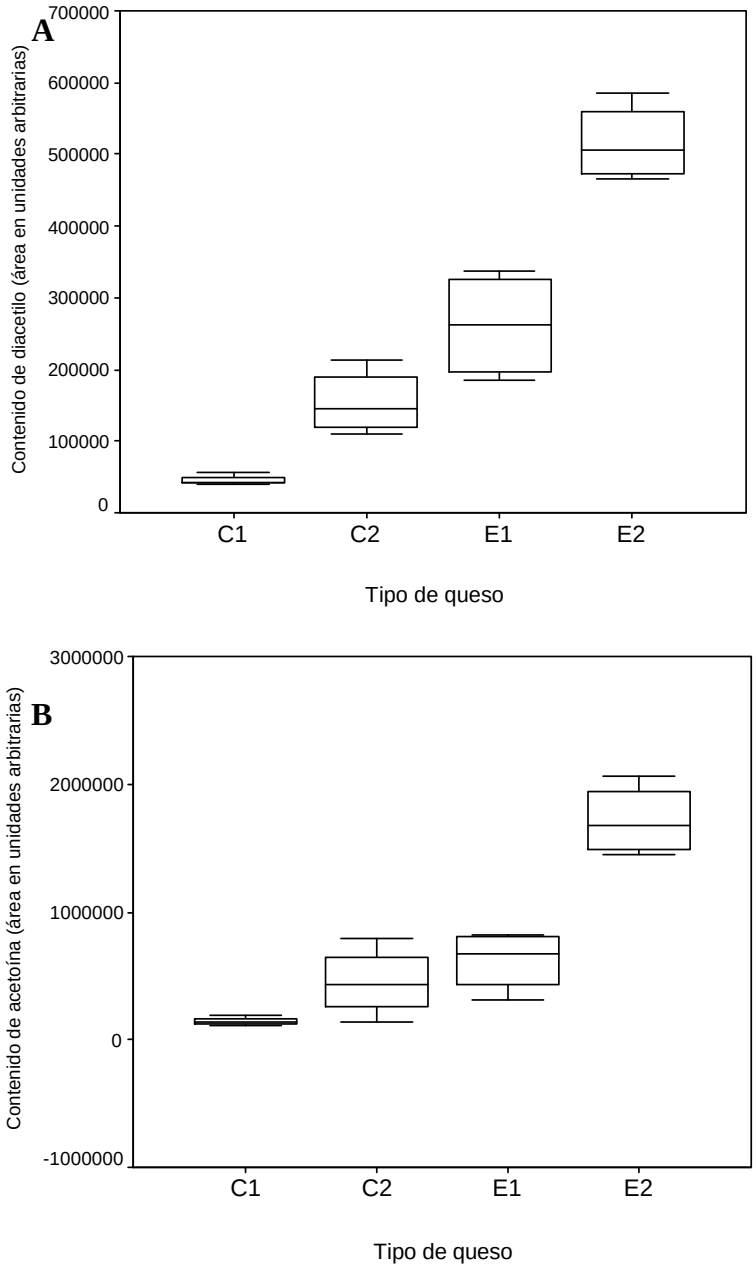


**Figura 6**. Gráfico de cajas y bigotes del contenido de diacetilo (**A**) y acetoína (**B**) expresado en unidades arbitrarias de área para los quesos controles (C1 y C2) y experimentales con *Lb. plantarum* I91 (E1) y *Lb. casei* I90 (E2) a los 60 días de maduración (promedio y desviación estándar).

El test sensorial triangular de *sniffing* reveló diferencias altamente significativas ($P \leq 0.001$) entre quesos con y sin lactobacilos adjuntos, para las dos cepas estudiadas. Las diferencias descriptas por los panelistas indicaron que el aroma de los quesos con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 era fresco, agradable, a manteca, y lo describieron como mejor que el de los controles, que tenían notas ácidas o menos agradables. Estos resultados pueden considerarse como una mejora en el aroma, ya que los

atributos “fresco” y “a manteca” son deseables para quesos blandos y de corta maduración (Hynes *et al.* 2003, Kieronczyk *et al.* 2004). La modificación del aroma en quesos con agregado de adjuntos concuerda con la mayor concentración de acetoína y diacetilo hallada en los quesos con *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, observamos que el agregado de *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90 a quesos Cremoso miniatura condujo a un incremento en el contenido total de aminoácidos libres durante la maduración, y específicamente, al aumento de algunos aminoácidos, entre ellos, el ácido aspártico. También verificamos la presencia de ácido cítrico en todos los quesos. Estos resultados indicaron que ambos compuestos precursores se encontraban disponibles en la matriz alimentaria. Sus productos de degradación diacetilo y acetoína se hallaron tanto en el extracto acuoso del queso, como en el espacio de cabeza de las muestras, incrementados notablemente cuando se utilizaron los fermentos *Lb. plantarum* I91 y *Lb. casei* I90. De esta manera, podemos concluir que dichos cultivos posiblemente posean actividades enzimáticas clave, como aminotransferasas con especificidad sobre ácido aspártico, y que esta actividad bioquímica se expresa durante la maduración del queso. Otro compuesto asociado a la degradación de aspártico y cítrico, pero de influencia negativa en el *flavour*, es el ácido acético; afortunadamente, no se detectaron niveles incrementados de acético en los quesos tratados con adjuntos.

Por último, se constató que *Lb. plantarum* y *Lb. casei* impactaron de manera diferente en la proteólisis y la degradación de aminoácidos en quesos de pasta blanda. Si bien ambos fermentos mostraron un impacto positivo, *Lb. plantarum* I91 mostró mayor potencial para producir aminoácidos libres mientras que *Lb. casei* I90 demostró mayor capacidad para producir compuestos de aroma derivados de los mismos, lo que refuerza el concepto de que la contribución de los adjuntos a la proteólisis secundaria y la formación de compuestos de aroma y sabor es especie y cepa dependiente.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFNOR, NFV 09-013. 1995. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Analyse sensorielle; Méthodologie: Essai triangulaire. AFNOR, Paris, Francia. Pág. 201-208.

Bergamini CV, Hynes E y Zalazar CA. 2006. Influence of probiotic bacteria in the proteolysis profile of a semi-hard cheese. International Dairy Journal, 16: 856-866.

Bergamini CV. 2007 Influencia de la adición de bacterias probióticas sobre el perfil de proteólisis de quesos semiduros. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Briggiler-Marcó M, Capra ML, Quiberoni A, Vinderola G, Reinheimer JA y Hynes E. 2007. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: in vitro characterization and performance in two model cheeses. Journal of Dairy Science, 90: 4532-4542.

Bude-Ugarte M, Guglielmotti D, Giraffa G, Reinheimer JA y HynesE. 2006. Non-starter lactobacilli from Argentinean cheeses. Journal of Food Protection, 69: 2983-2991.

Buffa M, Guamis B, Saldo J. y Trujillo A. 2004. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurised or high-pressure-treated goats`milk. Lebensmitel-Wissenschaft und Technologie, 37: 247-253.

Christen GL, Davidson PM, McAllister JS y Roth LA. 1993. Coliform and other indicator bacteria. En: Standard Methods for the Examination of Dairy Products (Ed Marshall RT). Washington: American Public Health Association. Pág. 247-269.

Crow V, Curry B y Hayes M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. International Dairy Journal, 11: 275-283.

Fernández de Palencia P, Peláez C y Martín-Hernández MC. 1997. Characterization of the aminopeptidase system from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3778-3781.

Fox PF. 2003. Cheese - Biochemistry of cheese ripening. En: Encyclopedia of Dairy Sciences, Vol. 1 (Eds Roginsky, H.; Fuquay, J.; Fox, P.). Reino Unido: Academic Press. Pág. 320-326.

Frank JF, Christen GL y Bullerman LB. 1993. Tests for groups of microorganisms. En: Standard methods for the examination of dairy products (Ed Marshall RT).Washington: American Public Health Association. Pág. 271-286.

Herreros MA, Arenas R, Sandoval MH, Castro JM, Fresno JM y Tornadijo ME. 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. International Dairy Journal, 17: 328-335.

Hynes E, Bach C, Lamberet G, Ogier JC, Son O y Delacroix-Buchet A. 2003. Contribution of starter lactococci and adjunct lactobacilli to proteolysis, volatile profiles and sensory characteristics of washed-curd cheese. Latí, 83: 31-43.

IDF (1982). Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia seca. Metodo di riferimento. Nº 4:A. Bruselas: International Dairy Federation. Pág. 184-188.

IDF (1993). Latte. Determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. Nº 20:B. Bruselas: International Dairy Federation. Pág. 74-107.

IDF (1997). Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse. Guide de directives generales apliquées aux methodes butyrometriques. Norme FIL Internationale 152:A 1997. Bruselas: International Dairy Federation.

Kaminarides S, Stamou P y Massouras T. 2007. Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. Food Chemistry, 100: 219-225.

Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, Le Bars D y Yvon M. 2004. The nature of the aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. International Dairy Journal, 14: 227–235.

Le Bars D y Yvon M. 2008. Formation of diacetyl and acetoin by Lactococcus lactis via aspartate catabolism. Journal of Applied Microbiology, 104(1): 171-177.

Lues JFR. 2000. Organic acid and residual sugar variation in a south african cheddar cheese and possible relationships with uniformity. Journal of Food Composition and Analysis, 13: 819-825.

Milesi MM, Candioti M y Hynes E. 2007. Mini soft cheese as a simple model for biochemical studies on cheesemaking and ripening. LWT – Food Science and Technology, 40: 1427-1433.

Milesi MM, McSweeney PLH y Hynes ER 2008. Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. Journal of Applied Microbiology, 105: 884-892.

Milesi MM. 2009. Desarrollo de fermentos adjuntos para quesería a partir de bacterias lácticas no pertenecientes al fermento. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral.

Morea M, Matarante A, Di Cagno R, Baruzzi F y Minervini F. 2007. Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese. International Dairy Journal, 17: 525-534.

Ortigosa M, Arizcun C, Irigoyen A, Oneca M y Torre P. 2006. Effect of lactobacillus adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes'-milk cheese. Food Microbiology, 23: 591–598.

Skeie S, Kieronczyk A, Eidet S, Reitan M, Olsen K y Østlie H. 2008 Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagines and aspartate in a washed-curd cheese. International Dairy Journal, 18: 169-177.

Smit BA. 2004 Flavour formation from amino acids in fermented dairy products. Thesis Waeningen University, Waeningen, Holanda.

Yvon M. 2006. Key enzymes for flavor formation by lactic acid bacteria. Australian Journal of Dairy Technology, 61: 16-24.

# Tiempos de secado durante la deshidratación convectiva de rosa mosqueta pretratada química y mecánicamente

# Drying times during convective dehydration of chemical and mechanical pretreated rosehip

Ohaco E (1), Mabellini A (1), Márquez CA (1), De Michelis A (2), Lozano JE (3)

[1] AUVR, Facultad Ingeniería, UNCo. ohacoelizabeth@hotmail.com
[2] CONICET-INTA AER El Bolsón. Mármol 1950 (8430) El Bolsón. Río Negro. Argentina. Teléfono y Fax 54 2944 492422. E mail: ademichelis@bariloche.inta.gov.ar
[3] PLAPIQUI-UNS. (Planta Piloto de Ingeniería Química). Camino "La Carrindanga", Km 7, C.C. 717 (8000) Bahía Blanca, Argentina. jlozano@plapiqui.edu.ar

## RESUMEN

Se estudió el efecto de distintos pretratamientos sobre el tiempo de secado de frutos frescos de rosa mosqueta (*Rosa eglanteria L*). El secado de frutos de la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria L*) es muy lento debido a que posee una cutícula dura y muy impermeable. Usualmente los tiempos de secado varían entre 10 a 15 horas con aire a 70 ºC, lo que limita la productividad de los equipos, por ende la cantidad procesable durante la temporada de este fruto estacional, y el uso de energía es poco eficiente. Los frutos no se pueden quebrar o moler debido a que por su estructura física haría imposible su manejo dentro de los equipos. Se utilizaron frutos frescos, mantenidos a 2 ºC y 90 % de humedad relativa hasta su uso**.** Los frutos de rosa mosqueta fueron sometidos a los siguientes pretratamientos: químicos (inmersión en soluciones de NaOH y oleato de etilo con $K_2CO_3$) y mecánicos (efectuar cortes poco profundos en la cutícula de los frutos y pinchaduras de 1,0 mm en la superficie de los frutos en forma manual). El secado se efectuó en un equipo experimental con una condición estándar: aire a 70 ºC, 5 m/s y 5% de humedad relativa, comparando con muestras sin pretratar. El contenido de agua de las muestras se obtenía mediante pesada discontinua. De acuerdo a los resultados, no se observaron diferencias significativas (ANOVA, $\alpha$=0,05) en los tiempos de secado entre el mismo tipo de pretratamiento, en consecuencia los tiempos de secado hasta un contenido final de humedad de 0,15 d.b.s. se expresan como promedio de ellos. Los tiempos de secado se reducen significativamente (26-58%) para la mayoría de los pretratamientos cuando se comparan con las muestras sin tratar. Los pretratamientos con NaOH si bien disminuyen el tiempo, la reducción es leve, mientras que los de oleato de etilo (este tratamiento opaca el producto y deja como residuo un aroma indeseable) y las tratadas con cortes longitudinales lo reducen prácticamente a la mitad. De acuerdo a los resultados, el mejor pretratamiento es el de pinchado mecánico que reduce los tiempos en alrededor del 58%.

## ABSTRACT

There was studied the effect of different pre treatments on the time of drying of fresh fruits of rose hip (*Rose eglanteria L*). Drying of the rose hip fruits (*Rose eglanteria L*) is very slow due to it possesses a hard and very impermeable cuticle. Usually, with air to 70 ºC the drying times change between 10 at 15 hours, which limits the equipments productivity, and the quantity procesable during the season of this seasonal fruit, and the use of energy is slightly efficient. They cannot break or grind due for the physical structure of fruits it would make managing very difficult inside the equipments. We used fresh fruit preserved at 2ºC and 90 % of relative humidity up to use. The rose hip fruits were submitted to the following pre treatments: chemical (dip in NaOH's solutions and ethyl oleate with $K_2CO_3$) and mechanicals (to effect slightly deep cuts in the cuticle of the fruits and punctures of 1,0 mm in the surface of the fruits in manual form). Drying was carried out in an experimental equipment with a standard condition: air 70ºC, 5m/s and 5 % of relative humidity, comparing with samples without treatment. The water content of the samples was obtained by means of discontinuous weighed. As there were no significant differences in the results of repetitions of the same treatment (ANOVA, $\alpha$ = 0,05) when the samples were dried until water contents of 0,15 d.b.s., experimental results were expressed as average of them. In all cases, the pre treatments decrease drying times significantly (26-

58 %) when they are compared with the samples without treating. The pre treatments with NaOH decrease the time very little, whereas ethyl oleate (this treatment darkens the product and an undesirable aroma leaves them as residue) and the treated ones with longitudinal cuts reduce it practically to the half. In agreement to the results, the best pre treatment is that of punctured mechanic who reduces the times in about 58 %.

**PALABRAS CLAVE**: *secado, tiempos, pretratamientos.*

**KEYWORDS**: *dried, times, pre treatments.*

## INTRODUCCIÓN

El objetivo del secado de productos alimenticios consiste en remover agua hasta un nivel en el cual el desarrollo microbiano es minimizado. La calidad del producto es fuertemente afectada por las condiciones de secado. El daño térmico experimentado por el producto es directamente proporcional a la temperatura y al tiempo. Una temperatura elevada y un largo tiempo de secado asociados generan daño por calor y afecta negativamente la textura, color, flavor y el valor nutricional del producto. La pérdida de calidad nutricional durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos es un problema importante. Con el fin de minimizar las pérdidas de calidad del producto, éste puede pretratarse química o mecánicamente (Erenturk et al., 2005; Femenia et al., 1998).

Los pretratamientos químicos y mecánicos aumentan la velocidad de secado en la superficie de frutos cerosos (St. George et al., 2004).

Los pretratamientos químicos normalmente rompen la superficie del fruto, creando microcanales que aumentan la presión, aumentando así la velocidad de secado. Algunos de ellos también minimizan las reacciones enzimáticas o no enzimáticas que producen degradación de la calidad del producto. Los pretratamientos químicos más comunes consisten en mantener los frutos frescos en solución de ésteres de ácidos grasos como la solución de oleato de etilo por varios segundos o en soluciones de NaOH, pueden afectar el flavor del producto (Ibrahim Doymaz, 2005; St. George et al., 2004; Femenia et al., 1998).

Los tratamientos físicos consisten en producir algún tipo de daño mecánico sobre la piel de los frutos, lo que produce grietas en la capa impermeable facilitando la llegada de humedad desde el interior hacia la superficie del fruto. Los procesos de abrasión de la piel son los pretratamientos físicos más reportados en la bibliografía, y existe muy poca información sobre cortes superficiales y perforaciones poco profundas con agujas de pequeño diámetro. Para todos los tratamientos previos al secado de frutas se han informado disminuciones de los tiempos de secado que oscilan entre 20 y 40%.

El secado de frutos de la rosa mosqueta (*Rosa eglanteria L*) es muy lento debido a que posee una cutícula muy dura e impermeable debido al recubrimiento céreo (Vullioud et al., 2007). Usualmente con aire a 70 ºC los tiempos de secado varían entre 10 a 15 horas, lo que limita la productividad de los equipos, por ende la cantidad procesable durante la temporada de este fruto estacional, y el uso de energía es poco eficiente.

Es por esto que el objetivo de este trabajo es pretratar los frutos mediante métodos químicos y mecánicos para disminuir los tiempos de deshidratación y determinar cuál seria el más adecuado para uso industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Los frutos de rosa mosqueta fresca *(Rosa eglanteria L*) fueron obtenidos en la ciudad de El Bolsón, Río Negro, cosechados a mano y mantenidos en refrigeración a 2 ºC y 90% de humedad relativa hasta el momento de efectuar los diferentes pretratamientos y posterior secado.

El contenido inicial de humedad de rosa mosqueta fresca fue de 49,7% en base húmeda y se determinó por el método de secado en estufa de aire a 105 ºC hasta peso constante, por triplicado.

### Pretratamientos

#### Químicos

- Soluciones acuosas de NaOH a temperatura de ebullición. Se trabajó con dos concentraciones diferentes de álcali: al 1 % y al 1,5 %. Con ambas concentraciones se procedió de la misma manera:

una vez que la solución de hidróxido de sodio alcanzó su punto de ebullición se sumergieron los frutos y se mantuvieron en esta condición durante 1,5 min. Luego se enjuagaron con agua potable circulante. Se secaron con papel tisú para quitar el agua superficial incorporada durante el tratamiento.
- Solución de oleato de etilo al 2 % en solución de carbonato de potasio al 2,5 %. Se calentó la solución de oleato de etilo hasta 70 ºC, en ese momento se sumergieron los frutos y se dejaron durante 2 minutos en esta condición. Luego se enjuagaron con agua potable circulante durante 5 minutos. Se secaron con papel tisú para eliminar el agua superficial residual del tratamiento.

**Físicos**

- Pinchado de los frutos. Se realizaron 3 tratamientos variando el número de perforaciones que recibió cada fruto, las cuales fueron de 3, 6, y 12 perforaciones por fruto. Las perforaciones se realizaron manualmente con un punzón metálico de 1,11 mm de diámetro, en forma ecuatorial y en puntos equidistantes del fruto.
- Cortes en la cutícula superficial de los frutos. Se realizaron 2 tratamientos variando la cantidad de cortes que recibió cada fruto, que fueron 4 y 6. Los cortes se realizaron manualmente: en forma longitudinal y en puntos equidistantes del fruto con un bisturí, tratando de cortar solamente la cutícula superficial.

**Procedimiento de secado**

Los frutos que fueron sometidos a los distintos tratamientos previo al secado y frutos sin pretratamiento fueron distribuidos uniformemente dentro de la cesta perforada (diámetro: 22,5 cm, altura: 10 cm) formando una sola capa. Los frutos se deshidrataron enteros, sin pedúnculo, con flujo de aire caliente ascendente, perpendicular a la cesta, en un equipo experimental de ciclo cerrado, con aire forzado, descripto en detalle por Ochoa et al. (2002a), que permitió regular las variables operativas (**Figura 1**).

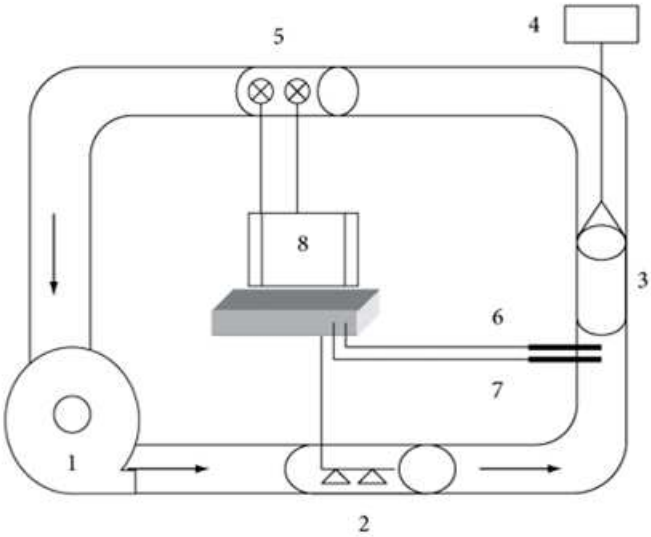


**Figura 1**. Esquema del equipo experimental de secado. 1: Ventilador; 2: estación de humectación del aire; 3: cámara de secado; 4: balanza; 5: calefactor eléctrico del aire; 6: sensor de temperatura de bulbo seco del aire; 7. sensor de humedad relativa del aire; y 8: controlador automático de la temperatura del aire de secado.

Tanto la temperatura como la velocidad y contenido de humedad del aire se midieron a la entrada de la cámara de secado. La temperatura se midió con termocuplas de cobre-constantan. La velocidad se midió con un anemómetro (Mini Vane CFM Termo Anemometers, EXTECH Instruments), mientras que el contenido de humedad se midió con un hidrómetro (Hygo Palm, Rotonic Instruments). Las experiencias se llevaron a cabo con una condición estándar para todas las muestras, aire a: 70 ºC, velocidad 5 m/s y humedad relativa de 5 %. El tiempo de secado comenzó a registrarse una vez puesto en régimen el equipo sin la muestra a deshidratar. En todos los casos y a medida que avanzaba el secado se registró la pérdida de peso de los frutos cada 30 minutos durante las primeras 3 horas de secado; y a partir de este punto cada 1 h hasta llegar a peso constante donde se detuvo el proceso de

secado. Una vez que el producto deshidratado se enfrió hasta la temperatura ambiente en un ambiente seco, se colocó en bolsas de polietileno cerradas herméticamente, previamente identificadas, y se almacenó a temperatura ambiente. Las experiencias se efectuaron por duplicado.

**Medidas de las pérdidas de peso y del peso seco de las muestras**

Las pérdidas de peso de las muestras parcialmente deshidratadas se obtenían por pesada discontinua con una balanza analítica digital (± 0,001 g). El peso seco de las muestras se evaluaba secándola hasta peso constante en una estufa con aire forzado a 104 ºC, con la balanza antes indicada.

**Análisis estadístico**

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza ANOVA simple con un $\alpha$=0,05 para determinar si existían diferencias significativas dentro del mismo tipo de pretratamiento. Se evaluó para tratamiento con NaOH, (entre 1% y 1,5%), cortes superficiales (entre 4 y 6), perforaciones (entre 3, 6 y 12) y muestra sin tratamiento (testigo).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 2** se muestran las curvas de secado, en las cuales se graficó el contenido de humedad de las muestras, en base seca, en función del tiempo de secado, para frutos de la rosa mosqueta sin pretratamiento y pretratados de acuerdo a lo indicado antes. Como se puede observar en la **Figura 2** los pretratamientos aplicados a los frutos de rosa mosqueta afectan al tiempo de secado, lo cual indica que reducen la resistencia al transporte de humedad aumentando de esta manera la velocidad de secado (mayores pendientes y lógicamente menores tiempos de secado).

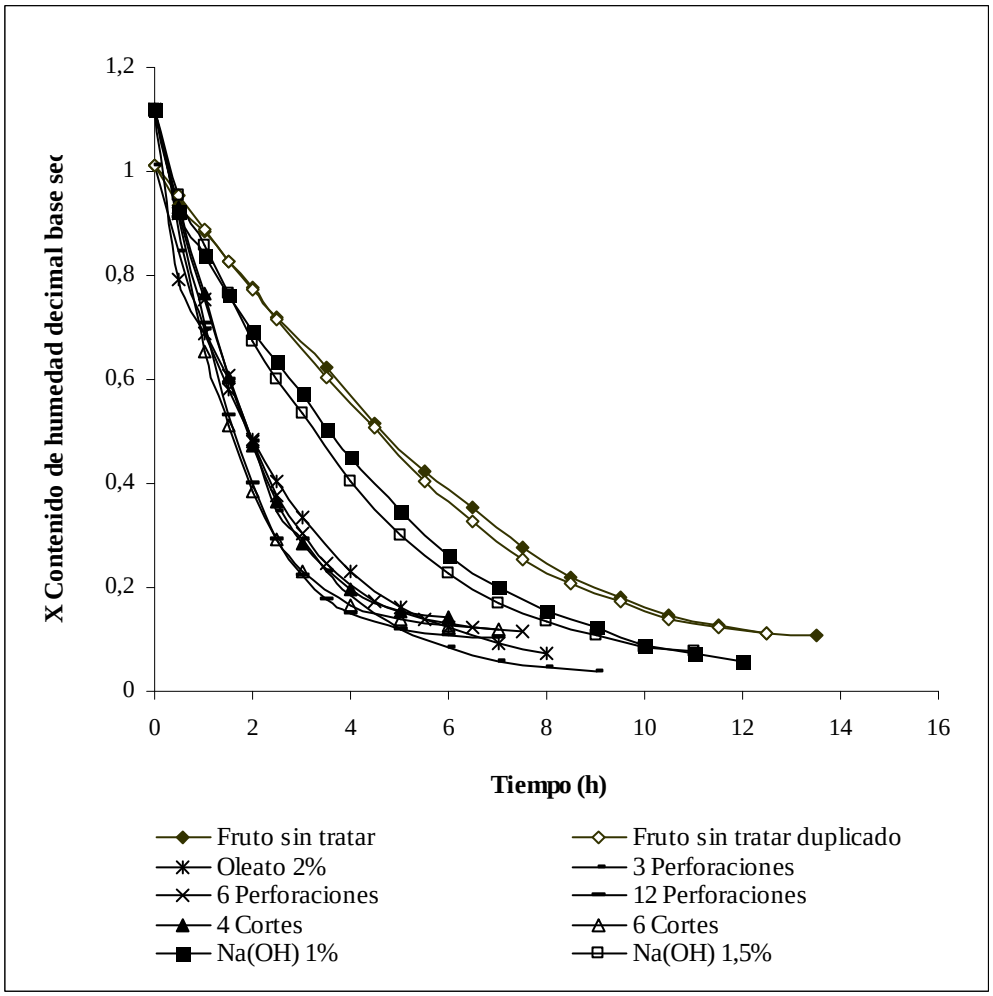


**Figura 2**. Comparación de las curvas de secado experimentales, en capa delgada, de frutos de la rosa mosqueta sin pretratar y pretratados con distintos métodos.

Como ya se comentó, los pretratamientos disminuyen el tiempo de secado, aunque lo hacen con distinta intensidad. En este sentido se puede decir que no existen diferencias significativas cuando se comparan los frutos pretratados con solución de NaOH al 1 % y al 1,5 %, es decir que el uso de concentraciones usuales de este álcali disminuye el tiempo de secado, aunque no se observó efecto de la concentración. De acuerdo a los resultados, no existieron diferencias significativas (ANOVA, $\alpha$ = 0,05) entre el mismo tipo de pretratamiento, por esto en la **Figura 3** se graficaron los promedios de humedad en base seca dentro de cada pretratamiento en función del tiempo de secado y en la **Tabla 1** se expresan los tiempos de secado hasta un contenido final de humedad de 0,15 d.b.s. obtenidos de la **Figura 3**.

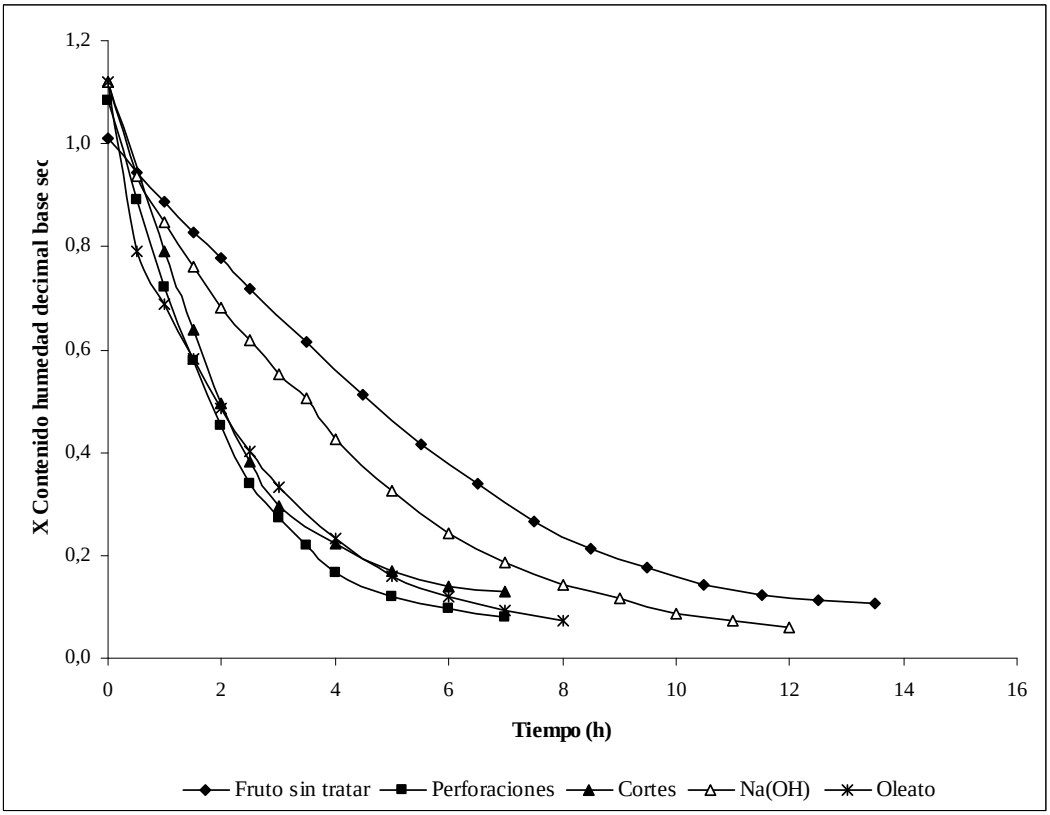


**Figura 3**. Comparación de los promedios de las curvas de secado experimentales, en capa delgada, de frutos de rosa mosqueta sin pretratar y pretratados con distintos métodos.

**Tabla 1**.Tiempos de secado de frutos de la rosa mosqueta sin tratar y pretratados por diferentes métodos.

| Tratamiento de la muestra | Tiempo de secado (h) | % Reducción comparado con fruto sin tratar |
|---|---|---|
| Sin pretratamiento | 10,7 | --------- |
| Pretratada con NaOH 1 y 1,5% a ebullición durante 1,5 minutos | 7,9 | 26,2 |
| Pretratada con oleato de etilo 2% y $K_2CO_3$ 2,5%, durante 2 minutos a 70ºC | 5,5 | 48,6 |
| Pretratada mecánicamente con 4 y 6 cortes longitudinales | 5,2 | 51,4 |
| Pretratada mecánicamente con 3, 6 y 12 pinchaduras de 1 mm | 4,5 | 57,9 |

Cuando se comparan los pretratamientos con NaOH con los frutos sin tratar se observa que el tiempo de secado disminuye alrededor de un 26% (comparando para una humedad de 0,15 decimal base seca), mientras que si se comparan los frutos pretratados con oleato de etilo al 2,0% en solución de carbonato

de potasio al 2,5% con los frutos sin tratar se aprecia una reducción del tiempo de secado de aproximadamente un 49%.
Con respecto a los pretratamientos físicos o mecánicos (cortes superficiales y perforado), se puede apreciar en general una reducción muy importante, alrededor del 60%, del tiempo de secado al compararlas con las curvas sin pretratamientos; no habiendo diferencias significativas entre la cantidad de cortes superficiales de la cutícula de los frutos (4 ó 6) o perforaciones de los mismos (3, 6 ó 12).
Es decir, todos los pretratamientos son adecuados. Sin embargo, dadas las reducciones de los tiempos de secado los más importantes son el tratamiento con oleato en medio alcalino y los físicos o mecánicos. Esto permite profundizar el estudio de este trabajo hacia la evaluación y selección de los pretratamientos más efectivos.

## CONCLUSIONES

Los tiempos de secado se reducen significativamente para la mayoría de los pretratamientos cuando se comparan con las muestras sin tratar. Los tratamientos con NaOH disminuyen el tiempo poco, mientras que los de oleato (este tratamiento opaca el producto y deja como residuo un aroma indeseable) y los cortes longitudinales lo reducen prácticamente a la mitad.
De los resultados obtenidos se desprende que es beneficioso aplicar pretratamientos antes del secado de frutos de rosa mosqueta, ya que en todos los casos se reduce el tiempo de secado; y probablemente se minimicen las pérdidas de calidad tales como: color, reducción de volumen y área, cambios de forma, etc., mejorando de esta manera el proceso de secado.
Al evaluar el efecto que los distintos pretratamientos genera sobre el producto final, rosa mosqueta deshidratada, se aprecia que el uso de solución de NaOH no mejora significativamente el proceso de secado, y si bien el oleato de etilo si lo hace, se puede evaluar que deja un olor fuerte en el producto seco que lo vuelve indeseable, es decir quedan residuos de las sustancias utilizadas en el producto final. Con respecto a los tratamientos físicos, se obtienen reducciones del tiempo de secado similares a las que genera el uso de oleato de etilo, pero sin incorporar productos químicos al producto final, resultando por ello la mejor opción para la industria alimentaria.
De acuerdo a los resultados, el mejor pretratamiento es el de pinchado mecánico que reduce los tiempos en alrededor del 58%.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Doymaz I. (2007). Influence of pretreatment solution on the drying of sour cherry. *Journal of Food Engineering, 78*(2), 591-596.

Erenturk S., Gulaboglu M.S, Gultekin S.(2005). The effects of cutting and drying medium on the vitamina C content of rosehip during drying. *Journal of Food Engineering, 68*, 513-518.

Femenia A., Sanchez E. S., Simal S., Rossell C. (1998). Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. *Journal Agricultural Food Chemistry, 46* (1), 271-276.

Márquez C. A., De Michelis A. (2008). Propiedades de lechos fijos durante la deshidratación convectiva de cerezas, guindas y rosa mosqueta. Cambios de volumen y porosidad. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, vol. 28, nº 2.*

Marquéz CA. 2003. Deshidratación de frutos no tradicionales: Rosa Mosqueta (*Rose Hips*). Tesis doctoral presentada en la Universidad Politécnica de Valencia.

Ochoa M. R., Pirone B., Kesseler A. G., Márquez C. A., de Michelis A.(2002ª). Volume and area shrinkage during dehydration of whole sour cherry fruits (*Prunus cerasus*). *Drying Technology, 20,* 147-156.

Pirone B., Vullioud M. B., Ochoa M. R., Kesseler A. G., Márquez C. A., De Michelis A. (2008). Cambios de volumen, área superficial y factor de forma de Heywood durante la deshidratación de cerezas (*Prunus avium*). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos, vol. 28, nº 2.*

St. George S. D., Cenkowski S., Muir W.E. (2004). A review of drying technologies for the preservation of nutritional compounds in waxy skinned fruit. *ASAE Paper Nº MB04-104.*

Tarhan S., Ergunes G., Faruk Taser O. (2006). Selection of chemical and thermal pretreatment combination to reduce the dehydration time of sour cherry (*prunus cerasus* l.). *Journal of Food Process Engineering, 29*, 651–663.

Vullioud M. B., Pirone B., Ochoa M. R., Kesseler A. G., Márquez C. A., De Michelis A. (2007). Avances en el secado de frutos de la rosa mosqueta. *Revista Presencia, 51*, 5-7.

# Estudio de las transferencias de energía y materia durante la congelación de papa por hidrofluidización

# Study of heat and mass transfer during freezing of potato by hydrofluidization

Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)
(Universidad Nacional del Litoral - CONICET)
Güemes 3450 - S3000GLN - Santa Fe - Argentina
jmperalta@intec.unl.edu.ar

## RESUMEN

La hidrofluidización es un método que permite refrigerar y/o congelar alimentos. En este sistema se bombea el líquido refrigerante en dirección ascendente a través de orificios o boquillas hacia un recipiente de refrigeración generando chorros de líquido. De esta forma se obtiene un líquido altamente turbulento y un lecho fluidizado de productos, además de altos coeficientes de transferencia superficiales. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las transferencias de energía y materia en un sistema de hidrofluidización con un único jet circular incidiendo colinealmente sobre una esfera estática de papa. Para ello se empleó un sistema de hidrofluidización a escala planta piloto bajo distintas condiciones de caudal (1 y 3 L $min^{-1}$), temperatura del refrigerante (-15 y -10 ºC) y distancia entre el orificio y la esfera (1 y 5 cm). Se usó una solución de NaCl al 23,1 % (p/p) como refrigerante. El jet de líquido se generó mediante una placa con un único orificio de 3 mm de diámetro. Se usaron esferas de papa de 2 cm de diámetro como muestra de alimento. Durante las experiencias se midió la temperatura central de las esferas con una termocupla T de 30 AWG y una frecuencia de 2 Hz, y se determinó la concentración promedio de NaCl en las esferas a 0, 5, 10 y 20 min. Para comparar los resultados de los perfiles de temperatura central se determinó el tiempo de congelación característico para alcanzar -5 ºC. Se encontró que con excepción de la distancia entre el orificio y la esfera, todas las variables operativas influyeron sobre el tiempo de congelación. En particular, al aumentar el caudal o disminuir la temperatura del refrigerante se observó una disminución en los tiempos de congelación. Los tiempos de congelación fueron afectados en mayor medida por la temperatura que por el caudal. Por otro lado, a partir de los valores promedio de concentración de NaCl se observó que todos los factores incidieron significativamente sobre la ganancia de soluto. Además, al aumentar la temperatura del refrigerante, el caudal o el tiempo se observó que la transferencia de soluto aumentó, mientras que al aumentar la distancia entre la esfera y el orificio, la transferencia de soluto disminuyó. Las experiencias realizadas permitieron identificar las variables operativas de mayor influencia sobre las transferencias de energía y materia que ocurren en los procesos de hidrofluidización.

## ABSTRACT

The hydrofluidization method is a technique for freezing and refrigerating of foods that consists in using a circulating system that pumps the refrigerating liquid upwards, through orifices or nozzles into a refrigerating vessel, thereby creating agitating jets. Thus a highly turbulent flow and a fluidized bed of foods are obtained producing high surface heat transfer coefficients. The objective of this work was to study the heat and mass transfer in a hydrofluidization system using stationary potato spheres impinged by a liquid round jet. The study was carried out using a laboratory-scale hydrofluidization system. Different levels of volumetric flow rate (1 and 3 L $min^{-1}$), refrigerant temperature (-15 and -10 ºC) and orifice-sphere distance (1 and 5 cm) were used. A NaCl-water solution of 23.1 % (w/w) was used as refrigerant. A stationary sphere co-linearly placed in front of a 3-mm diameter round orifice was used. Measurements of temperatures in the geometric center of potato spheres were carried out using a thermocouple T of 30 AWG at 2 Hz frequency. Average sodium chloride concentration within sphere samples at 0, 5, 10 and 20 min were determined. A characteristic freezing time was calculated to compare central temperature profiles. The results showed that with the exception of the orifice-sphere distance, freezing times were affected by all operation variables. In particular, freezing times

decreased when volumetric flow rates increased or refrigerating temperatures decreased. Moreover, freezing times were more affected by refrigerant temperature than volumetric flow rate. On the other hand, results showed that mass transfer was affected by all operation variables. In addition, NaCl concentration within potato spheres increased when refrigerant temperature, volumetric flow rate and time increased or when the orifice-sphere distance decreased. In conclusion, the operation variables that mainly affected heat and mass transfer in hydrofluidization processes were identified.

**PALABRAS CLAVE**: *congelación por hidrofluidización, transferencia de energía, transferencia de materia, papa.*

**KEYWORDS**: *freezing by hydrofluidization, heat transfer, mass transfer, potato.*

## INTRODUCCIÓN

La refrigeración y/o congelación por hidrofluidización (HF) utiliza esencialmente un sistema circulante que bombea un líquido refrigerante a través de orificios o toberas hacia el interior de un recipiente lleno del líquido en cuestión, creando jets de agitación y aumentando la velocidad de transferencia de energía y materia (Verboven *et al*. 2003, Peralta *et al*. 2009). Para tal fin, generalmente se utilizan soluciones acuosas de solutos tales como NaCl, $CaCl_2$, glucosa, sacarosa y etanol, entre otros. Si el proceso es adecuadamente controlado, presenta una aplicación potencial con destacadas ventajas (Fikiin 2003): utilización de equipos de tamaños reducidos y mejoramiento de la congelación individual de alimentos; permite ahorrar cantidades considerables de energía; afecta en menor medida al medio ambiente; y facilita el desarrollo de nuevos productos, ya que en el medio refrigerante pueden ser incluidos antioxidantes, sabores y/o micronutrientes que permitan extender la vida útil de los productos.

Debido a que durante el proceso ocurre una transferencia simultánea de energía y materia, es importante conocer en este tipo de sistemas cómo estas transferencias afectan al flujo de fluido sobre la muestra de alimento. Sin embargo, existe escasa información acerca de cómo las variables operativas afectan los fenómenos de transporte durante los procesos de refrigeración y/o congelación usando esta tecnología (Fikiin, 1985, Fikiin 1992, Fikiin y Fikiin 1998, Scheerlinck *et al*. 2002, Fikiin 2003, Verboven *et al*. 2003). Por otro lado, teniendo en cuenta que es difícil llevar a cabo mediciones experimentales en un sistema que utilice fluidización (Scheerlinck *et al.* 2002), es necesario estudiar primero el efecto de los parámetros del sistema sobre muestras estáticas de alimento (Verboven *et al*. 2003) para luego estudiar sistemas de hidrofluidización en donde el alimento adquiera un estado de fluidización.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar las transferencias de energía y materia en un sistema de hidrofluidización con un único jet circular incidiendo colinealmente sobre una esfera estática de papa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra

Se utilizaron esferas de papa (*Solanum Tuberosum L.*) de 0,0194 ± 0,0001 m de diámetro como sistema alimenticio. La materia prima fue obtenida de un supermercado local, cuidando que todas las papas provengan de una misma cosecha. Las esferas fueron obtenidas utilizando un sacabocados de acero inoxidable. Para evitar posibles pérdidas de humedad, las muestras se obtuvieron 5 min antes de cada experiencia. Debido a que la temperatura de la planta piloto fue aproximadamente constante, todas las esferas alcanzaron temperaturas iniciales similares (15,0 ± 1,2 ºC). El contenido inicial de humedad de las muestras se determinó utilizando 3 esferas de papa por cada condición experimental, en un horno a microondas CEM modelo AVC 80 (CEM, Mattheus, NC, USA), resultando un valor promedio de 86,85 ± 2,23 %.

### Unidad de experimentación

Las experiencias se realizaron en el sistema de hidrofluidización cuya descripción se puede encontrar en Peralta *et al*. (2009). A continuación, se detalla brevemente la configuración utilizada en este trabajo. El equipo consta de una unidad de refrigeración, la cual puede proveer una capacidad aproximada de 2000 W de extracción de energía a una temperatura de -15 ºC a través de un serpentín de acero inoxidable inmerso en un recipiente lleno del líquido refrigerante. Como líquido refrigerante

se utilizó una solución de NaCl-agua al 23,1 % (p/p). Para la generación de un único jet se utilizó una placa con un solo orificio central de 3 mm de diámetro.

## Diseño experimental

Se trabajó con diferentes condiciones de separación entre la esfera y el orificio, temperatura y caudal del refrigerante. Las condiciones estudiadas y su codificación se resumen en la **Tabla 1**. Las esferas se posicionaron en forma colineal al orificio. En total se realizaron 96 determinaciones experimentales.

**Tabla 1**. Condiciones de operación utilizadas en el presente estudio.

| Temperatura del refrigerante [K] | Caudal [L min$^{-1}$] | Separación orificio-esfera [cm] | Código |
|---|---|---|---|
| 263,15 (-10 ºC) | 1 | 1 | T10Q1H1 |
| | | 5 | T10Q1H5 |
| | 3 | 1 | T10Q3H1 |
| | | 5 | T10Q3H5 |
| 258,15 (-15 ºC) | 1 | 1 | T15Q1H1 |
| | | 5 | T15Q1H5 |
| | 3 | 1 | T15Q3H1 |
| | | 5 | T15Q3H5 |

## Perfiles de temperatura central

En cada esfera de papa se insertó una termocupla T de 30 AWG (OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) hasta el centro geométrico de la misma. Para evitar filtraciones de la solución por el conducto de ingreso de la termocupla, el mismo fue sellado mediante adhesivo vinílico. Los valores de temperatura fueron obtenidos a través de un sistema de adquisición de datos Data Shuttle DS-16-8-TC (OMEGA Engineering Inc., Stamford, USA) con una velocidad de 2 Hz y registrados en una computadora portátil. Se obtuvieron 3 perfiles de temperatura por cada condición.

## Perfiles de concentración promedio de NaCl

Para observar la ganancia de sal para cada condición planteada en la **Tabla 1**, se ensayaron muestras de papa a 0, 5, 10 y 20 min. Las muestras extraídas de la solución se lavaron rápidamente con agua y se secaron con papel absorbente. Para la determinación del contenido de NaCl, las muestras fueron pesadas en un tubo de ensayo previamente tarado y se adicionaron entre 25 y 50 ml de agua destilada. Se realizó una reducción de tamaño mediante un homogeneizador Ultraturrax modelo T25 basic (IKA works Inc., Wilmington, USA). Las muestras homogeneizadas se trasvasaron a un erlenmeyer de 100 mL previamente tarado. Se agregó agua para alcanzar aproximadamente 100 g. Una alícuota de este extracto de 3 a 12 g se mezcló con 50 mL de una solución de $HNO_3$ 0,02 N. La mezcla fue incubada durante 1 hora a 50 °C. Las muestras enfriadas durante 15 min se titularon mediante un titulador Mettler modelo DL40RC (Mettler instrumente AG, Greifensee, Switzerland), provisto de un electrodo modelo DM141, con una solución de $AgNO_3$ 0,1 N. Las determinaciones del contenido de NaCl se realizaron por determinación simple y los perfiles de concentración global de NaCl por triplicado.

## Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio de ANOVA multifactorial utilizando Minitab 13.20 (Minitab Inc., State College, USA). Cuando el efecto de los factores fue significativo ($p < 0,05$), se usó el test de Tukey para la comparación múltiple de medias.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Perfiles de temperatura

Para poder comparar los perfiles de temperatura central obtenidos en los ensayos experimentales, se determinó un tiempo característico de congelación $t_5$, el cual se definió como el tiempo necesario para alcanzar una temperatura central de -5 °C (268,15 K) (Delgado y Sun 2001). En la **Tabla 2** se resumen estos tiempos para las condiciones experimentales estudiadas.

Se encontró que con excepción de la distancia entre el orificio y la esfera (*H*), todos los demás factores influyeron significativamente sobre el tiempo de congelación $t_5$. En particular, variaciones positivas en el caudal y negativas en la temperatura del refrigerante produjeron variaciones negativas en los tiempos de congelación. Los tiempos de congelación fueron afectados en mayor medida por la temperatura y en menor medida por el caudal. En la bibliografía se encontró un comportamiento

similar en sistemas compuestos por jets que inciden sobre una superficie plana (Jafari y Alavi 2008). La incidencia de estos factores sobre el tiempo de congelación es esperable debido a que una mayor velocidad y/o una mayor temperatura del fluido produce un aumento en el coeficiente de transferencia de energía superficial (Peralta *et al*. 2009).

**Tabla 2**. Valores de tiempo de congelación $t_5$ para las condiciones estudiadas junto con sus desvíos estándar.

| **Condición** | **Tiempo de congelación $t_5$ [s]** | | |
|---|---|---|---|
| T10Q1H1 | 695,4 | ± | N/D |
| T10Q1H5 | 594,0 | ± | 10,7 |
| T10Q3H1 | 492,1 | ± | 74,2 |
| T10Q3H5 | 451,7 | ± | 7,6 |
| T15Q1H1 | 339,8 | ± | 16,1 |
| T15Q1H5 | 330,6 | ± | 18,9 |
| T15Q3H1 | 267,6 | ± | 2,9 |
| T15Q3H5 | 253,9 | ± | 14,3 |

N/D: No determinado, sólo se tuvo en cuenta una medición debido a que en las otras mediciones se observaron subenfriamientos.

## Perfiles de concentración

Los resultados experimentales de ganancia de NaCl en las esferas de papa se resumen en la **Tabla 3**. Se observó que todos los factores incidieron significativamente sobre la ganancia de soluto. Además, variaciones positivas en la temperatura del refrigerante, el caudal y el tiempo produjeron variaciones positivas en la transferencia de soluto, mientras que variaciones positivas en la distancia entre la esfera y el orificio produjeron variaciones negativas en la transferencia de soluto. Estas variaciones pueden ser explicadas teniendo en cuenta que a mayor temperatura, los coeficientes de transferencia de materia tanto interno como externo al alimento aumentan. Por otro lado, al aumentar el caudal, se produce un aumento de la transferencia de materia debido a que el coeficiente de transferencia de materia superficial aumenta. Finalmente, la incidencia de *H* sobre la transferencia de materia puede ser explicada teniendo en cuenta que a menor *H*, el alimento se encuentra en la región del corazón potencial del jet permitiendo una mayor transferencia de materia en la superficie del mismo (Peralta *et al*. 2009).

**Tabla 3**. Valores de concentración global de NaCl en las esferas de papa [g $kg^{-1}$] para las condiciones y tiempos estudiados junto con sus desvíos estándar[a].

| **Condición** | **Tiempo [s]** | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 300 (5 min) | | | 600 (10 min) | | | 1200 (20 min) | | |
| T10Q1H1 | 8,64 | ± | 0,98 | 13,50 | ± | 1,12 | 20,65 | ± | 1,62 |
| T10Q1H5 | 9,32 | ± | 0,42 | 13,72 | ± | 0,46 | 18,15 | ± | 0,39 |
| T10Q3H1 | 11,05 | ± | 0,52 | 15,94 | ± | 1,37 | 23,63 | ± | 2,57 |
| T10Q3H5 | 10,05 | ± | 1,72 | 13,91 | ± | 0,34 | 21,88 | ± | 2,30 |
| T15Q1H1 | 6,97 | ± | 0,58 | 10,57 | ± | 0,91 | 12,45 | ± | 0,57 |
| T15Q1H5 | 6,88 | ± | 0,57 | 8,86 | ± | 0,77 | 12,92 | ± | 0,63 |
| T15Q3H1 | 8,47 | ± | 0,88 | 12,48 | ± | 0,41 | 15,99 | ± | 2,39 |
| T15Q3H5 | 8,53 | ± | 1,39 | 11,48 | ± | 1,16 | 16,48 | ± | 0,49 |

a: Se observó experimentalmente que inicialmente las esferas de papa no poseían cantidades detectables de NaCl.

## CONCLUSIONES

Se estudiaron las transferencias de energía y materia que tienen lugar en la congelación de esferas de papa por hidrofluidización. Se utilizaron esferas de papa colocadas colinealmente a un orificio generador de un único jet circular de líquido. Las experiencias realizadas permitieron identificar las variables operativas de mayor influencia sobre las transferencias de energía y materia.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional del Litoral (UNL), y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, de la Argentina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Delgado AE, Sun DW. 2001. Heat and mass transfer models for predicting freezing processes – a review. Journal of Food Engineering, 47: 157–174.

Fikiin AG, inventor; 1985. Method and system for water cooling of fish. Bulgaria. Bulgarian Patent No. 40164.

Fikiin AG. 1992. New method and fluidized water system for intensive chilling and freezing of fish. Food Control, 3: 153–160.

Fikiin K. 2003. Nolvelties of food freezing research in Europe and beyond. Institut National de la Recherche Agronomique. Proyect No. QLK1-CT-2000-00040. 56 p.

Fikiin KA, Fikiin AG. 1998. Individual quick freezing of foods by hydrofluidization and pumpable ice slurries. En: IIR Proceedings Series ‘‘Refrigeration Science and Technology”, vol. 6, pp. 319–326.

Jafari M, Alavi P. 2008. Analysis of food freezing by slot jet impingement. Journal of Applied Sciences, 8: 1188–1196.

Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE. 2009. Design and construction of a hydrofluidization system. Study of the heat transfer on a stationary sphere. Journal of Food Engineering, 90: 358−364.

Scheerlinck N, Jancsók P, Verboven P, Nicolaï BM. 2002. Influence of shape on the fast freezing of small fruits by means of hydrofluidisation. En: AgEng, No. 02-PH-034, Budapest, Hungría.

Verboven P, Scheerlinck N, Nicolaï BM. 2003. Surface heat transfer coefficients to stationary spherical particles in an experimental unit for hydrofluidisation freezing of individual foods. International Journal of Refrigeration, 26: 328−336.

# Efecto de la congelación sobre la calidad de ananá osmo-deshidratado

# Effect of freezing on the quality of osmo-dehydrated pineapple

Ramallo LA[1], Mascheroni RH[2]

1. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales - Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1552 - (3300) Posadas, Misiones - Argentina
E-mail: **lram@fceqyn.unam.edu.ar**
2. CIDCA (CONICET La Plata y Universidad Nacional de La Plata) y MODIAL (FI - U.N.L.P.)
47 y 116 – (1900) La Plata - Argentina

## RESUMEN

El proceso de osmo-dehidrocongelación de frutas involucra una etapa de deshidratación osmótica seguida del proceso de congelación. Este pre-tratamiento disminuye el contenido de agua al mismo tiempo que incrementa el contenido de solutos crioprotectores en el tejido vegetal. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la deshidratación osmótica aplicada previamente al proceso de congelación sobre la calidad final de rodajas de ananá. La pérdida de calidad se cuantificó en términos del volumen del líquido exudado y de la firmeza del tejido. Por otra parte se analizó el efecto de un proceso de congelación lento (la condición más desfavorable) sobre el contenido de ácido ascórbico (AA).

En base a los resultados obtenidos en estudios previos, se seleccionó la condición de deshidratación a presión atmosférica, en solución de sacarosa de 60 ºBrix y 40 ºC, con diferentes tiempos de inmersión. La congelación se efectuó en un túnel convencional con circulación de aire a -30 ± 2 ºC y el producto se descongeló a temperatura constante de 20 ºC durante 2 h. Las propiedades mecánicas de la fruta fresca y deshidratada, con y sin el posterior proceso de congelación, se evaluaron a través de ensayos de compresión uniaxial (TA-XT2i Texture Analyser). El contenido de ácido ascórbico se cuantificó por cromatografía líquida (HPLC). Se registraron pérdidas por exudado más altas, 30 % aproximadamente, en muestras de ananá con una hora de deshidratación osmótica respecto de aquellas muestras no tratadas. Con el aumento del tiempo de inmersión en sacarosa disminuyen las pérdidas por exudado, aunque se requirieron períodos de deshidratación osmótica mayores que 240 minutos para obtener resultados positivos del efecto crioprotector del azúcar. El proceso de congelación-descongelación afecta los valores de las propiedades mecánicas (deformación a la fractura ($\varepsilon_{HF}$), tensión de falla ($\sigma_{HF}$) y módulo de elasticidad (E)) como así también la forma de las curvas resultantes. Aún cuando el proceso de deshidratación osmótica de ananá origina una estructura celular igual o más resistente que la fruta fresca, el posterior proceso de congelación-descongelación de estas muestras causa pérdida de firmeza y una marcada disminución de la resistencia a la ruptura. Se observó disminución en el contenido ácido ascórbico después del proceso de congelación-descongelación de la fruta fresca. En cambio, en las muestras de ananá parcialmente deshidratadas, los valores de contenido de ácido ascórbico se mantuvieron sin cambios después del proceso de congelación-descongelación. En 120 minutos de deshidratación osmótica a 40 ºC la reducción de la humedad fue de aproximadamente el 70-75% y la reducción de contenido de ácido ascórbico fue aproximadamente 13-18%.

## ABSTRACT

The osmodehydrofreezing process of fruits involves one step of osmotic dehydration prior to freezing process. This pre-processing diminishes water content at the same time as cryoprotective solutes content in the vegetable tissue is increased. The objective of the present study was to evaluate the effect of osmotic dehydration applied previous to the freezing process on the end quality of pineapple slices. Quality loss was quantified through drip loss and texture changes of tissue. In addition, the effect of a slow freezing process (most unfavorable condition) on ascorbic acid content was analyzed.

On the basis of results obtained in previous studies, the condition of dehydration at atmospheric pressure, in sucrose solution of 60 ºBrix and 40 ºC, by different immersion periods was selected. Freezing was carried out in a conventional air-blast tunnel at -30 ± 2 ºC and the product was thawed at

constant temperature of 20ºC for 2h. Mechanical properties of fresh and dehydrated fruit, with and without the later process of freezing, were evaluated through compression tests (TA-XT2i Texture Analyser). Ascorbic acid content was quantified by liquid chromatography (HPLC). The higher drip loss, 30% approximately higher than for untreated samples, was registered in pineapple with one hour of osmotic dehydration. The drip loss decrease with the increase of the immersion time in sucrose syrup, although periods of osmotic dehydration larger than 240 minutes were required to obtain positive results of the cryoprotective effect of sugar uptake. The freezing-thawing process affects the values of mechanical properties (failure strain ($\varepsilon_{HF}$)), failure stress ($\sigma_{HF}$) and modulus of elasticity (E)) as well as the shape of the curves. Even though the osmotic dehydration process of pineapple induces a cellular structure equal to or more resistant than that of fresh fruit, the following freezing-thawing process of these samples induces a decrease of firmness and a noticeable reduction of resistance to rupture. After the freezing-thawing process of fresh fruit, a reduction in the ascorbic acid content was observed. However, in partially dehydrated samples of pineapple, values of ascorbic acid content remained with no changes after the freezing-thawing process. In pineapple dehydrated during 120 minutes at 40 ºC, the moisture reduction was approximately 70-75% and the ascorbic acid content reduction was approximately 13-18%.

**PALABRAS CLAVE**: *ananá, deshidratación osmótica, congelación.*

**KEYWORDS**: *pineapple, osmotic dehydration, freezing.*

## INTRODUCCIÓN

El proceso de osmo-dehidrocongelación consiste en someter a los materiales (generalmente frutas o vegetales) a una etapa de deshidratación osmótica previo a su congelación. Este pre-tratamiento, además de la ventaja de la remoción de agua y consecuente reducción en la formación de hielo, incrementa el contenido de solutos crioprotectores por impregnación (Tregunno y Goff 1996, Dermesonlouoglou et al. 2007). Han sido publicados estudios que demuestran los efectos beneficiosos de la deshidratación osmótica como pre-tratamiento al congelado de frutas disminuyendo el pardeamiento (Forni et al. 1997, Marani et al. 2007), el colapso estructural (Talens et al. 2002b) y el exudado durante la descongelación (Marani et al. 2007). Un beneficio adicional está relacionado al consumo energético durante la etapa de congelación, puesto que la energía requerida para la congelación de un alimento parcialmente deshidratado es menor que la requerida para congelar el vegetal fresco, ya que es inferior la cantidad de agua en el producto (Marani et al. 2007).

Los resultados publicados por Dermesonlouoglou et al. (2007) indican que el proceso de osmo-dehidrocongelado mejora la calidad de tomates durante un período de almacenamiento prolongado, en comparación al producto obtenido con el proceso de congelado tradicional. La retención de vitamina C en las muestras de tomate pre-deshidratadas con glucosa y almacenadas a -20 ºC durante 12 meses fue notablemente mayor que en las muestras congeladas sin tratamiento previo. Resultados similares en lo que respecta a la mayor retención de ácido ascórbico en damascos pre-deshidratados y congelados en comparación con damascos congelados de modo tradicional fueron hallados por Forni et al. (1997).

Se ha estudiado la osmo-dehidrocongelación de varios vegetales: damasco (Forni et al. 1997); manzana (Tregunno y Goff, 1996; Marani et al. 2007); kiwi (Forni et al. 1990; Robbers et al. 1997; Talens et al. 2002b, Chiralt el al. 2001, Marani et al. 2007); melón (Maestrelli et al. 2001); haba (Biswal et al. 1991); frutilla (Chiralt el al. 2001, Talens et al. 2002a, Marani et al. 2007); mango (Nunes et al. 1996, Chiralt el al. 2001), pera (Marani et al. 2007), entre otros. Sin embargo, no se tiene registros de estudios de osmo-dehidrocongelación de ananá.

En el presente trabajo se estudió la variación de algunas características físicas, como la pérdida de líquido por exudado, las propiedades mecánicas y calidad nutricional, en base al contenido de ácido ascórbico, en ananá como consecuencia de aplicación del proceso de osmo-dehidrocongelación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de la muestra

Se trabajó con frutas de *Ananas Comosus variedad Cayena Lisa* en grado de madurez comercial y textura aún firme, obtenida en locales comerciales. Las frutas fueron lavadas con abundante agua,

peladas manualmente y cortadas en medias rodajas de 0,60 ± 0,05 cm de espesor y 11,5 ± 0,5 cm de diámetro; con un sacabocados se les retiró el centro.
Debido a que existe variación en el contenido de algunos nutrientes entre la base y la parte superior de la fruta (Miller y Hall, 1953), se descartaron los extremos utilizándose la parte media del ananá con el objetivo de disminuir la variabilidad natural del tejido.

## Deshidratación osmótica

La deshidratación osmótica (DO) se realizó con solución hipertónica de sacarosa de 60º Brix a 40 ºC. El volumen de la solución fue suficiente para garantizar constancia en la concentración de azúcar durante todo el proceso (relación masa jarabe/masa de fruta mayor que 10/1). Para cada ensayo se preparó solución fresca de sacarosa.
El equipamiento utilizado para los tratamientos de DO fue un agitador, con frecuencia de 75 oscilaciones horizontales por minuto y amplitud de 1 cm, con soporte para 6 frascos erlenmeyer. En cada erlenmeyer conteniendo 500 mL de solución de sacarosa a 40 ºC se colocaron cinco muestras de ananá; los frascos se transfirieron en forma inmediata al agitador preacondicionado a 40 ºC. A cada tiempo (30, 60, 120, 180 y 240 minutos) se retiró un erlenmeyer, se enjuagó cada muestra con agua desmineralizada a 8 ºC durante 3-5 segundos con el propósito de quitar el jarabe adherido a la superficie y el exceso de agua superficial proveniente de esta última etapa se eliminó con papel tissue. Se registró el peso de cada muestra.
Posteriormente, una parte de estas frutas procesadas se fraccionó para evaluar propiedades mecánicas y humedad, y otra parte se destinó a la congelación. Para evaluar la retención de ácido ascórbico, se realizaron ensayos de deshidratación osmótica a 40 y 45 ºC.

## Tratamiento de congelación-descongelación

Las muestras, ananá fresco y parcialmente deshidratado, fueron almacenadas durante 12 horas a 4 ºC en recipientes plásticos cerrados, previamente al proceso de congelado. Posteriormente estas muestras, colocadas sobre bandejas de acero inoxidable perforadas, fueron congeladas en cámaras con circulación de aire a -30 ± 2 ºC. Al cabo de una hora se retiraron de la cámara de congelación y el descongelado se realizó a temperatura constante de 20 ºC durante 2 h.

## Evaluación de las propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de la fruta fresca, deshidratada y congelada-descongelada se evaluaron a través de ensayos de compresión uniaxial utilizándose a tal fin un Texturómetro Universal (TA-XT2i Texture Analyser) con un plato de acrílico de 60 mm. Las muestras de ananá se cortaron con sacabocados en discos de 25 mm de diámetro. La velocidad de compresión aplicada fue de 0,5 mm/s hasta el 50% de deformación de la altura original de la muestra. Estos ensayos se realizaron sobre cinco muestras, a cada tiempo de procesamiento, tomándose la media de estas cinco determinaciones.
Durante los ensayos, se registraron los datos de fuerza *F(t)* (N) y altura *H(t)* (m). Estos datos fueron posteriormente convertidos a los parámetros de Hencky: tensión ($\sigma_H$) y deformación ($\varepsilon_H$), suponiendo volumen constante durante la compresión (Chiralt et al. 2001, Rodrigues et al. 2003), de acuerdo a las Ecuaciones 1 y 2.

$$\sigma_H = \frac{F(t)H(t)}{H_0 A_0} \qquad (1)$$

$$\varepsilon_H = -\ln\left(\frac{H(t)}{H_0}\right) \qquad (2)$$

donde $A_0$ es el área inicial ($m^2$) y $H_0$ es la altura inicial (m) de la muestra.
El módulo elástico o módulo de compresión (*E*), considerado como una medida de la resistencia elástica del sistema, fue calculado como la pendiente inicial de la curva $\sigma_H$-$\varepsilon_H$, mientras la deformación $\varepsilon_H$ no supere el 6% (Mao et al. 2000; Renkema et al. 2001; Ribeiro et al. 2003):

$$E = \left(\frac{\mathrm{d}\sigma}{\mathrm{d}\varepsilon}\right)_{\varepsilon \to 0} \qquad (3)$$

## Medidas de exudado

Las muestras congeladas se colocaron sobre papel absorbente y se dejaron descongelar a temperatura constante de 20 ºC durante 2 h. Todo el sistema se cubrió con papel de aluminio para minimizar las pérdidas por evaporación. Se registró el peso inicial de cada muestra ($M_i$), el peso del papel seco ($w_0$) y el peso del papel con el líquido de exudado ($w_t$).

Los resultados se expresaron en gramos de agua perdida por exudado por gramo de fruta:

$$DL = \frac{w_t - w_0}{M_i} \qquad (4)$$

## Determinación del contenido de agua

El contenido de agua se cuantificó mediante la pérdida de peso por desecación en estufa de a 70 °C hasta pesada constante (aproximadamente 48 horas).

## Cuantificación de ácido ascórbico

**Proceso de Extracción**. Cada muestra fue pesada (entre 5 y 8 g) y triturada en un mortero de porcelana durante 5 minutos, con la adición, en forma gradual, de 50 mL de solución buffer (fosfato de potasio 0,02M, pH=2,5 ajustado con ácido fosfórico). Esta mezcla se transfirió a un vaso de vidrio oscuro, se sometió a ultrasonido por 10 minutos, se filtró y, de inmediato, se inyectó al cromatógrafo.

**Cuantificación del ácido L-ascórbico**. Se llevó a cabo mediante cromatografía líquida (HPLC), con columna Alltima C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) y detector UV (λ = 254 nm). Se utilizó una fase móvil formada por buffer (fosfato de potasio 0,02M, pH=2,5 ajustado con ácido fosfórico): acetonitrilo (98:2 v/v) a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min. La identificación y cuantificación se realizó por comparación del tiempo de retención y magnitud del área del pico con un estándar de referencia, respectivamente. Las muestras estándar de ácido L-ascórbico se prepararon diluyendo 100 mg de ácido L-ascórbico (A-0278, SIGMA) en 100 mL de buffer; posteriormente esta solución se diluyó 1/10, 1/50 y 1/100. Se tomó como referencia el área obtenida con la inyección de 10 µl de estándar concentración 0,02 mg/ml (técnica de patrón externo); se cuantificó el área de referencia al iniciar y al finalizar cada sesión de cromatografía.

Los análisis en todos los casos se realizaron por duplicado y los resultados que se exponen son los valores medios.

## Análisis estadístico

Los parámetros estadísticos aplicados en la evaluación y análisis de los resultados, son los siguientes:

Desvío estándar: $$ds = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \qquad (5)$$

Donde: n= número de muestras o de datos; $x_i$= valor o dato; $\bar{x}$ = valor medio o media aritmética de los datos.

Media aritmética: $$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \qquad (6)$$

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Cambio en las propiedades mecánicas

Son numerosos los factores que afectan las propiedades mecánicas del tejido celular, entre ellas figuran el contenido de agua, la resistencia de la pared celular y la forma en que están ensambladas la células (Chiralt et al. 2001). Dependiendo de las propiedades físicas de las muestras, se han descrito dos modos de falla a la compresión: ruptura celular y desligamiento de las células (Chiralt et al. 2001). La congelación, debido a la formación de hielo, produce cambios en el tejido celular que pueden

afectar el mecanismo de falla predominante durante la compresión. Este efecto puede manifestarse a través del comportamiento mecánico del sistema.
En la **Figura 1** se presentan curvas de compresión uniaxial características de medias rodajas de ananá sometidas a diferentes tiempos de deshidratación osmótica en solución de sacarosa de 60 ºBrix y 40 ºC. El modulo de compresión, la tensión y la deformación a la ruptura son propiedades mecánicas que suelen estar asociadas a la firmeza, dureza y elasticidad, respectivamente (Torres et al. 2006). Se observa que la deshidratación osmótica genera un incremento en la deformación a la fractura ($\varepsilon_{HF}$) y en los valores de la tensión de falla ($\sigma_{HF}$), indicando un aumento en la "dureza" de la fruta por efecto de la deshidratación. De la misma manera, se registró una disminución en los valores de la pendiente inicial de la curva o módulo de compresión (*E*), que puede explicarse por la pérdida de turgencia del tejido vegetal. Estas modificaciones en el comportamiento mecánico indicarían que el tratamiento de DO no genera un desligamiento celular como mecanismo de falla dominante.

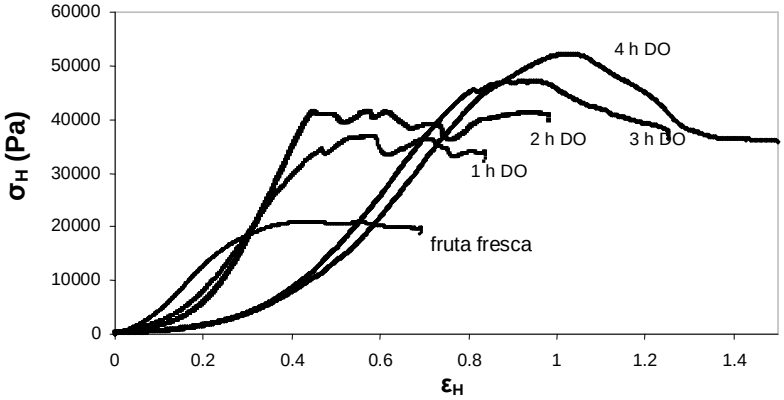


**Figura 1**. Curvas de compresión uniaxial de ananá con diferentes tiempos de deshidratación osmótica a 60 ºBrix y 40 ºC.

En la **Figura 2** se aprecia el efecto del proceso de congelación-descongelación sobre la respuesta mecánica del ananá fresco y deshidratado. El proceso de congelación-descongelación provoca una marcada disminución en los valores de resistencia a la tensión y se desdibujan los puntos de falla en la fruta con mayor contenido de agua (menos tiempo de deshidratación), por lo cual se podría suponer que el desligamiento celular es el modo de falla preponderante en ananá deshidratado-congelado-descongelado. La comparación de las **Figuras 1** y **2** indica claramente que la congelación-descongelación produce una disminución de la resistencia a la ruptura de la fruta de ananá.

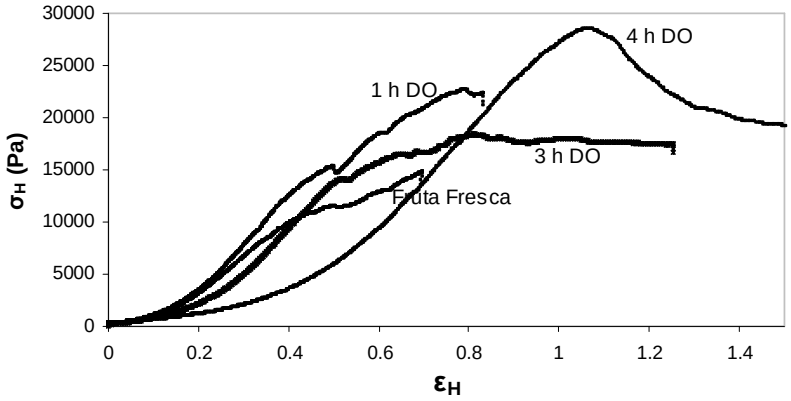


**Figura 2**. Curvas de compresión uniaxial de ananá con diferentes tiempos de deshidratación osmótica y posterior proceso de congelación-descongelación.

Estas diferencias se evidencian en la **Figura 3** donde se muestran los valores de $\sigma_{HF}$ de muestras de ananá con distintos tiempos de deshidratación y los valores obtenidos para las correspondientes muestras luego del proceso de congelación-descongelación. Cada punto es el promedio de cinco medidas diferentes. Como se observó anteriormente, $\sigma_{HF}$ aumenta con el tiempo de deshidratación lo cual manifiesta un aumento en la dureza de la fruta, pero este efecto se pierde luego de la congelación ya que los valores de tensión a la fractura de las muestras deshidratadas disminuyen drásticamente luego del proceso de congelación-descongelación. Las muestras con mayor grado de deshidratación son las que exhiben la mayor variación de $\sigma_{HF}$ por efecto de la congelación. Este comportamiento es similar al registrado por Maestrelli et al. (2001) al aplicar DO como pretratamiento en la congelación de melón. Torreggiani et al. (1999) encontraron que si bien el proceso de congelación-descongelación provoca una disminución en la firmeza de frutillas, esta propiedad mecánica no difiere entre las muestras con 0, 2 y 4 horas de inmersión en solución de glucosa después del proceso de congelación-descongelación. Marani et al. (2007) mostraron que diferentes frutas presentan distinto comportamiento mecánico durante la deshidratación osmótica y que dicho comportamiento varía, además, con el tipo de azúcar utilizado en el proceso.

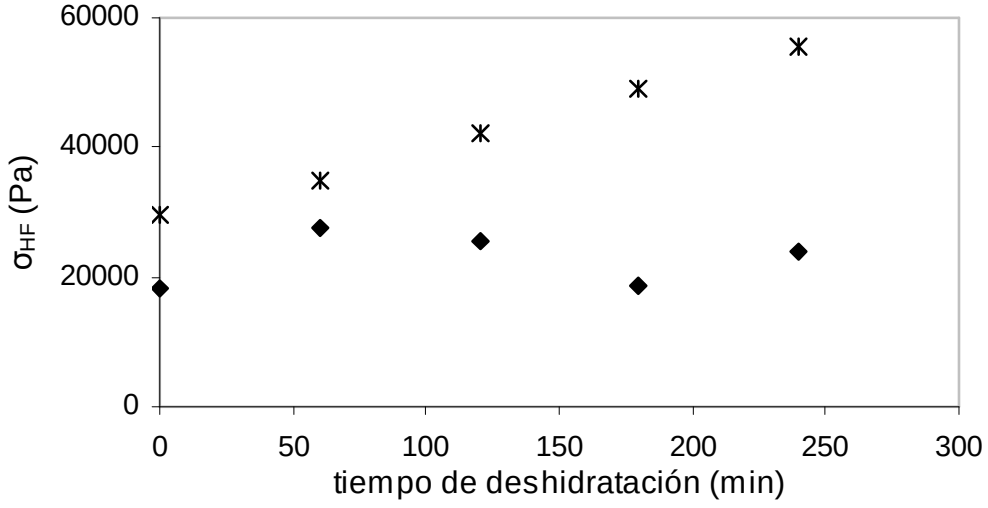


**Figura 3.** Valores de tensión a la fractura durante el proceso de deshidratación osmótica de ananá (*) y luego de un proceso de dehidrocongelado (♦).

La **Figura 4** muestra la variación de la deformación a la fractura durante la deshidratación osmótica de ananá y los valores obtenidos para las correspondientes muestras después del proceso de congelación-descongelación. La deformación a la fractura se incrementa con el tiempo de deshidratación; la congelación-descongelación provoca un aumento en los valores de este parámetro acentuándose este efecto en las muestras con mayor humedad. Estos resultados señalan que el proceso de congelación-descongelación genera pérdida de firmeza en el tejido vegetal, principalmente en las muestras de ananá sin deshidratar o mínimamente deshidratadas. Este resultado puede ser atribuido al daño celular generado por la formación de cristales de hielo. Talens et al. (2002b) registraron un comportamiento similar en kiwi, donde los mayores cambios de $\varepsilon_H$ por efecto de la congelación se producen en la fruta sin deshidratar. Se podría suponer que en las muestras con mayor tiempo de DO (menor contenido de agua,) el efecto de daño de la estructura por efecto de la formación de hielo es mucho menos marcado al formarse menos cristales de hielo por causa de ese menor contenido de agua.

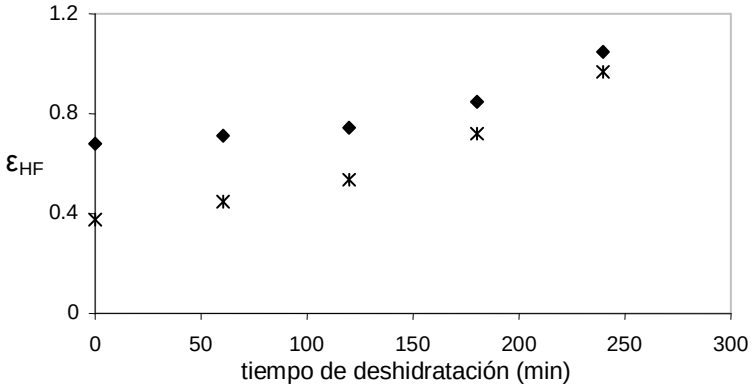


**Figura 4**. Valores de deformación a la fractura durante el proceso de deshidratación osmótica de ananá (*) y luego de un proceso de dehidrocongelado (♦).

Por otra parte, la deshidratación osmótica provoca disminución en el módulo de compresión del ananá. De los resultados mostrados en la **Figura 5** se puede resaltar que los cambios más importantes de este parámetro ocurren durante la primera hora de DO y que el proceso de congelación-descongelación no afecta a los mismos.

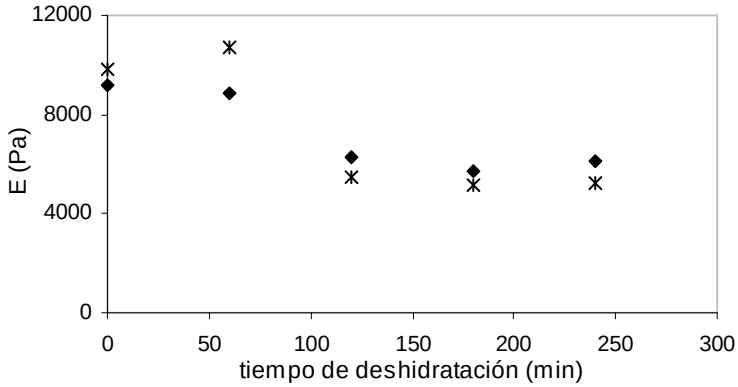


**Figura 5**. Variación del módulo de compresión en muestras de ananá con diferentes tiempos de deshidratación osmótica (*) y luego del proceso de congelación-descongelación de las muestras parcialmente deshidratadas (♦).

## Pérdidas de agua por exudado

Todas las muestras pierden líquido durante el proceso de descongelación. Se observó un aumento en la cantidad de exudado en las medias rodajas de ananá con una hora de deshidratación osmótica respecto de las muestras que no estuvieron en contacto con la solución hipertónica (**Figura 6**). Este resultado parece contradecir las expectativas del efecto crioprotector del azúcar (Nunes et al. 1996; Talens et al. 2002b), pero dicho comportamiento podría explicarse en base al perfil de soluto y de humedad generado durante el proceso osmótico. Durante el período de descongelación, la elevada concentración de azúcar en la superficie de la muestra puede provocar la migración de agua desde el interior, donde la concentración de soluto ha permanecido prácticamente constante (Ramallo y Mascheroni, 2005). Similar comportamiento fue reportado por Marani et al. (2007) durante la descongelación de frutillas previamente sometidas a deshidratación osmótica; Akbaba y Icier (1998) encontraron que la cantidad de exudado de frutillas envasadas cubiertas con azúcar cristalino fue mayor que en frutillas frescas.
Con el aumento del tiempo de inmersión en solución de sacarosa disminuyen las pérdidas por exudado, aunque se requieren períodos de deshidratación osmótica mayores que 240 minutos para obtener resultados positivos del efecto crioprotector del azúcar impregnado en la matriz vegetal. A este tiempo la concentración de sacarosa aumentó aproximadamente tres veces su valor inicial.

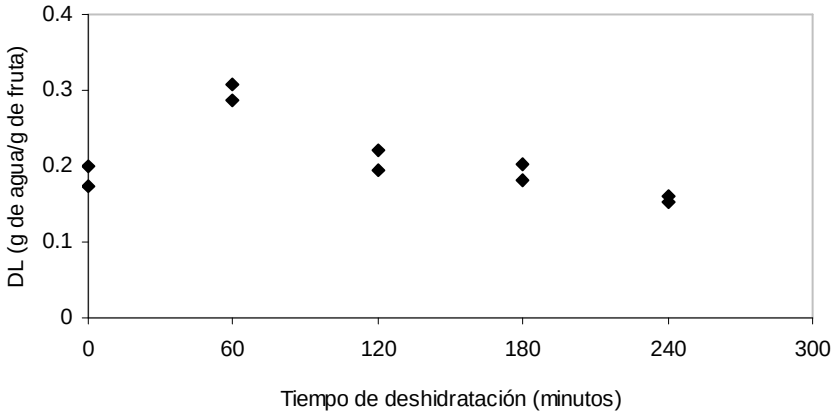


**Figura 6**. Exudado producido durante la descongelación de medias rodajas de ananá previamente sometidas a distintos tiempos de deshidratación en solución de sacarosa.

## Pérdidas de vitaminas

### Efecto de la deshidratación osmótica-congelación-descongelación

El incremento de la temperatura favorece la velocidad del proceso de deshidratación, pero simultáneamente se incrementa la velocidad de desaparición del AA. El tiempo requerido para que el contenido de agua descienda al 50% y al 30% del valor inicial y la respectiva retención de ácido ascórbico, a cada temperatura, se muestran en la **Tabla 1**. Cada valor es el resultado de la media de tres ensayos y se presentan junto al desvío estándar respectivo.

**Tabla 1**. Retención de ácido ascórbico (AA) en medias rodajas de ananá durante el proceso de deshidratación osmótica con solución de sacarosa de 60 ºBrix.

| Temperatura (ºC) | 50 % de la humedad inicial | | 30 % de la humedad inicial | |
|---|---|---|---|---|
| | Tiempo (min) ± ds | % de retención de AA ± ds | Tiempo (min) ± ds | % de retención de AA ± ds |
| 40 | 40 ± 8 | 96 ± 2 | 110 ± 10 | 86 ± 2 |
| 45 | 35 ± 6 | 94 ± 5 | 100 ± 8 | 80 ± 3 |

Para evaluar el efecto de la congelación sobre la retención de ácido ascórbico se escogieron condiciones más desfavorables: la fracción de fruta destinada a este proceso se congeló en freezer del tipo domiciliario por doce horas y se cuantificó el contenido de vitamina C por HPLC luego de 2 h de descongelación. Los valores de contenido de ácido ascórbico se representan relativos al contenido del mismo en la fruta fresca, sin congelar y congelada respectivamente, $C/C_0$. Las concentraciones se midieron en mg de vitamina por 100 gramos de fruta fresca.

No se registraron diferencias entre los valores de contenido de ácido ascórbico en las muestras deshidratadas y en las muestras deshidratadas-congeladas-descongeladas (**Figura 7**), excepto en los primeros tiempos de deshidratación, donde las pérdidas por exudado son más importantes como se mostró anteriormente. Por otra parte, las muestras de ananá fresco presentaron una cantidad notable de exudado luego del proceso de congelación-descongelación, aunque no fue cuantificado en estos ensayos específicos de congelación lenta. Se valoró el contenido de ácido ascórbico en el exudado y

los valores hallados indicaron que mientras que en la fruta congelada-descongelada la concentración fue de $C_{AA}$ = 14,4±1,03 mg/100 g de fruta, en el exudado fue de $C_{AA}$ = 18,37±1,32 mg/100 mL.

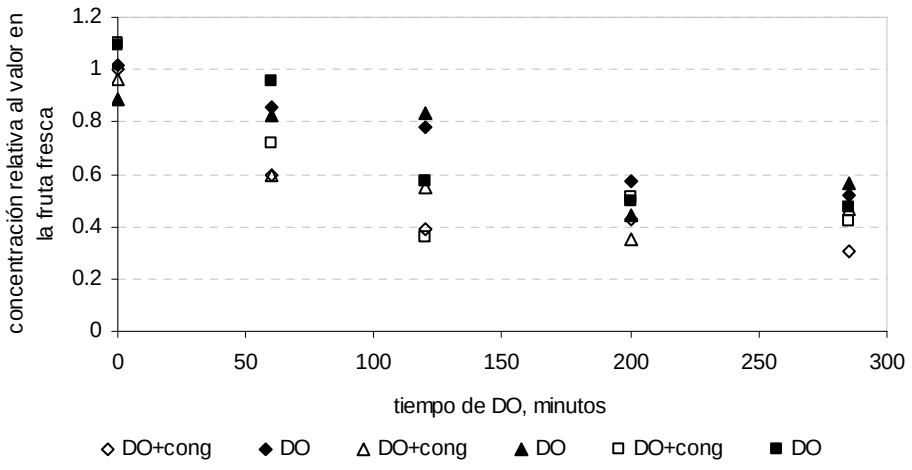


**Figura 7**. Variación del contenido de ácido ascórbico en ananá durante la deshidratación osmótica a 45ºC - 60ºBrix antes del congelado (símbolos llenos) y después del congelado (símbolos huecos).

A través de la comparación de los resultados se puede demostrar que durante la primera hora de procesamiento 45 ºC se extrajo aproximadamente el 62% del agua contenida en la fruta, en tanto que la pérdida de ácido ascórbico fue de aproximadamente el 20%.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que una etapa de pre-tratamiento de deshidratación osmótica tiene el beneficioso efecto de disminuir el tiempo necesario para la congelación de las muestras de ananá.

Aún cuando el proceso de deshidratación osmótica de ananá origina una estructura celular igual o más resistente que la fruta fresca, el posterior proceso de congelación-descongelación de las mismas causa pérdida de firmeza y una marcada disminución de la resistencia a la ruptura.

En la fruta fresca se observó disminución en el contenido ácido ascórbico después del proceso de congelación-descongelación.

En las muestras de ananá parcialmente deshidratado, donde la cantidad de exudado es muy importante, los valores de contenido de ácido ascórbico disminuyeron después del proceso de congelación-descongelación. En 120 minutos de deshidratación osmótica a 45 ºC la humedad se reduce en un 70-75% y el contenido de ácido ascórbico en un 30% aproximadamente.

Los resultados obtenidos indican que el proceso de deshidratación osmótica previo a la congelación de ananá puede incrementar el volumen de exudado resultante. Así, las pérdidas por exudado fueron mayores en muestras de ananá con una hora de deshidratación osmótica respecto de aquellas que no estuvieron en contacto con la solución hipertónica; seguidamente estos valores disminuyen en relación al incremento del grado de deshidratación de la matriz vegetal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS


Akbaba H, Icier F. 1998. Effect of sugar treatments on freezing of strawberries. Proceedings of Advances in the Refrigeration Systems, Food Technologies and Cold Chain Commissions B2, C2 & D1-3. Sofia, Bulgarie. International Institute of Refrigeration, 6: 570-577

Biswal R, Bozorgmehr K, Tompkins F, Liu X. 1991. Osmotic concentration of green beans prior to freezing. Journal of Food Science, 56(4): 1008-1012.

Chiralt A, Martínez-Navarrete N, Martínez-Monzó J, Talens P, Moraga G, Ayala A, Fito P. 2001. Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: Cryoprotectant effect . Journal of Food Engineering, 49(2-3): 129-135

Dermesonlouoglou E, Giannakourou M, Taoukis P. 2007. Stability of dehydrofrozen tomatoes pretreated with alternative osmotic solutes. Journal of Food Engineering, 78: 272–280.

Forni E, Sormani A, Scalise S, Torreggiani D. 1997. The influence of sugar composition on the colour stability of osmodehydrofrozen intermediate moisture apricots. Food Research International, 30: 87-94.

Forni E, Torreggiani D, Crivelli G, Maestrelli A, Bertolo G Santelli F. 1990. Influence of osmosis time on the quality of dehydrofrozen kiwi fruit. Acta Horticultuare, 282: 425–434.

Maestrelli A, Lo Scalzo R, Lupi D, Bertolo G, Torreggiani D. 2001. Partial removal of water before freezing: cultivars and pre-treatments as quality factors of frozen muskmelon (Cucumis melo, cv reticulates Naud.). Journal of Food Engineering, 49: 255–260.

Mao R, Tang J, Swanson BG. 2000. Texture properties of high and low acyl mixed gellan gels. Carbohydrate Polymers, 41: 331-338.

Marani C, Agnelli M, Mascheroni R. 2007. Osmo-frozen fruits: mass transfer and quality evaluation. Journal of Food Engineering, 79: 1122–1130.

Miller E, Hall G. 1953. Distribution of Total Soluble Solids, Ascorbic Acid, Total Acid, and Bromelin Activity in The Fruit of the Natal Pineapple (*Ananas Comosus L. merr*). Plant Physiol., 28(3): 532–534.

Nunes MH, Miguel MH, Kieckbusch TG. 1996. Influencia dos solutos na conservacao de fatias de manga no processo combinado desidratacao osmotica e congelamento. Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências Térmicas (VI ENCIT) e VI Congreso Latinoamericano de Transferencia de Calor y Materia (LATCYM 96), Florianópolis-SC, Brasil, vol. I: 647-650.

Ramallo LA, Mascheroni RH. 2005. Rate of water loss and sugar uptake during the osmotic dehydration of pineapple. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(5): 761-770.

Renkema J, Knabben J, Van Vliet T. 2001. Gel formation by β-conglycinin and glycinin and their mixtures. Foods Hydrocolloids, 15 (4-6): 407-414.

Ribeiro KO, Rodrigues MI, Sabadini E, Cunha RL. 2003. Mechanical properties of acid sodium caseinate-k-carrageenan gels: effect of co-solute addition. Food Hydrocolloids, 18: 71–79.

Robbers M, Singh RP, Cunha LM. 1997. Osmotic-convective dehydrofreezing process for drying kiwifruit. Journal of Food Engineering, 62(5):1039-1047.

Rodrigues A, Cunha R, Hubinger M. 2003. Rheological properties and colour evaluation of papaya during osmotic dehydration processing. Journal of Food Engineering, 59: 129–135.

Talens P, Escriche I, Martinez-Navarrete N, Chiralt A. 2002a. Study of the influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of strawberries. Journal of Foods Science, 67: 1648-1653.

Talens P, Martínez-Navarrete N, Fito P, Chiralt A. 2002b. Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 3:191-199.

Torreggiani D, Rondo Brovetto B, Maestrelli A, Bertolo G. 1999. High quality strawberry ingredients by partial dehydration before freezing. Proceedings of 20th International Congress of Refrigeration, Vol. IV, paper 405.

Torres J, Talens P, Escriche I, Chiralt A. 2006. Influence of process conditions on mechanical properties of osmotically dehydrated mango. Journal of Food Engineering, 74: 240–246.

Tregunno N, Goff H. 1996. Osmodehydrofeezing of apples: structural and textural effects. Food Research International, 29: 471-479.

# Análisis de mecanismos de transferencia en alimentos porosos

# Analysis of transport mechanisms in porous foods

Reinheimer MA (1), Pérez GA (2)

(1) INGAR -Instituto de Desarrollo y Diseño- CONICET-UTN. Santa Fe, Argentina
(2) Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina
mareinheimer@santafe-conicet.gov.ar

## RESUMEN

El objetivo del trabajo es analizar el mecanismo de intercambio de materia en un alimento sólido. También se analizarán brevemente algunos aspectos relacionados al transporte de energía y/o movimiento. El enfoque es para aquellos alimentos sólidos que pueden considerarse como una matriz multifásica porosa. Se enfatiza que los diferentes fenómenos que están presentes en el sistema dependen de las propiedades físicas del fluido: densidad y viscosidad; y de propiedades relacionadas con la matriz sólida: porosidad, tortuosidad, forma y tamaño de poros. La discusión de este trabajo se basa en marcar las diferencias que se pueden presentar en el transporte dentro del alimento en función de la microestructura del mismo. Cabe destacar que diferentes fenómenos prevalecerán en cada caso, dependiendo del fluido (gases, vapor, agua) que ocupe los poros. Pero, solamente, aquellos que permiten el flujo de fluidos serán los responsables de la transferencia o intercambio de materia. Se analizaron diferentes operaciones y se listaron cuales de las posibles fuerzas probablemente intervinientes: fuerzas capilares, gradientes de presión, de concentraciones, etc., prevalecerán en los flujos; que pueden ser convectivos (flujo Darcy) y/o difusivos (molecular, capilar, Knudsen). Esta caracterización, también, se basa en la interpretación de la microestructura porosa y su participación en la transferencia. De lo aquí planteado, se concluye que no solo conocer el parámetro porosidad, es necesario para hacer una descripción completa de los fenómenos intervinientes en las distintas operaciones, sino inclusive, caracterizar la naturaleza de los poros con un conocimiento de la microestructura o hipótesis conducentes a la interpretación de ésta. También se concluye luego del análisis, que contemplar solamente el gradiente de concentración como fuerza impulsora, desprecia fenómenos internos importantes a causa de la presión y en menor medida la temperatura del sistema durante la transferencia de materia.

## ABSTRACT

The present study aims at analysing the transfer mechanism of matter found in solid foods. Other aspects related to energy and/or momentum will be also briefly analysed. This study focuses on the kind of solid foods that can be considered as a porous multi-phase matrix. It is emphasized that the mechanism of the transport phenomena within depends not only on the physical properties of fluids, such as density and viscosity, but also on the properties related to the solid matrix, such as porosity, tortuosity, shape and size of the pores. This paper attempts to highlight the differences that can be present in the transport within the food as a consequence of its microstructure. It is worth mentioning that different phenomena will prevail in each case, depending on the fluid (gas, vapour, water) inside the pores. Nevertheless, only the pores that allow the flow of fluids are responsible for the matter transfer or exchange. Different unit operations and the possible driven forces which mainly act in each case, such as: capillary forces, pressure driven, concentration gradients were analysed. Also, the type of flow, which can be convective (Darcy Flow) and/or diffusive (molecular, capillary, Knudsen), was examined. This characterization is supported by the interpretation of the porous microstructure and its role in transfer phenomena. Therefore, knowing the porosity is not enough to make a complete description of what happens inside the solid foods during processing, because the nature and characterization of the pores are also important factors. In conclusion, considering concentration gradient as the only driven force disregards other important internal phenomena which can be driven by the system pressure or temperature to a lesser extent during matter transfer.

**PALABRAS CLAVE**: *microestructura, transporte multifásico, flujo convectivo, flujo difusivo.*

**KEYWORDS**: *microstructure, multiphase transport, convective flow, diffusion.*

## INTRODUCCIÓN

Típicamente, un sistema alimenticio se considera que es isotrópico, homogéneo y continuo, con solo dos o tres componentes distribuidos en una o dos fases (Crank 1985). Se generaliza diciendo que los alimentos sólidos son sistemas multifásicos similares a medios porosos, pudiendo aplicar la fluidodinámica de los medios porosos para describir los cambios que sufren durante las diferentes operaciones unitarias o tratamientos de acondicionamiento o preservación.

Utilizando el concepto de continuo ficticio pueden definirse las propiedades que describen el medio poroso, que son la densidad (real y aparente) porosidad (fracción de poros), tortuosidad (relación entre la distancia recta entro dos puntos en un paso curvo) y permeabilidad de las fases. Existes diferentes métodos para lograr medir estas propiedades publicados en Sahin y Sumnu (2006).

A los fines de una caracterización para la modelación más rigurosa conviene describir a los alimentos sólidos como sólidos con características porosas y propiedades resultantes de su textura, contenido de agua, capacidad gelificante, etc. Es decir que su caracterización más general será de un medio poroso, con capacidad de intercambio de materia y energía en toda su superficie, pudiendo su interior conectarse con el medio ambiente a través de los canales porosos o por la misma capa sólida superficial.

Existen antecedentes de distintas teorías del uso de medios porosos para describir los procesos de transporte. La descripción del transporte de flujo en un medio poroso considerando exactamente la geometría interna de la estructura sólida es generalmente intratable (Bear 1972). Este aspecto, se vuelve más relevante aún, para el caso de los alimentos, ya que tanto los animales que se destinan para consumo humando, como las frutas y hortalizas, varían en la composición de sus tejidos, dependiendo de la época del año para el caso de cultivos, el clima, el tipo de alimentación para los animales, características del suelo, etc. Esto hace casi imposible generalizar, tanto propiedades físicas, como estructurales. Una manera exacta se refiere a la solución de las ecuaciones de Navier-Stokes para determinar la distribución de velocidad del fluido en los espacios huecos. Inclusive si podemos describir y resolver tales detalles, las soluciones conducen a valores de poco uso práctico (Datta 2007). Por esta razón el continuo estándar no puede ser usado en estos casos. Si bien el estudio de mecanismos de transporte en medios porosos es un campo muy activo, las aplicaciones en materiales alimenticios son escasas, tal vez debido a la dificultad de obtener parámetros de procesos, y la complejidad de las formulaciones de las teorías existentes. La intención del trabajo, es marcar algunos conceptos claves para el estudio del transporte en alimentos sólidos, en donde se relacionen aspectos estructurales con propiedades y mecanismos de transporte.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características de los alimentos porosos

Un medio poroso, se refiere a un sólido conteniendo espacios huecos, o poros, los cuales se encuentran llenos de algún fluido (gas o líquido). Para el análisis, los poros de los alimentos son divididos en tres grupos: poros cerrados, que tienen todos sus lados cerrados; poros ciegos o tapados, que tienen un extremo cerrado; y los poros que permiten el paso de materia a través de ellos, donde ocurre el flujo de fluidos (**Figura 1**).

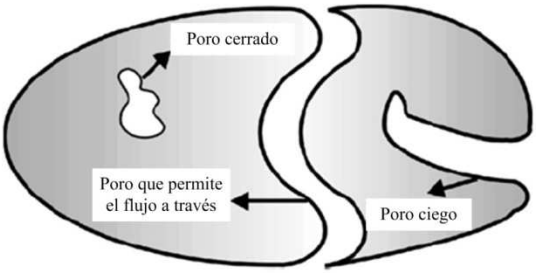


**Figura 1.** Clasificación de los diferentes poros (Sahin y Sumnu 2006).

A los fines de la transferencia de cantidad de movimiento, los medios porosos tendrán un comportamiento global como sólido, pero podrán sufrir internamente procesos fluidodinámicos tales como capilaridad, aumento de presión en los canales, etc.

## Análisis de mecanismos de transferencia

Los mecanismos de movimiento de humedad dentro de los alimentos sólidos pueden ser resumidos, como transporte de vapor y agua líquida. Los mecanismos de transporte de vapor y en algunos casos aire, consisten de la difusión molecular, difusión de Knudsen, difusión de Stefan, flujo Poiseuille, flujo Darcy y condensación-evaporación. Por otro lado, los mecanismos de transporte de agua líquida dentro de los alimentos sólidos son, flujo capilar, difusión molecular y difusión superficial. A pesar de esto, la difusión es el mecanismo dominante:

Difusión molecular: Los gases como el vapor de agua y el aire en el medio poroso pueden moverse por difusión molecular si los poros son suficientemente grandes.

Difusión de Knudsen: este tipo de difusión ocurre en sólidos con pequeños poros llenos de gases, o a baja presión cuando el principal camino libre de las moléculas es mayor que el tamaño del poro y las moléculas colisionan con las paredes mas seguido que entre ellas mismas. En este caso, el flujo de agua es una función de la densidad de vapor y de la difusividad del vapor dentro del producto. El tamaño y cantidad de poros, la tortuosidad y la geometría de la matriz del sólido afectan al flujo de vapor.

Difusión de Stefan: el flujo de agua es función de la presión de vapor, de la presión total y del coeficiente de difusión de Stefan dentro del producto.

Flujo de Poiseuille: es un flujo de presión inducido en un conducto largo, también llamado flujo de canal. En este caso, está asumido que hay un flujo laminar de un fluido newtoniano incompresible por una diferencia de presión constante.

Flujo Darcy: el transporte de gases y líquidos debido a la presión del gas o de la fase líquida respectivamente puede ser descrito por la ley de Darcy, y dependerá de las propiedades del gas como son densidad, viscosidad y permeabilidad, o de la permeabilidad hidráulica si el fluido es agua en vez de gas, donde el coeficiente de permeabilidad hidráulica dependerá de las propiedades del fluido y de las propiedades de la matriz sólida, como son: distribución del tamaño de poro, forma de los poros, porosidad y tortuosidad.

Flujo capilar: la humedad que está contenida en los intersticios del sólido, como líquido sobre la superficie o como humedad libre en las cavidades de las células, se mueve por capilaridad y gravedad, proveyendo los pasillos para que se produzca el flujo continuo. En secado, el flujo de líquido resultante de la capilaridad, se aplica a líquidos que no estén en solución, y a toda la humedad cercana a la humedad de equilibrio, como en polvos finos o sólidos granulares. La presión capilar debido a la capilaridad y otras fuerzas atractivas es función de la concentración de líquido (contenido de agua) y de la temperatura para un material particular, por lo tanto el flujo capilar podrá describirse como el flujo capilar debido al gradiente de concentración y el flujo capilar debido al gradiente de temperatura, siendo el gradiente de concentración el componente más significante, suele llamarse a este término difusión líquida por analogía a la ecuación de Fick (Datta 2007).

Difusión superficial: fenómeno observado durante la adsorción de una sustancia que difunde en un sólido. Debido a que la concentración de equilibrio del gas sobre la superficie, se incrementa con un aumento de la presión parcial de las especies adsorbidas, un gradiente de concentración superficial de la sustancia difusiva aparece en la capa superficial del poro.

## Concepto de Coeficiente Efectivo

Es ampliamente utilizada la descripción de la transferencia de materia mediante un coeficiente de difusión efectivo, pero es necesario tener en cuenta lo que el mismo es capaz de englobar. La difusividad, $D_{eff}$, representa alguna clase de difusividad efectiva para el transporte combinado de líquido y vapor. La ecuación de transferencia de materia con un coeficiente de difusión efectivo para las dos fases combinadas, no puede ser derivada de las leyes fundamentales gobernantes de la conservación de masa de las especies, que son basadas en los bien conocidos mecanismos de transporte. En este caso, la difusividad efectiva es como un factor empírico. La formulación de la difusividad efectiva engloba los diferentes mecanismos de transporte como flujo capilar, flujo por presión, como así también todos los mecanismos posibles; aunque no es fácil relacionar $D_{eff}$ con capilaridad y difusividad del vapor. En la mayoría de los estudios, el valor de difusividad efectiva es obtenido a partir del ajuste de datos experimentales, como son la evolución de la concentración en el

tiempo. Todos los posibles procesos alimenticios, incluyendo calentamiento por microondas, secado por microondas y secado combinado convencional y microondas, han sido modelados usando un valor de difusividad efectiva $D_{eff}$.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el procesamiento de los alimentos, varios de éstos fenómenos pueden ponerse de manifiesto, en forma simultánea o puede ocurrir que al cambiar las propiedades del sistema multifásico por el procesamiento, cambien las fuerzas impulsoras intervinientes y por ende los mecanismos de transferencia. Sin embargo, cuando la intención es modelar un proceso en Ingeniería en Alimentos, conviene ver el mecanismo que prevalecerá en el mismo. Este análisis fue aplicado a la mayoría de los procesos que involucran alimentos sólidos y para una mejor interpretación se describen en la **Tabla 1**, la cual lista en que tipo de operación ocurren flujos de gases (o vapor) y líquidos dependiendo de si la fuerza impulsora es debido a la presión o el gradiente de concentración. En la tabla 1, el flujo másico total fue desdoblado por el aporte de flujos convectivos y difusivos de fases líquidas y/o gaseosas.

**Tabla 1**. Mecanismos de transferencia másica en diferentes Operaciones de alimentos sólidos.

| $n_{gas}^{difusión\ \ molecular}$ | $n_{gas}^{convección}$ $(FLujo\ Darcy)$ | $n_{líquido}^{difusión\ \ capilar}$ | $n_{líquido}^{convección}$ $(Flujo\ Darcy)$ |
|---|---|---|---|
| Difusión de vapor en las operaciones de:<br>• Secado<br>• Evaporación<br>• Liofilización<br>Efecto secundario, produciéndose difusión de vapor en operaciones de:<br>• Calentamiento<br>• Horneado<br>• Freído | Efecto secundario de pérdida de humedad en forma de vapor por convección: se produce evaporación interna, el vapor retenido produce aumento de presión, y se produce la convección. Fenómeno apreciado en operaciones de:<br>• Calentamiento por microondas<br>• Calentamiento convectivo<br>• Horneado | *La presión capilar es función de la concentración de líquido y temperatura del material. Fuerza impulsora dominante (gradiente de concentración) durante la operación de Secado de alimentos insaturados.*<br><br>Mecanismo dominante en el secado a baja temperatura, donde la evaporación es débil y la presión no es influyente. Operaciones de:<br>• Liofilización<br>• Secado bajo vacío<br>• Secado osmótico, mecanismo presente dentro del alimento<br>También presente en:<br>• Operaciones de Extracción Sólido – Líquido: lixiviación<br>• Fenómeno presente en el pretratamiento de blanqueado de alimentos de origen vegetal (solutos solubles en agua)<br><br>Por capilaridad los alimentos tienden a retener agua en su interior, mecanismo que explica el por qué de la humedad residual en los alimentos secos y/o deshidratados | *Mecanismo de transferencia en alimentos de alto contenido de humedad*<br><br>Utilizado para describir operaciones de:<br>• Impregnación de solutos bajo vacío<br>• Secado osmótico de frutas, fenómeno presente en la interfase del alimento |

La **Tabla 1**, conduce a una mejor interpretación de los fenómenos presentes en los alimentos sólidos, evidenciando que no solamente, como suele tenerse en cuenta por practicidad, el gradiente de concentración es la única fuerza impulsora en la transferencia de materia.

## Importancia del conocimiento de la forma de los poros

Lo mencionado anteriormente es válido en los poros que permiten el flujo a través. Pero es necesario tener en cuenta que los poros restantes tienen efecto en el procesamiento de los alimentos sólidos. Los poros ciegos, no aportan demasiado a la explicación fenomenológica de las operaciones, pero en operaciones de reducción de humedad pueden llegar a ser contradictorios porque suman resistencia a la transferencia de humedad del interior, además de estar involucrados en los fenómenos de encogimiento en las operaciones de secado. Los poros cerrados que contienen aire en su interior, ponen resistencia al intercambio de calor con el medio ambiente, siendo esta una restricción en operaciones como enfriamiento. Un ejemplo práctico, que es un problema en las industrias de golosinas, es el aire que queda retenido en la masa de caramelo, por lo tanto, cuando el caramelo ya formado es enfriado en el túnel de frío, el aire pone resistencia al enfriamiento, y no se logra extraer todo el calor del interior, lo que causa problemas de deformación en los caramelos, posterior a la envoltura. Estos poros que retienen aire en el interior, influyen también en la densidad aparente del sistema (Reinheimer y Pérez, 2008).

Si bien en este trabajo se ha hecho hincapié en mecanismos de transferencia, por lo tanto, los poros que permiten el flujo a través, es importante analizar la influencia de los restantes poros, por lo que vuelve a destacarse la importancia de incorporar aspectos gráficos reales microestructurales.

Se debe resaltar, que es escasa la información real acerca de las propiedades de los alimentos como sistemas porosos, y además pueden observarse cambios entre materias primas y productos, y entre productos obtenidos mediante diferentes operaciones, que se ven reflejado en la propiedades sensoriales detectadas por los consumidores. Para ejemplificar lo dicho anteriormente, los métodos de secado evidencian las diferencias: el proceso de liofilización produce la mayor porosidad, mientras que el secado con aire convencional la menor, comparada con secado osmótico, vacío, microondas de bananas, manzanas, zanahorias y papas (Krokida y Maroulis 1997). Las propiedades mecánicas de los alimentos obtenidos por extrusión se ven afectado por la porosidad (Guraya y Toledo 1996), y también produce efecto en los productos de panadería, como ser la miga y cáscara de pan (Mandala y Sotirakoglou 2005). También, cabe resaltar que durante el proceso de freído de alimentos, los mismos tomaran mayor aceite a mayor porosidad (Pinthus *et al.* 1995).

## Conjunto estructura-propiedades. Relación con el consumidor

Las propiedades finales de los productos alimenticios son los resultados de los cambios en la materia prima como una consecuencia de las condiciones del proceso. En el caso de coloides o alimentos de origen celular, estos cambios pueden ser observados como diferencias en factores de calidad como composición del alimento, aspectos nutricionales, sabor, aroma, forma y tamaño, color, textura, etc. Estos cambios en las propiedades de los alimentos pueden ser explicadas porque los fenómenos físicos y químicos producidos en línea con el progreso del proceso, como deformaciones en las estructuras, reacciones químicas o enzimáticas, transiciones de fase, etc.

La estructura relaciona la manera en la que la materia y la energía se organizan dentro del volumen del sistema. Como una consecuencia, complejidad se refiere al nivel de estructura como así también funcionalidad refiere a las propiedades del sistema. El conjunto estructura-propiedades refiere al conocimiento de la estructura y propiedades en un sistema como así también el entendimiento o comprensión de las relaciones existentes entre los dos conceptos y, por supuesto, la capacidad de predecir los cambios en las propiedades de los alimentos, producidos cuando ocurre algún cambio en la estructura del alimento.

Como es sabido, algunos alimentos son monofásicos; líquidos (soluciones acuosas como aceite o jugos clarificados) o cristales (como cloruro de sodio o sucrosa) pero la mayoría de ellos pertenecen a las categorías mas complejas: coloides o estructuras celulares o multicelulares. Por lo tanto, en los sistemas alimenticios la estructura relaciona sus complejidades celular, coloidal, polimérica y molecular y consecuentemente, su funcionalidad está relacionada con sus propiedades químicas, físicas, biológicas y sensoriales. Algunas de estas propiedades son usadas por los consumidores para definir la calidad del alimento. Por esta razón, es muy importante ser capaz de analizar y evaluar, en cualquier sistema alimenticio, el conjunto estructura-propiedades y su relación con los factores de calidad y seguridad del alimento, como es apreciado por los consumidores.

## CONCLUSIONES

Los modelos obtenidos por una vía simplificada, en los cuales solo es contemplado como fuerza impulsora el gradiente de concentración, o en aquellos casos que se utilizan las ecuaciones termodinámicas deducidas en condiciones cercanas al equilibrio para modelar alimentos en condiciones alejadas del equilibrio, no pueden predecir con certeza los cambios que se manifiestan debido a los procesos industriales. Se analizó que en diferentes operaciones, el mecanismo principal no es debido al gradiente de concentración. Además se ejemplificó la importancia de la estructura porosa en distintos tipos de alimentos.

Por último, se concluye que conocer el parámetro porosidad solamente no es suficiente para hacer una descripción completa de los fenómenos intervinientes en las distintas operaciones, sino se debe caracterizar la naturaleza de los poros con un conocimiento de la microestructura o hipótesis conducentes a la interpretación de ésta.

## AGRADECIMIENTOS

A CONICET.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bear J. 1972. Dynamics of fluids in porous media. New York: American Elsevier Publishing Company, Inc.

Crank J. 1985. The mathematics of diffusion. New York: Oxford University Press.

Datta AK. 2007. Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: Problem formulations. Journal of Food Engineering, 80: 80-95.

Guraya HS, Toledo RT. 1996. Microstructural characteristics and compression resistance as indices if sensory texture in a crunchy snack product. Journal of Texture Studies, 27: 687–701.

Krokida MK, Maroulis, ZB. 1997. Effect of drying method on shrinkage and porosity. Drying Technology, 15: 2441–2458.

Mandala IG, Sotirakoglou K. 2005. Effect of frozen storage and microwave reheating on some physical attributes of fresh bread containing hydrocolloids. Food Hydrocolloids, 19: 709–719.

Pinthus EJ, Weinberg P, Saguy IS. 1995. Oil uptake in deep fat frying as affected by porosity. Journal of Food Science, 60: 767–769.

Reinheimer M.A, Pérez GA. 2008. Hard Candies Cooling. Modelling the operations conditions taking into account heat transfer coefficient and experimental values of the physical properties. Anais do XVII COBEQ.

Sahin S, Sumnu SG. 2006. Physical properties of foods. New York: Springer. pags. 20-32.

# Deshidratación de pelones (*Prunus persica var. nectarina*) por métodos combinados

# Dehydration of nectaries (*Prunus persica var. nectarina*) by combined methods

Rodríguez MM (1,2), Mascheroni RH (3), Pagano AM (1,4)

(1) Programa Institucional Alimentos UNICEN
(2) CONICET, UNLP-UNICEN
(3) CIDCA (CONICET La Plata - UNLP) y MODIAL, Calle 47 y 116. La Plata, Argentina
(4) TECSE, Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), Av. del Valle 5737 (7400) Olavarría, Argentina.
Email: apagano@fio.unicen.edu.ar.

## RESUMEN

La deshidratación se presenta como una alternativa para la conservación de frutos estacionales como las frutas de carozo, que permite proveer el producto durante todo el año, para el consumo directo como fruta seca o como ingrediente de otros productos alimenticios. Durante el desarrollo de este trabajo se deshidrataron pelones de la variedad Caldesi por métodos combinados de deshidratación osmótica (DO) y secado por aire caliente (SAC) bajo diferentes condiciones. En una primera etapa, mediante la inmersión de las frutas en soluciones concentradas de azúcares, se logró la reducción de su contenido de humedad y el incremento del contenido de sólidos solubles, obteniéndose un producto poco estable para su conservación; a posteriori, la segunda etapa de secado con aire caliente permitió obtener un producto final estable de buena calidad organoléptica. Los pelones se seleccionaron y se lavaron con agua a temperatura ambiente, luego se pelaron y se cortaron manualmente en porciones de $^{1}/_{16}$ (~3,2 g). En la DO las muestras se sumergieron en soluciones hipertónicas de distintos agentes osmóticos (AO) tales como jarabe de glucosa y sorbitol en concentraciones del 40% p/p durante 2 h a temperaturas (TDO) de 25 y 40 °C ± 0,5°C. La deshidratación se llevó adelante mediante agitación continua a 331 rpm y utilizando relaciones de fruta a agente osmótico (FR-AO) de 1:4 y 1:10. Los pelones osmodeshidratados se secaron por aire caliente a distintas temperaturas (TSAC) de 60, 70 y 80 ºC ± 0,5°C durante 5 h en una estufa de convección forzada. Durante la deshidratación osmótica y el secado por aire caliente, a intervalos regulares las muestras fueron evaluadas en peso (balanza analítica, precisión ± 0,0001 g), contenido de humedad (M) y contenido de sólidos solubles (SS). Mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con un 95% de confianza se evaluó el efecto de las distintas variables del proceso sobre la pérdida de agua (WL), la ganancia de sólidos solubles (SG), la razón de humedad ($MR= M/M_o$) y la razón de sólidos solubles ($SR= SS/SS_o$) para la DO, y sobre la razón de humedad para el SAC. En la DO, la interacción (AO*FR-AO) presentó diferencias significativas para todas las variables estudiadas. El tiempo de tratamiento (TPO) sólo fue significativo para MR y SR. Las variables WL y SG fueron influenciadas significativamente por el (AO), la relación (FR-AO), la (TDO) y sus combinaciones. En el secado por aire caliente, la variable MR fue significativamente influenciada por el tiempo de tratamiento (TPO), el (AO), la relación (FR-AO), la (TSAC) y las interacciones (TPO*TSAC), (AO*FR-AO), (AO*TSAC) y (TDO*TSAC).

## ABSTRACT

Dehydration is an alternative for the preservation of seasonal stone fruits, because allows providing the product for direct consumption along the year and supplies dried fruit as an ingredient in other foodstuffs. In this work, nectarines of the Caldesi variety were dehydrated by combined methods based on osmotic dehydration (DO) and hot-air drying (SAC) under different conditions. In a first step, by immersing the fruit in concentrated sugar solutions, their moisture content was reduced and their content of soluble solids increased, yielding a poorly stable product for preservation; after then, the second stage of hot-air drying allows to obtain a very stable end-product with good organoleptic quality. The nectarines were selected and washed in water at room temperature; then, were manually peeled and cut into pieces of 1/16 (~3,2 g). During DO, samples were immersed in hypertonic

solutions of different osmotic agents (AO) such as glucose syrup and sorbitol in concentrations of about 40% w/w for 2 hours at different temperatures (TDO) of 25 and 40°C ± 0.5°C. Dehydration was carried out at continuous agitation of 331 rpm and using relationships between fruit and osmotic agent (FR-AO) of 1:4 and 1:10. The osmodehydrated nectarines were dried by hot air at different temperatures (TSAC) of 60, 70 and 80ºC ± 0,5°C for 5 h in a forced convection oven. During osmotic dehydration and hot-air drying, at regular intervals, samples were evaluated in weight (analytical balance, precision ± 0,0001 g), moisture content (M) and total soluble solids (SS). An analysis of variance (ANOVA) with 95% of confidence was used to analyze the effect of different process variables on water loss (WL), soluble solids gain (SG), moisture ratio ($MR = M/M_o$) and the ratio of soluble solids ($SR = SS/SS_o$) for DO, and on the moisture ratio for SAC. In the osmodehydration process, the interaction (FR-AO*AO) demonstrated significant differences for all variables studied. The treatment time (TPO) was only significant for MR and SR. The variables WL and SG were significantly influenced by the (AO), the ratio (FR-AO), the (TDO) and their combinations.
In hot-air drying, the variable MR was significantly influenced by treatment time (TPO), the (AO), the ratio (FR-AO), the (TSAC) and the interactions (TPO*TSAC), (AO*FR-AO), (AO*TSAC) and (TDO*TSAC).

**PALABRAS CLAVE**: *Métodos combinados, deshidratación osmótica, secado por aire caliente, pelones.*

**KEYWORDS**: *Combined methods, osmotic dehydration, hot air drying, nectarines.*

## INTRODUCCIÓN

Los cambios físicos y químicos que acontecen durante el proceso de secado tradicional con aire caliente mejoran ciertas características del producto final, pero en muchos casos, se da una pérdida de nutrientes y de propiedades organolépticas. Por tal motivo, es necesario un manejo adecuado de estas reacciones y cambios físicos para asegurar que el producto tenga un alto valor nutritivo, así como una vida media significativamente prolongada. Los pretratamientos con métodos combinados pueden mejorar las propiedades de textura y reducir las reacciones de degradación (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado 2000, Spiazzi y Mascheroni 2001).

La deshidratación osmótica (DO) es un proceso ampliamente estudiado en los últimos años, utilizado principalmente como pre-tratamiento previo al proceso de liofilización, secado con aire, secado solar y deshidratación al vacío (Maldonado *et al* 2008).

Durante la deshidratación osmótica se produce un intercambio de flujos entre el producto y la solución osmótica, donde gran parte del agua y algunos componentes minoritarios (tales como pigmentos, ácidos, minerales y vitaminas) son transferidos desde el fruto a la solución osmótica, y por otra parte en contracorriente, los sólidos de la solución osmótica son transferidos hacia la fruta. El aumento del contenido de sólidos solubles en el fruto permite disminuir la actividad enzimática, por lo tanto, reducir la susceptibilidad de la fruta al pardeamiento enzimático (Khoyi y Hesari 2007).

La velocidad de pérdida de agua del producto y los cambios en su composición química dependen del tipo y la concentración de la solución osmótica, del tipo, forma y tamaño del producto a deshidratar, de la relación fruta-agente osmótico, de la temperatura y del tiempo de deshidratación. Generalmente la velocidad de la DO es máxima al principio del proceso como resultado de las diferencias de presión osmótica y la menor resistencia a la transferencia de masa en esta etapa del proceso (Maldonado *et al* 2008). Las pérdidas de agua por parte del alimento durante el tratamiento osmótico, en general se pueden dividir en dos períodos: (1) un período inicial de alrededor de 2 horas, con una alta velocidad de eliminación de agua, y (2) un período final de entre 2 y 6 horas (puede ser mucho mayor, aunque no tenga sentido práctico), con una velocidad decreciente de eliminación de agua (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado 2000).

Comparada con el secado sólo por aire o con la liofilización, la deshidratación osmótica es más rápida, ya que la eliminación de agua ocurre sin cambio de fase. También puede mejorar las características sensoriales del producto final (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado 2000). La DO empleada como pre-tratamiento antes de alguna de las técnicas mencionadas con anterioridad, se presenta como una tecnología simple y de bajo costo, que permite reducir el tiempo de procesado (no el tiempo total) y el consumo energético (Maldonado *et al* 2008).

Las industrias de alimentos trabajan permanentemente en la búsqueda de metodologías que permitan prolongar la vida útil de los productos, disminuir las pérdidas postcosecha y obtener productos fuera de estación, en la cantidad y calidad requerida, de manera tal que los alimentos lleguen a la mesa de los consumidores preservando los atributos de calidad desde el punto de vista físico, químico, microbiológico y sensorial. La calidad de los productos tratados mediante deshidratación osmótica seguida de otra técnica de deshidratación sugiere que las futuras plantas de procesado de alimentos deberán tener en cuenta la posibilidad de llevar a cabo propuestas de deshidratación combinada (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado 2000).

Las frutas deshidratadas se comercializan para su consumo directo como frutas secas o como materia prima en la elaboración de otros productos. En el mercado se pueden obtener diversos alimentos elaborados con frutas deshidratadas (golosinas, postres, yogurts, mermeladas, barras de cereal, gelatinas, flanes, budines, panes dulces, productos de confitería, bocadillos, alimentos para bebés, cereales para desayuno) o rehidratadas (jugos) (García Martínez *et al* 2008).

Para las industrias representa un beneficio económico que permite dar valor agregado a los productos y obtener así un mayor precio en el mercado y disminuir costos de transporte debido a la reducción de peso y volumen del producto deshidratado (Barbosa-Cánovas y Vega-Mercado 2000).

Durante el desarrollo del presente trabajo experimental se deshidratan pelones mediante el empleo de dos técnicas sucesivas de conservación. En una etapa inicial, se somete al producto a una deshidratación por ósmosis directa durante 2 horas, aprovechando el período de alta velocidad de eliminación de agua, evaluándose la influencia de distintas variables del proceso, a fin de determinar la condición más favorable para la conservación del fruto. Luego, el proceso de deshidratación termina con una etapa final de secado por aire caliente a distintas temperaturas, que permite alcanzar la humedad de seguridad del producto deshidratado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación y caracterización de las muestras

Para el desarrollo del diseño experimental se trabajó con pelones (*Prunus persica var. nectarina*) frescos de la variedad Caldesi, cosechados en noviembre del 2008, en la provincia de Mendoza.

El contenido de humedad –expresado sobre un porcentaje de base húmeda (b.h.)- se determinó usando el método estándar (AOAC 1980) por secado en estufa a 70 ± 2 ºC hasta peso constante (9 h), por duplicado. El contenido de humedad inicial ($M_o$) se determinó en el fruto sin piel, presentando un valor 82,14 ± 0,6% b.h.

La determinación de sólidos solubles (SS) se realizó con refractómetro Abbe (precisión ± 0,01) (AOAC 1980) por duplicado. El contenido de sólidos solubles inicial ($SS_o$) fue de 14,50 °Brix y el índice de refracción 1,3550. El peso promedio por fruto fue de 103,19 g.

Los pelones se guardaron refrigerados a 5 ºC. Previo a los ensayos, las muestras seleccionadas por tamaño y calidad se lavaron y secaron con papel absorbente, y finalmente se descarozaron y cortaron en porciones de $^1/_{16}$ (peso promedio 3,2 g).

### Deshidratación osmótica

Durante la deshidratación osmótica las muestras se sumergieron en soluciones hipertónicas de jarabe de glucosa (40% p/p) o sorbitol (40% p/p) durante 2 h a temperatura constante de 25 ó 40 °C, manteniendo una relación fruta-agente osmótico de 1:4 y 1:10. La deshidratación osmótica se realizó con agitación constante de 331 rpm, por duplicado para todas las condiciones.

A intervalos regulares las muestras fueron evaluadas en peso (balanza analítica, precisión ± 0,0001 g), contenido de humedad (M) y contenido de sólidos solubles (SS), por duplicado. A efectos de comparar sobre una misma base, se trabajó con el contenido de humedad ($MR=M/M_o$) y el contenido de sólidos solubles ($SR=SS/SS_o$).

Para determinar la pérdida de agua (WL) y ganancia de sólidos (SG) durante la DO de las muestras, se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$WL = [(1 - TS_o/100) - (1 - TS_{DO}/100)\,(1 - WR_{DO}/100)]\,100 \qquad \text{(Ec. 1)}$$

$$SG = [(1 - WR_{DO}/100)\,TS_{DO}/100 - TS_o/100]\,100 \qquad \text{(Ec. 2)}$$

donde: $TS_o$ son los sólidos totales iniciales de la muestra, $TS_{DO}$ son los sólidos totales presentes en la muestra a tiempo "t" durante la DO y $WR_{DO}$ es la diferencia de masa de muestra respecto de la masa de muestra inicial expresada en porcentaje.

### Secado por aire caliente

Los pelones osmodeshidratados se secaron por aire caliente durante 5 h en una estufa de convección forzada. Se trabajó a tres temperaturas diferentes de 60, 70 y 80 ºC ± 0,5 °C, en dos replicaciones. A intervalos regulares las muestras fueron evaluadas en peso y contenido de humedad.

### Análisis estadístico

Los resultados experimentales de la deshidratación de pelones por métodos combinados fueron analizados estadísticamente mediante un ANDEVA (Análisis de Varianza), con un nivel de confianza del 95%, utilizando el software Systat (Wilkinson 1990).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Deshidratación osmótica

Las muestras deshidratadas en jarabe de glucosa al 40% p/p, bajo diferentes condiciones operativas, presentaron una humedad final ($M_f$) comprendida en el rango 74,49 - 78,29% b.h. y un contenido final de sólidos solubles ($SS_f$) entre 21,50 y 24%. Mientras que cuando se utilizó sorbitol como agente osmótico, la $M_f$ alcanzada estuvo en el rango 71,86 - 75,26 % b.h. y los $SS_f$ alcanzaron valores en el orden de 21,50 - 25,25%.

A modo de ejemplo, en la **Figura 1** se muestra la disminución del contenido de humedad y el aumento del contenido de sólidos solubles en las muestras deshidratadas durante 120 minutos en solución de sorbitol al 40% p/p, a 25 ºC y con una relación fruta-agente osmótico de 1:10. En esta condición se alcanzó la mayor reducción del contenido de humedad y aumento del contenido de sólidos solubles, alcanzando una $M_f$ de 71,86% b.h. y $SS_f$ de 25,25%.

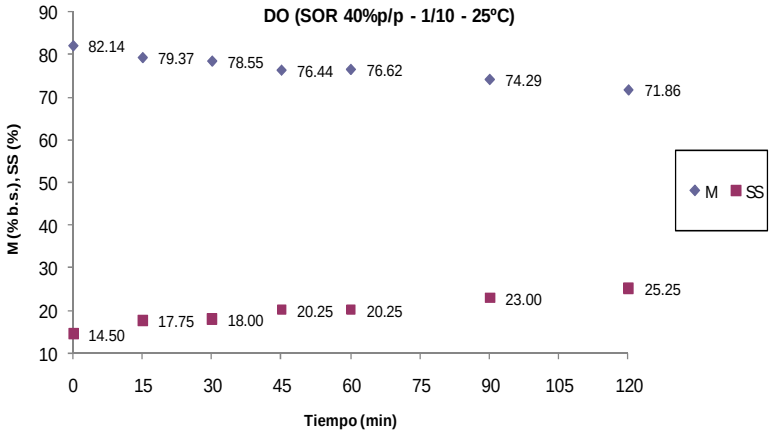


**Figura 1.** Contenido de humedad (M) y contenido de sólidos solubles (SS) en muestras deshidratadas en sorbitol (SOR) 40% p/p, a 25 ºC y empleando una relación fruta-agente osmótico 1:10.

Los resultados experimentales, expresados como razón de humedad (MR), razón de sólidos solubles (SR), pérdida de agua (WL) y ganancia de sólidos (SG) fueron analizados estadísticamente mediante ANDEVA (Análisis de Varianza), para determinar el efecto de las variables: tiempo (TPO), agente osmótico (AO), relación fruta-agente osmótico (FR-AO), temperatura (TDO), y de sus interacciones.

En la **Tabla 1** se muestran los resultados del análisis estadístico, utilizando el software Systat (Wilkinson 1990). Se observa que la interacción (AO*FR-AO) presentó diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para todas las variables estudiadas. El tiempo de tratamiento (TPO) sólo fue significativo para MR y SR. Las variables MR, WL y SG fueron influenciadas significativamente por el (AO) y la relación (FR-AO). La temperatura del baño osmótico (TDO) y las interacciones (AO*TDO) y (FR-AO*TDO) afectaron significativamente a WL y SG.

**Tabla 1**. Análisis de varianza (ANDEVA) del efecto de las variables del proceso sobre la humedad adimensional, el contenido de sólidos solubles adimensional, la pérdida de agua y la ganancia de sólidos en la DO.

| Variable dependiente | Variable independiente | Gl | F | p |
|---|---|---|---|---|
| MR | TPO | 6 | 15,916 | 0,000 |
| | AO | 1 | 30,581 | 0,000 |
| | FR-AO | 1 | 4,641 | 0,041 |
| | TDO | 1 | 0,830 | 0,371 |
| | TPO*AO | 6 | 1,458 | 0,233 |
| | TPO*FR-AO | 6 | 1,295 | 0,296 |
| | TPO*TDO | 6 | 0,394 | 0,876 |
| | AO*FR-AO | 1 | 6,616 | 0,016 |
| | AO*TDO | 1 | 0,001 | 0,973 |
| | FR-AO*TDO | 1 | 0,917 | 0,348 |
| | Error | 25 | | |
| SR | TPO | 6 | 22,255 | 0,000 |
| | AO | 1 | 3,943 | 0,058 |
| | FR-AO | 1 | 2,143 | 0,156 |
| | TDO | 1 | 0,145 | 0,707 |
| | TPO*AO | 6 | 0,838 | 0,552 |
| | TPO*FR-AO | 6 | 1,298 | 0,294 |
| | TPO*TDO | 6 | 0,503 | 0,800 |
| | AO*FR-AO | 1 | 7,114 | 0,013 |
| | AO*TDO | 1 | 0,551 | 0,465 |
| | FR-AO*TDO | 1 | 0,338 | 0,566 |
| | Error | 25 | | |
| WL | TPO | 6 | 0,639 | 0,906 |
| | AO | 1 | 21,327 | 0,003 |
| | FR-AO | 1 | 21,178 | 0,001 |
| | TDO | 1 | 13,572 | 0,001 |
| | TPO*AO | 6 | 0,351 | 0,903 |
| | TPO*FR-AO | 6 | 0,445 | 0,842 |
| | TPO*TDO | 6 | 0,424 | 0,856 |
| | AO*FR-AO | 1 | 11,178 | 0,003 |
| | AO*TDO | 1 | 14,080 | 0,001 |
| | FR-AO*TDO | 1 | 12,981 | 0,001 |
| | Error | 25 | | |
| SG | TPO | 6 | 1,091 | 0,368 |
| | AO | 1 | 18,024 | 0,019 |
| | FR-AO | 1 | 18,073 | 0,002 |
| | TDO | 1 | 11,791 | 0,002 |
| | TPO*AO | 6 | 0,371 | 0,890 |
| | TPO*FR-AO | 6 | 0,565 | 0,754 |
| | TPO*TDO | 6 | 0,559 | 0,759 |
| | AO*FR-AO | 1 | 8,040 | 0,009 |
| | AO*TDO | 1 | 13,223 | 0,001 |
| | FR-AO*TDO | 1 | 11,121 | 0,003 |
| | Error | 25 | | |

## Secado por aire caliente

Las muestras de pelones osmodeshidratadas mediante distintas condiciones operativas fueron secadas por aire caliente a distintas temperaturas. Las muestras secadas por aire caliente a 60 ºC, previamente deshidratadas en jarabe de glucosa alcanzaron una $M_f$ entre 16,38 - 21,08% b.h. y para aquellas muestras deshidratadas en sorbitol y luego secadas a la misma temperatura, la $M_f$ alcanzada fue entre 13,97 - 25,30% b.h.

Las muestras de pelones osmodeshidratadas en jarabe de glucosa y sorbitol, cuando fueron secadas por aire caliente a 70 ºC, presentaron una $M_f$ comprendida entre 17,13 - 19,85 y 18,06 -20,42% b.h., respectivamente. Cuando se trabajó a 80 ºC, la $M_f$ disminuyó a valores comprendidos entre 16,45 -

18,77% para las muestras sumergidas en jarabe de glucosa y entre 16,48 - 24,19% b.h. para las deshidratadas en sorbitol.
Si se analiza únicamente la etapa de secado por aire caliente, se puede observar en la **Figura 2** la disminución del contenido de humedad de las muestras deshidratadas en jarabe de glucosa 40% p/p, a 25 ºC y con una relación fruta-agente osmótico 1:10 que fueron secadas por aire caliente a 80 ºC. En este ejemplo la $M_f$ alcanzada fue de 17,38% b.h., siendo la condición del SAC en la que se produjo la mayor reducción del contenido de humedad.

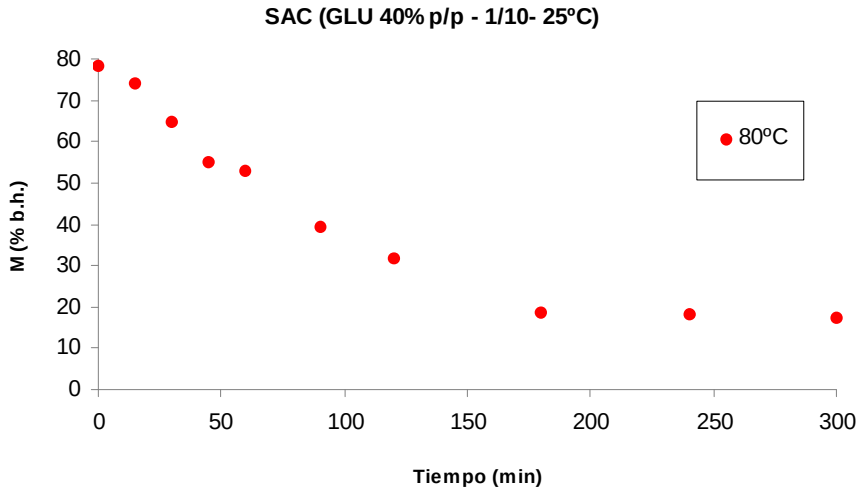


**Figura 2.** Contenido de humedad (M) en muestras secadas por aire caliente (SAC) a 80 ºC, previamente deshidratadas en glucosa (GLU) 40% p/p, a 25 ºC y empleando una relación fruta-agente osmótico 1:10.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados obtenidos en el análisis de varianza del efecto de los tratamientos sobre la humedad adimensional (MR), incorporándose la temperatura del secado por aire caliente (TSAC) al conjunto de variables independientes analizadas previamente en la DO y empleándose el mismo nivel de significación del 95%. Según el ANDEVA, MR fue significativamente ($p \leq 0,05$) influenciada por el tiempo de tratamiento (TPO), la temperatura del secado con aire caliente (TSAC), la relación (FR-AO) y el tipo de agente osmótico (AO), y por las interacciones (AO*TSAC), (AO*FR-AO), (TDO-TSAC) y (TPO*TSAC).

**Tabla 2**. Análisis de varianza (ANDEVA) del efecto de las variables del proceso sobre la humedad adimensional en el SAC.

| Variable dependiente | Variable independiente | Gl | F | p |
|---|---|---|---|---|
| MR | TPO | 9 | 600,552 | 0,000 |
| | AO | 1 | 7,243 | 0,008 |
| | FR-AO | 1 | 23,377 | 0,000 |
| | TDO | 1 | 0,829 | 0,364 |
| | TSAC | 2 | 13,658 | 0,000 |
| | TPO*AO | 9 | 0,188 | 0,995 |
| | TPO*FR-AO | 9 | 1,828 | 0,066 |
| | TPO*TDO | 9 | 0,678 | 0,728 |
| | TPO*TSAC | 18 | 2,356 | 0,002 |
| | AO*FR-AO | 1 | 6,056 | 0,015 |
| | AO*TDO | 1 | 0,233 | 0,630 |
| | AO*TSAC | 2 | 7,295 | 0,001 |
| | FR-AO*TDO | 1 | 3,270 | 0,072 |
| | FR-AO*TSAC | 2 | 2,575 | 0,079 |
| | TDO*TSAC | 2 | 4,206 | 0,016 |
| | Error | 171 | | |

## Métodos combinados

Para el proceso combinado, a modo de ejemplo en la **Figura 3** se muestra el seguimiento del contenido de humedad de las muestras deshidratadas por ósmosis directa en sorbitol al 40% p/p, a 25 ºC y con una relación fruta-agente osmótico de 1:4, combinado con un secado final por aire caliente a 60 ºC. En la **Tabla 3**, se observa que ésta fue la condición operativa que permitió alcanzar una mayor reducción del contenido de humedad, partiendo de una $M_o$ de la fruta fresca de 82,14% b.h., para alcanzar luego de la DO una $M_f$ de 58,10% b.h., y finalmente al término del SAC una $M_f$ de 13,97% b.h. Es decir, que se logró una reducción total de humedad de aproximadamente un 83%. Mientras que la menor reducción de humedad se evidenció en la combinación de DO con sorbitol al 40% p/p, a 40 ºC y con una relación fruta-agente de 1:10, combinado con una etapa final de SAC a 60 ºC, alcanzándose una reducción total de humedad del orden del 69% (**Tabla 3**).

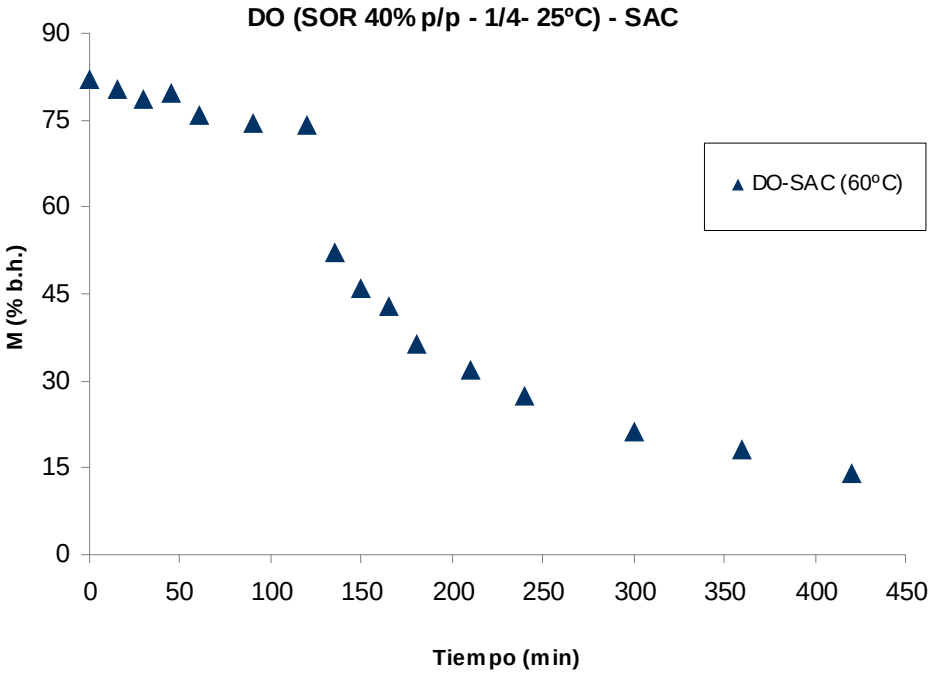


**Figura 3**. Contenido de humedad (M) en muestras secadas por aire caliente (SAC) a 60ºC, previamente deshidratada en sorbitol (SOR) 40% p/p, a 25 ºC y empleando una relación fruta- agente osmótico 1:4.

**Tabla 3.** Seguimiento de la humedad (% b.h.) de productos deshidratados por métodos combinados (DO+SAC) bajo diferentes condiciones.

| Humedad de muestras frescas (% b.h.) | Humedad final de la DO (% b.h.) para cada tratamiento | | | | Humedad final del SAC (% b.h.) | | | Reducción de humedad (%) (DO+SAC) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Relación fruta-agente | TDO (°C) | Agente osmótico | $M_f$ | 60 ºC | 70 ºC | 80 ºC | 60 ºC | 70 ºC | 80 ºC |
| 82,14 | 1:4 | 25 | Jarabe de glucosa | 75,81 | 21,08 | 17,19 | 16,45 | 74,34 | 79,07 | 79,97 |
| | | | Sorbitol | 78,18 | 13,97 | 20,42 | 19,61 | 82,99 | 75,14 | 76,13 |
| | | 40 | Jarabe de glucosa | 74,49 | 16,38 | 19,85 | 18,76 | 80,06 | 75,83 | 77,16 |
| | | | Sorbitol | 75,26 | 19,35 | 18,06 | 18,91 | 76,44 | 78,01 | 76,98 |
| | 1:10 | 25 | Jarabe de glucosa | 78,29 | 19,23 | 18,91 | 17,38 | 76,59 | 76,98 | 78,84 |
| | | | Sorbitol | 71,86 | 21,09 | 19,73 | 16,48 | 74,32 | 75,98 | 79,94 |
| | | 40 | Jarabe de glucosa | 76,46 | 20,28 | 17,13 | 16,47 | 75,31 | 79,15 | 79,95 |
| | | | Sorbitol | 75,19 | 25,30 | 20,17 | 24,19 | 69,20 | 75,44 | 70,55 |

## CONCLUSIONES

Para las muestras de pelones deshidratadas por ósmosis durante 120 minutos, el contenido de humedad disminuye y el contenido de sólidos solubles aumenta con el tiempo para todas las condiciones ensayadas. El contenido de humedad final de las muestras fue similar, independientemente del agente osmótico utilizado y de la relación fruta-jarabe empleada en la preparación de las soluciones osmóticas, observándose una mayor deshidratación cuando la temperatura del baño fue de 40 ºC.

En el secado con aire caliente durante 300 minutos de las muestras previamente osmodeshidratadas se encontró que la mayor disminución del contenido de humedad se dio cuando se secó a 80 ºC a aquellas muestras previamente deshidratadas en jarabe de glucosa 40% p/p, a 25 ºC y con una relación fruta-agente osmótico 1:10.

En la deshidratación de pelones durante 420 minutos bajo el proceso combinando de deshidratación osmótica seguida de secado por aire caliente, se encontró que la condición que permite alcanzar una mayor reducción del contenido de humedad correspondió a las muestras deshidratadas por ósmosis en sorbitol al 40% p/p, a 25 ºC con una relación fruta-agente 1:4, combinando con una etapa final de secado por aire caliente a 60 ºC.

La deshidratación de pelones por métodos combinados mediante distintas condiciones operativas, utilizando agentes osmóticos en una concentración del 40% p/p y agitación constante de 331 rpm, permiten alcanzar al término de 7 h productos estables dado a su bajo contenido de humedad y su incorporación de sólidos solubles.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AOAC. 1980. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis*:* 22.013, Moisture in dried fruits, 361.

AOAC. 1980. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis*:* 22.024, Soluble Solids by Refractometer, 363.

Barbosa-Cánovas GV, Vega-Mercado H. 2000. Deshidratación de alimentos. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA S.A., pag 296.

García Martínez E, Martínez Monzó J, Camacho MM, Martínezz-Navarrete N. 2002. Characterisation of reused osmotic solution as ingredient in new product formulation. Food Research International, vol. 35: 307-313.

Khoyi MR, Hesari J. 2007. Cinética de deshidratación osmótica de albaricoque utilizando solución de sacarosa. Journal of Food Engineering 78: 1355-1360.

Maldonado S, Santapaola JE, Singh J, Torrez M. 2008. Cinética de la transferencia de masa durante la deshidratación osmótica de yacón (*Smallanthus sonchifolius*). Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28: 251-256.

Spiazzi EA, Mascheroni RH. 2001. Modelo de deshidratación osmótica de alimentos vegetales. Mat – Serie A, 4: 23-32.

Wilkinson L. 1990. SYSTAT: *The System for Statistics: Statistics*. Evanston: SYSTAT Inc.

# Aptitud al descascarado de granos de girasol confitero a diferentes velocidades de impacto

# Dehulling ability of confectionary sunflower grains at different impact velocities

Santos U, de Figueiredo K, Riccobene IC, Nolasco SM

TECSE, Facultad de Ingeniería, UNCPBA. Avenida del Valle 5737, B7400JWI. Olavarría, Provincia de Buenos Aires, Argentina.
E-mail: snolasco@fio.unicen.edu.ar

## RESUMEN

El descascarado de granos por impacto es el método más utilizado a escala industrial; el mismo se basa en un proceso centrífugo, donde al aumentar la velocidad (expresada en revoluciones por minuto, rpm) en el rotor principal del descascarador se incrementa la velocidad de impacto de los granos sobre el interior de la carcasa del ciclón del equipo. En el presente trabajo se estudia el efecto de la velocidad de impacto de los granos sobre la capacidad a descascararse "aptitud al descascarado" y la obtención de pepas enteras de granos de girasol confitero. Los granos fueron clasificados por tamaño con tamices normalizados, mayores a 8,75 mm y entre 6,50 y 8,75 mm. Se trabajó con cinco velocidades de impacto del grano 2900, 3300, 3700, 4100 y 4500 rpm, y con un contenido de humedad de los granos de aproximadamente 6% base seca (bs). A medida que se incrementó la velocidad de impacto disminuyó la producción de pepas enteras y en general, aumentó la aptitud al descascarado. Para un tamaño de grano entre 6,5 y 8,75 mm se observó un incremento significativo de la aptitud al descascarado a mayores velocidades de impacto (4100 y 4500 rpm) respecto a las menores velocidades (2900 y 3300 rpm). Sin embargo, no se detectó un comportamiento diferencial con la velocidad de impacto para los granos de mayor tamaño (> 8,75 mm). Para los tamaños de granos evaluados, la máxima producción de pepa entera fue baja desde el punto de vista de los objetivos industriales.

## ABSTRACT

Impact dehulling of grains is the most common method used on industrial scale. It is based on a centrifugal process in which increasing the rotation speed on the main rotor of the dehuller, increases the impact velocity of the grains inside of the casing of the cyclone in the dehulling equipment. In the present work, the effect of impact velocity of grains on the grains ability to dehull "dehulling ability" and the whole kernel obtaining of confectionary sunflower grains is studied. The grains were classified by size using standard sieves greater than 8.75 mm and between 6.50 and 8.75 mm. It is worked at five-speed impact of grain 2900, 3300, 3700, 4100 and 4500 rpm and at a grain moisture content of about 6% dry basis (db). As the impact velocity increased, in general, the dehulling ability increased and the whole kernel production decreased. For a grain size between 6.5 and 8.75 mm it was observed a significantly increase in the dehulling ability at higher speeds (4100 and 4500 rpm). However, no significant difference was detected with the impact velocity for the larger size grains (> 8.75 mm). For the grain sizes evaluated, the maximum production of whole kernel was low from the viewpoint of the industrial objectives.

**PALABRAS CLAVE**: *girasol confitero, aptitud al descascarado, velocidad de impacto.*

**KEYWORDS**: *confectionary sunflower, dehulling ability, impact velocity.*

## INTRODUCCIÓN

En Argentina, el girasol es cultivado en nuestro país principalmente para la obtención de su aceite a partir del prensado y/o extracción con solvente de sus granos, siendo los híbridos de "girasol aceitero" los más utilizados. En menor medida se cultiva el "girasol confitero", de mayor tamaño y menor

contenido lipídico. Aproximadamente 60.000 ha fueron sembradas en el año 2007, principalmente en La Pampa, Sur de Córdoba y Noroeste Bonaerense. Sin embargo, el mercado de este producto es muy amplio y su uso puede ser tanto para alimento de pájaro como para consumo humano. Se lo utiliza de dos formas: con cáscara, para ser luego tostado y salado y consumirse como un snack (pepita), y sin cáscara, cuya principal aplicación es como grano entero dentro de panes de alto valor, tanto artesanales como industriales. Nuestro país es líder en los mercados del girasol confitero, siendo los principales mercados el norte de Europa (Alemania), España y Medio Oriente. Para este tipo de girasol, no sólo se requiere una eficiente separación de la cáscara sino también obtener un producto constituido por pepas enteras.

El tamaño de grano y la facilidad para eliminar la cáscara son dos propiedades que influyen de manera preponderante en la calidad del girasol confitero. El descascarado por impacto es el método más utilizado a escala industrial, basándose en un proceso centrífugo, donde al aumentar las rpm en el rotor principal del descascarador mayor será la velocidad de impacto de los granos sobre el interior de la carcasa del ciclón del equipo.

Una forma de evaluar la capacidad de los granos de girasol de liberar su cáscara es a través de la determinación de la "aptitud al descascarado" (relación porcentual entre porcentaje de cáscara extraído mecánicamente con respecto a cantidad de cáscara total). Esta facilidad depende de sus características físicas, químicas y estructurales (Beauguillaume y Cadeac, 1992; Fernández *et al*., 2001; Di Leo *et al*., 2004) de los granos. Numerosos estudios (Baümler, 2003) demostraron que varias características de los granos de girasol, tales como contenido de aceite, humedad, ceras, contenido y espesor de cáscaras, tamaño y densidad de las granos influyen en el descascarado de los mismos. Así mismo, la estructura de la cáscara, tales como el grado de lignificación y discontinuidades dentro de la capa de esclerénquima, espacio de aire entre cáscara y grano, espesor de la cáscara, contenido de lignina y celulosa y contenido de cáscara, también incide sobre la facilidad de los granos para liberarse de su cáscara.

Subramanian *et al*. (1990), como así también Gupta y Das (1999), analizaron el efecto de la variación de la velocidad de giro (rpm) del descascarador, la velocidad de alimentación y el tamaño de los granos sobre la aptitud al descascarado de híbridos de girasol aceitero. Sin embargo, no se han encontrado antecedentes similares para girasol confitero. En función de lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la velocidad de impacto sobre la aptitud al descascarado del grano y la obtención de pepas enteras durante el proceso de descascarado de granos de un girasol confitero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con el híbrido de girasol confitero Mycogen 9338 (Morgan). Los granos fueron clasificados por tamaño, según las normas de comercialización de granos de girasol confitero. Los mismos fueron separados en dos fracciones, mayores a 8,75 mm y entre 6,50 y 8,75 mm, mediante tamices normalizados. El contenido de humedad de los granos se determinó sobre una muestra de 10 gramos en estufa de aire forzado a 130 ºC durante 3 horas (ASAE, 1999).

La operación de descascarado se efectuó por impacto mediante un equipo piloto de descascarado basado en un proceso centrífugo (**Figura 1**); empleando un variador de energía eléctrica para ajustar la velocidad del rotor (revoluciones por minuto, rpm). Luego del descascarado mecánico de la muestra, el producto resultante se clasificó en cáscara, pepas enteras y resto (grano entero, grano parcialmente descascarado y finos, entendiendo por tal a las partículas de tamaño < 2,00 mm). Cada parte se llevó a estufa de aire forzado durante 3 horas a 130 ºC, para determinar el peso seco de cada fracción. A partir de los datos se calculó el porcentaje de cáscara y de pepa obtenidos mecánicamente. Tanto la "aptitud al descascarado" como la "producción de pepas enteras" se obtuvieron como la relación porcentual entre porcentaje de cáscara/pepa extraído mecánicamente con respecto la cantidad de cáscara/pepa total, respectivamente La cantidad de cáscara y de pepa total se obtuvo por separación manual de la cáscara del grano y posterior secado de ambas fracciones. Las mismas fueron determinadas en granos con un contenido de humedad de aproximadamente 6% base seca (bs), para cinco velocidades de impacto del grano 2900, 3300, 3700, 4100 y 4500 rpm. Los ensayos se realizaron por duplicado y se presentan los promedios de los valores obtenidos.

Los datos obtenidos se analizaron mediante Análisis de la Varianza empleando el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, 2004). La comparación de medias se realizó mediante test de

Tukey ($p \leq 0,05$).

**Figura 1**. Equipo piloto empleado para realizar el descascarado mecánico.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje promedio de cáscara obtenido para el tamaño de grano entre 6,50-8,75 mm fue de 42,9 ± 1,1% (bs), mientras que para los granos mayores a 8,75 mm fue de 50,2 ± 0,54% (bs).

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos de aptitud al descascarado (AD) para los tamaños de granos considerados a las distintas velocidades de impacto.

**Tabla 1**. Aptitud al descascarado (%) de los granos de girasol confitero para diferentes velocidades de impacto.

| Tamaño | Velocidad de impacto (rpm) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **2900** | **3300** | **3700** | **4100** | **4500** |
| 6,50 – 8,75mm | 94,2 a | 94,5 a | 95,5 ab | 97,8 b | 97,2 b |
| > 8,75 mm | 95,6 ab | 96,8 ab | 96,0 ab | 96,3 ab | 94,3 a |

Valor seguido de letra diferente indica diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0,05$).

Para el conjunto de tamaños y velocidades de impacto analizadas, los granos mostraron una elevada aptitud al descascarado (promedio 95,8 ± 1,2%). En general, se puede observar un incremento en la aptitud al descascarado al aumentar la velocidad de impacto de los granos (**Tabla 1**).

El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) permitió detectar en forma significativa tanto el efecto de la velocidad de impacto del grano ($P \leq 0,0157$) como la interacción tamaño de granos x velocidad de impacto ($P \leq 0,0017$), para la aptitud al descascarado, no incidiendo sobre la misma el tamaño de grano ($P \geq 0,8474$). Para un tamaño de grano entre 6,5 y 8,75 mm se observó un incremento significativo de la aptitud al descascarado a mayores velocidades de impacto (4100 y 4500 rpm) respecto a las menores velocidades (2900 y 3300 rpm). Sin embargo, no se detectó un comportamiento diferencial con la velocidad de impacto para los granos de mayor tamaño (> 8,75 mm).

En la **Figura 2** se puede observar la producción de pepas enteras durante el proceso de descascarado a las velocidades de impacto analizadas. En el proceso de descascarado de granos de girasol confitero se persigue la mayor producción de pepas enteras. El máximo porcentaje de pepas enteras obtenidas para el tamaño de granos mayor a 8,75 mm fue de 41,2% (bs) y para el tamaño de 6,50 a 8,75 mm fue de 36% (bs), valores que desde el punto de vista industrial serian muy bajos en función de los objetivos comerciales perseguidos. Mientras que, el mínimo de pepas enteras (2,9%) se observó para la mayor velocidad de de impacto (4500 rpm). El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) permitió detectar diferencia significativa entre tamaño de granos ($P<0,0025$) y entre velocidad de impacto ($P<0,0001$) para el porcentaje de pepas enteras. Al mismo tiempo, la interacción tamaño de granos x velocidad de impacto fue estadísticamente no significativa ($P \geq 0,0625$). Se obtuvo mayor porcentaje de pepas enteras a partir de los granos de mayor tamaño (> 8,75 mm) (**Figura 3**). A medida que se incrementa la velocidad de impacto disminuyó la producción de pepas enteras, diferenciándose significativamente la mínima velocidad de las restantes ensayadas (**Figura 4**).

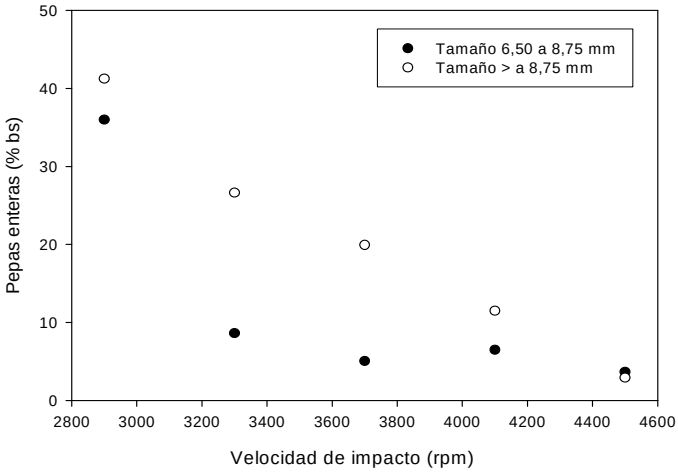


**Figura 2**. Producción de pepas enteras durante el proceso de descascarado a diferentes velocidades de impacto.

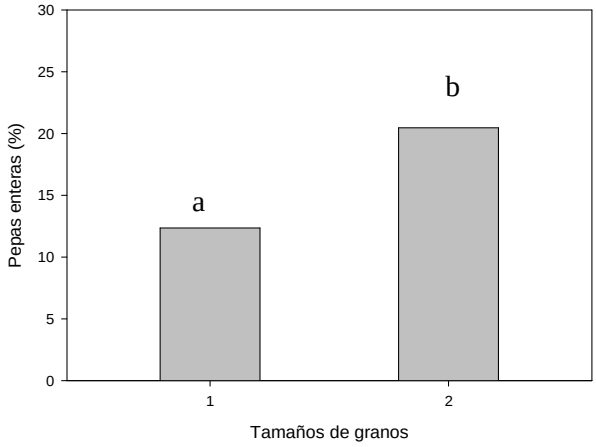


**Figura 3**. Producción de pepas enteras durante el proceso de descascarado para los dos tamaños de granos analizados. (1) 6,50 a 8,75mm (2) > a 8,75mm. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa (Tukey, P≤0,05).

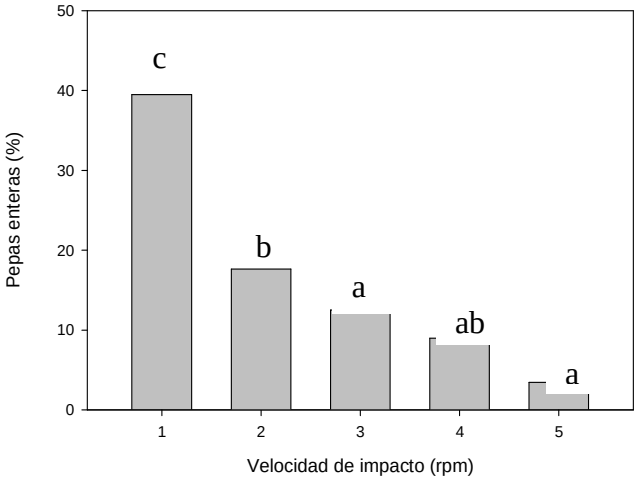


**Figura 4**. Producción de pepas enteras durante el proceso de descascarado de granos a diferentes velocidades de impacto. (1) 2900 rpm, (2) 3300 rpm, (3) 3700 rpm, (4) 4100 rpm, (5) 4500 rpm. Letras diferentes sobre las barras indican diferencia significativa (Tukey, p≤0,05).

Los valores de aptitud al descascarado obtenidos en el presente trabajo fueron superiores a los reportados por Di Leo *et al*. (2006) para girasol confitero (Morgan 9338) evaluados a una velocidad de impacto de 3300 rpm, con igual clasificación de tamaño de grano a la empleada en el presente trabajo. Asimismo, en cuanto a la producción de pepas enteras, los valores encontrados fueron menores a los observados por dichos autores.
La humedad del grano es una variable que afecta su aptitud al descascarado, pero al mismo tiempo, es previsible que una pepa con menor contenido de humedad y relativamente bajo contenido de aceite sea más susceptible a la ruptura por impacto (Baümler *et al*., 2003, Di Leo *et al*., 2006). Por ello, y en función de los resultados obtenidos, se considera conveniente continuar con los estudios a fin de validar la tendencia observada. Análisis posteriores debieran considerar el efecto de la velocidad de impacto a diferentes contenidos de humedad del grano.

## CONCLUSIONES

Para un rango de velocidad de impacto entre 2900 y 4500 rpm se detectó efecto significativo de esta variable del proceso sobre la aptitud al descascarado del grano girasol confitero Mycogen 9338, con un contenido de humedad aproximadamente del 6% (bs). Los granos de tamaño entre 6,5 y 8,75 mm presentaron una aptitud al descascarado significativamente mayor, a las más altas velocidades de impacto estudiadas (4100 y 4500 rpm), respectos de las menores velocidades (2900 y 3300 rpm). Sin embargo, en los granos de mayor tamaño (> 8,75 mm), no se detectó un comportamiento diferencial de su aptitud al descascarado con la velocidad de impacto para los granos.
La velocidad de impacto también influyó sobre la producción de pepas enteras, obteniéndose menor cantidad de ellas a medida que se incrementó ésta velocidad. La menor de las velocidades ensayadas presentó diferencia significativa respecto a las restantes, en cuanto a la producción de pepas enteras. Así mismo, la mayor producción de pepas enteras para el girasol confitero con un contenido de humedad aproximado al 6% (bs) se obtuvo en los granos de mayor (>8,75 mm) tamaño.
Para ambos tamaños de granos la producción máxima de pepa entera fue baja desde el punto de vista de los objetivos industriales. Estudios posteriores debieran contemplar el análisis de la velocidad de impacto de los granos a diferentes contenidos de humedad del grano.

## AGRADECIMIENTOS

Para el desarrollo del presente trabajo se contó con el aporte de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA) y de la Asociación Argentina de grasas y aceites (ASAGA).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

American Society of Agricultural Engineers. 1999. Standard engineering practices data. 46th ed. St. Joseph: ASAE. pag 1017.

Baümler E. 2003. Estudio de la Aptitud al Descascarado de Semillas de Cártamo (Cárthamus tinctorius L.). Olavarría: Facultad de Ingeniería, UNCPBA, Argentina. pag 44.

Beuguillaume A. and Cadeac F. 1992. Elements of explication of the variability of the hulling ability in sunflower. En: Proceedings of the 13th Int. Sunflower Conference. Pisa.pag 993-999.

Di Leo MJ.; Riccobene, IC; Nolasco, SM. 2004. Variability in dehulling ability of sunflower hybrids (Helianthus annuus L.) in Argentina. En: Proceedings of the 16 th. International Sunflower Conference. pag 591-595.

Fernández, MB.; Riccobene, IC.; Nolasco, SM. 2001. Some factors that affect the dehulling ability of sunflowers achenes. En: Welti-Chanes J, Barvosa Cánovas GV, Aguilera JM, López-Leal LC, Weasche-Ebeling P, López-Malo A, Palou-García E, editores. Proceedings of the eighth International Congreso on Engineering and Food –ICEF 8-. Vol. I. Lancaster: Technomic Publishing Co., INC. pag 971-976.

Gupta RK. and Das SK. 1999. Performance of centrifugal dehulling system for seeds. Journal of Food Engineering, 42: 191-198.

Subramanian R., Shamanthaka Sastry MC. & Venkateshmurthy K. 1990. Impact Dehulling of Sunflower seeds: Effect of Operating Conditions and seed Characteristics. Journal of Food Engineering, 12: 83-94.

# Determinación del tiempo de reposo post-zapecado de las ramas de yerba mate

# Determination of a tempering time "post-zapecado" of yerba maté branches

Schmalko ME, Lovera N, Kolomiejec GC.

FCEQyN- Universidad Nacional de Misiones
Felix de Azara 1552 – 3300 - Posadas
mesh@fceqyn.unam.edu.ar

## RESUMEN

El secado intermitente se aplica con el objeto de redistribuir la humedad en algunos alimentos, de tal forma de obtener un ahorro energético y mejorar la calidad del producto. En la primera etapa del procesamiento de la yerba mate, denominada zapecado, las ramas se ponen en contacto con gases de combustión de leña que entran a temperaturas entre 350 y 400 ºC. Al tener las hojas, una relación de área/peso unas 3 veces mayor a los palos, éstas tienen pérdidas de humedades mayores, generándose una diferencia importante entre ambos materiales. El objetivo del presente trabajo fue determinar si existe una migración importante de humedad desde los palos hacia las hojas y el tiempo necesario para que esto ocurra. De esta forma se plantearía mantener en reposo a las ramas durante cierto tiempo luego de ser zapecadas. Las mediciones se realizaron en tres establecimientos industriales localizados en la Provincia de Misiones. Las ramas eran extraídas a la salida del zapecador y eran colocadas en un recipiente hermético. Luego de cierto tiempo, una rama era extraída del lecho, se separaban las hojas de los palos y se determinaban sus humedades. Para ello, se utilizó el método de la pérdida de masa hasta pesada constante. En una primera etapa, se analizaron las humedades a diferentes tiempos entre 0 y 300 min. En total se realizaron 8 series y si bien se encontró cierta tendencia de aumento de humedad en las hojas y disminución en los palos, el ajuste por regresión lineal no fue significativo, debido a la alta dispersión de valores iniciales de humedad en las hojas. Esta dispersión se debe posiblemente a que las ramas tienen diferentes tratamientos térmicos, por tener diferentes tiempos de contacto con la llama y de residencia en el equipo. En una segunda etapa se midieron los valores de humedad en las diferentes sub-ramificaciones de una rama que fueron separadas en tiempos diferentes (0, 10, 20 y 30 min). Este tiempo (30 min) se tomó como el máximo de reposo debido a que con un tiempo mayor se necesitaría un espacio muy grande para almacenar las ramas. Se realizaron en total mediciones en 30 ramas. Se encontró un aumento promedio de humedad en las hojas del 5,48% (bh), transferida desde los palos. En una tercera etapa se estudió la pérdida de humedad y la caída de la temperatura durante el reposo. Se trabajó con 16 ramas y tiempos de reposo similares al caso anterior. Se encontró una pérdida promedio de peso del 3,3% (bh). Esta pérdida de humedad, junto con las de calor, produjeron una reducción de la temperatura de las ramas en ese intervalo de 65-70 ºC a 30-35 ºC. Se considera por lo tanto que el tiempo de reposo adecuado es de 30 min.

## ABSTRACT

Intermittent drying is used in order to redistribute the internal moisture in some food stuff in order to save energy consumption and to improve food quality. In the first step of yerba mate processing, called "zapecado", the branches are put into contact with wood combustion gases that have temperatures ranging between 350 and 400 ºC. The leaves have a relation between surface area/weight of about 3 times grater than twigs, and therefore, lose more water. Consequently, a moisture gradient is generated between them. The aim of this research was the determination of a possible migration of the moisture from twigs to leaves after the first step and the time necessary to get it. So, a tempering time could be applied to the branches after the "zapecado". Measurements were carried out in three factories of Misiones, Argentina. Branches were taken at the outlet of the "zapecador". Immediately, they were put in a hermetic container in order to form a bed. After a determined time, a branch was taken from the bed, the leaves were separated from the twigs and moisture content was determined. For this, the loss of mass until constant weight method was used. In a first step, moisture of leaves and

twigs at different times varying between 0 and 300 min were analyzed. Eight experiences were carried out, and the data were fit, using linear regression, to a straight line. The fit were no significative for both materials, but an increase of moisture in leaves and a decrease in twigs was observed. High differences between the moisture at time=0 were found and this fact could be the cause of disadjustment. The differences in moisture content between branches are caused, probably, by the different of heat treatment when they are put into contact with the flame and the different residence times. In a second step, moisture of the different sub-ramifications of a branch, at different times (0, 10, 20 y 30 min) were measured. The time of 30 min was considered the highest one that could be applied in the factories. Thirty experiences were carried out. An increase of leaves moisture mean value of 5.48% (wb) was found. This moisture was transferred from the twigs. In a third step, branch loses of moisture and temperature in the bed was studied. Sixteen experiences were carried out. Loses of moisture of 3.3 % (wb) until 30 min were found. Moisture and heat loses produced a decrease in the bed temperature, reducing it from 65-70 ºC to 30-35 ºC in 30 min. A tempering time of 30 min is considered the best one.

**PALABRAS CLAVE**: *yerba mate, tempering, humedad, migración.*

**KEYWORDS**: *yerba maté, tempering, moisture, migration.*

## INTRODUCCIÓN

El procesamiento de la yerba mate comprende 5 etapas: el zapecado, el secado, la molienda gruesa, el estacionamiento y la molienda fina. En general, las tres primeras etapas se llevan a cabo en establecimientos denominados secaderos, que se encuentran localizados en zonas cercanas al cultivo; mientras que el estacionamiento y la molienda se llevan a cabo en establecimientos denominados molinos.

En la cosecha, las ramas son cortadas manualmente y rápidamente transportadas a los secaderos, donde son procesadas. De acuerdo al sistema de cosecha utilizado, existe una variabilidad muy grande en el material recibido, ya sea de forma (ramificadas o nó) y tamaño (entre 30 y 60 cm de longitud) (Crotti et al. 2002). Una vez recepcionadas en el establecimiento son depositadas en una playa y alimentadas al zapecador.

En la etapa de zapecado se produce la inactivación de las enzimas presentes en las hojas, que podrían producir su pardeamiento. El equipo consiste en un cilindro que gira por medio de un engranaje a bajas revoluciones (unas 10 rpm). Las ramas se introducen en el extremo del cilindro en la que se produce el quemado de la leña, recibiendo al pasar a través de la llama, calor por radiación y convección. Debido al bajo control que se tiene de la misma, las ramas pueden pasar a través de ella entre 1 y 3 veces, sufriendo, por lo tanto, diferentes tratamientos térmicos. Luego, el aire y las ramas se desplazan hacia el extremo opuesto en corrientes paralelas. La temperatura de entrada de los gases de combustión, mezclado con aire, se encuentra entre 350 y 400 ºC; mientras que los gases de salida tienen temperaturas, generalmente superiores a los 100 ºC. El desplazamiento de las ramas es producido por una serie de aletas dispuestas en forma discontinua y con una ligera inclinación para favorecer el desplazamiento y por el arrastre de los gases de combustión (Peralta y Schmalko 2007). Este flujo es regulado por un deflector ubicado en el interior de la chimenea de salida de los gases. El tiempo de residencia de las ramas varía entre 2 y 4 minutos, de acuerdo a su forma y tamaño (Crotti et al. 2002).

Si bien el contenido inicial de humedad de las hojas y los palos es similar (alrededor del 60%, bh), los valores a la salida de este equipo difieren en gran medida, encontrándose valores cercanos al 20% (bh) en las hojas y 55% (bh) en los palos (Schmalko y Alzamora 2001). Esto se debe a que las hojas tienen una relación de área superficial/peso del material unas 3 o mas veces mayor, siendo, por lo tanto, mayor la transferencia de calor y materia en ellas. Se genera por lo tanto, un gradiente de humedad entre ambos materiales, además del gradiente interno que se produce en la mayoría de los materiales al ser secado.

El secado intermitente (secado con tiempos de reposo) se aplica a materiales con el objeto de redistribuir el perfil interno de humedad en algunos alimentos, de tal forma de obtener un ahorro energético y mejoramiento de la calidad del producto. Se aplica principalmente a productos que tienen control interno a la transferencia de humedad. Al aplicarse este método al secado del arroz, se busca,

además del ahorro energético, evitar la rotura del grano al reducir el gradiente de humedad (Li et al. 2003, Mabamba y Yabés 2005, Nishiyama et al. 2006, Shei y Chen 2002).
En este trabajo se tuvo por objetivo estudiar la migración de humedad que se tendría de los palos a las hojas al mantener un periodo de reposo (*tempering*) al material luego de ser zapecado. De esta forma se podría producir un ahorro energético en la etapa siguiente de secado del procesamiento de la yerba mate, al reducirse el tiempo de secado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se utilizaron ramas de yerba mate que fueron extraídas de la cinta transportadora a la salida del zapecador. Las mediciones se realizaron en tres establecimientos yerbateros, en el periodo de zafra, entre abril y septiembre de 2008. El establecimiento 1 procesaba 4.700 kg/h de ramas y el zapecador tenía 8,6 m de longitud y 2 m de diámetro; el establecimiento 2 procesaba 6.000 kg/h de ramas y tenía 2 zapecadores, en paralelo, de 8 m de longitud y 2 m de diámetro y el establecimiento 3 procesaba 8.000kg/h de ramas y tenía dos zapecadores, en paralelo, de 8 m de longitud y 2 m de diámetro.

### Metodología de trabajo

Se realizaron cuatro etapas de mediciones, cada una de ellas con procedimientos de trabajo diferentes, las que fueron implementadas de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera serie de mediciones.
**Etapa 1: Determinación del contenido de humedad en diferentes ramas**. Se extrajeron las ramas de diferentes formas y tamaños, se colocaron en una conservadora y se fueron extrayendo diferentes ramas a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 210 y 300 min. Una vez extraída las ramas, se separaron las hojas de los palos, se colocóaron en bolsas dobles de polietileno con cierre hermético y se determinaron los contenidos de humedad. En total se realizaron 8 experiencias.
**Etapa 2: Determinación del contenido de humedad en una rama.** Se extrajeron ramas, con por lo menos 5 sub-ramificaciones diferentes. Se colocaron en una conservadora que contenía un lecho de ramas recientemente extraídas, se extrajeron cada una de las sub-ramificaciones a los 0, 10, 20, 30 minutos y se mantuvo la última sub-ramificación hasta el día siguiente (simulando tiempo infinito). Una vez extraída la muestra, se separaron las hojas de los palos, se colocarob en bolsas dobles de polietileno con cierre hermético y se determinaron los contenidos de humedad. Simultáneamente se medía la temperatura en el lecho. Se realizaron en total 30 experiencias.
**Etapa 3: Determinación de la pérdida de peso de las ramas.** Se extrajeron ramas de diferentes formas y tamaños y se colocaron en una conservadora. A una de las ramas del lecho se le midió el peso total a los 0, 5, 10, 15, 20 y 30 min. Se realizaron en total 16 experiencias en ramas con hojas y 2 en ramas sin hojas.
**Etapa 4: Contenido de humedad de las sub-ramificaciones al tiempo cero**. Se extrajeron ramas con por lo menos 4 sub-ramificaciones, las que fueron separadas rápidamente de la rama principal. De cada sub-ramificación se separaron las hojas de los palos, se colocaron en las bolsas de polietileno y se determinó el contenido de humedad.

### Contenido de humedad

El contenido de humedad se determinó utilizando el método de la Norma IRAM 20503 (1995).

### Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics (2009). Para analizar los datos de la etapa 1, se realizó un análisis de regresión lineal. En la etapa 2 se utilizó un análisis de varianza. En la etapa 3 se realizó un análisis para la comparación de medias y en la etapa 4 se realizó un análisis de distribución de frecuencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Variación del contenido de humedad en diferentes ramas con el tiempo (etapa 1)

Para analizar los datos, se realizó un análisis de regresión lineal considerando el contenido de humedad como variable dependiente y el tiempo como variable independiente. Al utilizar todos los datos obtenidos para las hojas, se encontró que la la ecuación lineal no describía estadísticamente este comportamiento (ajuste no significativo con $P< 0,4170$), aunque se tenía una pendiente positiva, lo que indicaba que las hojas ganaban agua por migración. El análisis de regresión lineal en los palos tuvo un ajuste no significativo y con pendiente positiva ($P<0,0847$). Por este motivo, se eliminaron

todos los datos que estaban fuera de los límites de confianza y se realizó un nuevo análisis, resultando el ajuste significativo en los dos casos. En las hojas, la ordenada al origen tuvo un valor de 21,19 y la pendiente un valor positivo de 0,0185 con P< 0,0158 (ganancia de humedad); mientras que en los palos estos valores fueron de 57,20 y -0,0160 con P<0,0136 (pérdida de humedad) (F**iguras 1** y **2**). No obstante se puede observar que los límites de confianza tienen valores que difieren al valor medio en ± 10% de humedad, lo que se puede considerar muy elevado.

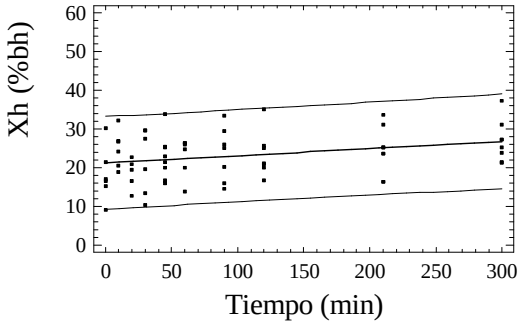


**Figura 1**. Variación del contenido de humedad en las hojas (bh) en función del tiempo.

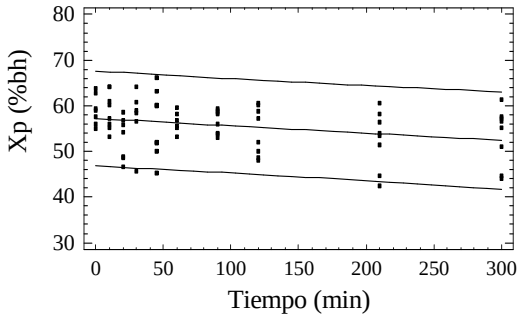


**Figura 2**. Variación del contenido de humedad en los palos (bh) en función del tiempo.

Al realizar un análisis de las posibles causas de esta elevada dispersión, se pueden mencionar las siguientes: en primer término, la llama en el equipo es controlada por un operario que de acuerdo a su experiencia, añade leña al fuego, lo que hace aumentar la misma lo que provoca que las ramas que pasan en ese momento tengan un tiempo de contacto mayor con ella. En segundo lugar la dispersión en peso y forma de las ramas hace que el tiempo de residencia varíe entre 2 y 4 min (Crotti et al. 2002), lo que provoca pérdidas de humedades diferentes en las distintas ramas. Por este motivo, se realiza la segunda etapa del trabajo en la que se analizaron sub-ramificaciones de una misma rama, suponiéndo que tienen pesos similares e igual tiempo de residencia.

## Variación del contenido de humedad en las sub-ramificaciones de una rama con el tiempo (etapa 2)

En todos los casos se utilizaron ramas con por lo menos 5 sub-ramificaciones. Al realizar un análisis de varianza se encontró que en las hojas existían diferencias significativas entre los contenidos de humedad medidos en los diferentes tiempos ($P< 10^{-4}$) (**Figura 3**). Los valores medios variaron entre 17,27% (bh) para el tiempo cero y 22,75% (bh) a los 30 min, lo que significa una ganancia de humedad del 5,48% bh (o 8,60 g agua/100 g de sólido seco). En los palos, se observaron diferencias entre los valores medios pero la misma no fue significativa estadísticamente. No obstante se puede observar una tendencia decreciente en sus valores medios (**Figura 4**). Esto puede deberse nuevamente a la gran dispersión de los datos, que se observaba en las diferentes ramas. En las dos **Figuras** (**3** y **4**) se puede observar que los límites están en el orden de ± 1,2 % de humedad. Estos valores son menores

al rango encontrado considerando diferentes ramas (etapa 1). Para determinar si esta dispersión se debe a los diferentes valores de contenido de humedad en las sub-ramificaciones, se lleva a cabo la etapa 4, en la que se determinaron los contenidos de humedad de cada una de ellas, en hojas y palos, a la salida del zapecador.

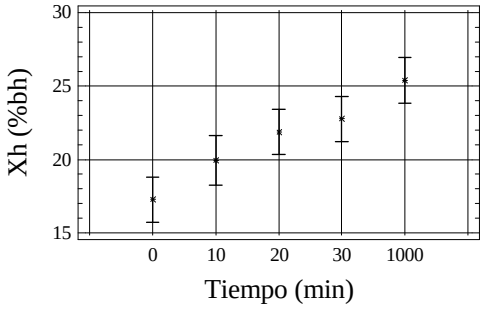


**Figura 3**. Variación del contenido de humedad en las hojas (bh) en función del tiempo.

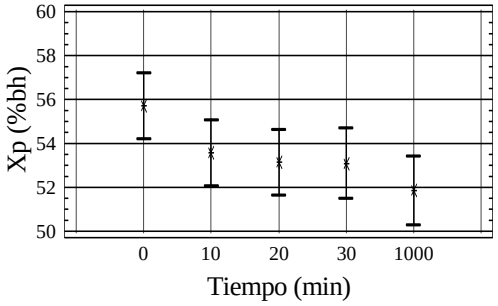


**Figura 4**. Variación del contenido de humedad en los palos (bh) en función del tiempo.

## Pérdida de peso de las ramas (etapa 3)

Al determinarse el peso de las ramas ubicadas en el lecho a diferentes tiempos, se encontró que debido a su temperatura relativamente elevada a la salida del zapecador, la misma en todos los casos sufría una pérdida de peso (humedad). En la **Figura 5** se presentan los valores experimentales obtenidos, observándose que las mismas tuvieron una pérdida de un 3,3 % (bh) (5,17 g agua/100 g de sólido seco) al alcanzar los 30 min. Al realizar las experiencias con ramas sin hojas, se encontró que las pérdidas eran menores ($P<0,0476$), con un valor medio de 2,4% a los 30 min (4,86 g agua/100 g de sólido seco).

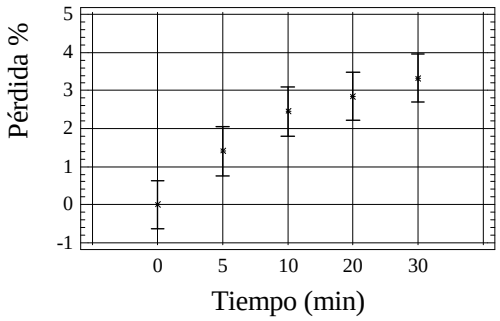


**Figura 5**. Pérdida de peso porcentual de las ramas en el lecho.

La variación de temperatura tuvo un comportamiento similar en todas las experiencias, reduciéndose en el término de 30 min, de 65-70 ºC a 30-35 ºC.

### Contenido de humedad de las sub-ramificaciones al tiempo cero (etapa 4)

En todos los casos se determinaron en ramas con por lo menos 4 sub-ramificaciones. En las hojas, los valores encontrados al realizar una serie de extracciones en un mismo día, variaron entre 4,05 y 25,33% (bh), encontrándose un valor de coeficiente de variación muy elevado (39,13%). En la **Figura 6** se puede observar la distribución de frecuencias de los contenidos de humedad en las hojas al tiempo cero. Al analizar los valores de desviación standard dentro de una rama, se encontró un valor medio, considerando las 8 ramas, de 4,03%, que aún se considera muy elevada. Al tener estas sub-ramificaciones un tiempo de residencia similar, se puede inferir que las diferentes partes de una misma rama tienen diferentes grados de exposición a la llama, lo que produce diferentes tratamientos térmicos y por lo tanto diferentes contenidos de humedad. En los palos, el contenido de humedad varió entre un 42,39 y 57,99% (bh), con valores de desviación típica ligeramente menores.

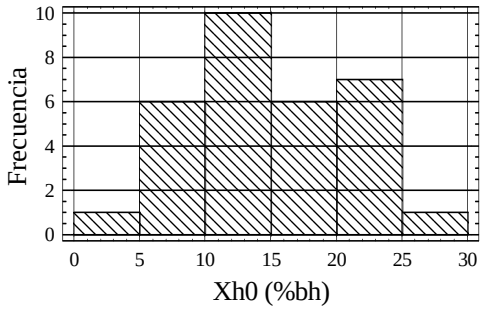


**Figura 6**. Distribución del contenido de humedad en las hojas a la salida del zapecador (tiempo cero).

## CONCLUSIONES

Al estudiar la migración de humedad aplicando un tiempo de reposo a las ramas de yerba mate luego de la etapa de zapecado, se encontró una migración importante de humedad de los palos hacia las hojas. Simultáneamente se produce una pérdida de humedad en las ramas, que provocaba a su vez, junto con las pérdidas de calor, una disminución de la temperatura del lecho. Se considera conveniente aplicar un tiempo de reposo de 30 min, en el que se tendría una pérdida de humedad promedio del 3,3% (bh) (o 3,5% de la cantidad de agua en las ramas antes de ser procesadas). Además se transferiría de los palos a las hojas una cantidad promedio de 8,60 g agua/100 g sólidos, que representaría el 5,5% del agua presente inicialmente en el material. Con esto se facilitaría la evaporación del agua en la etapa de secado, ya que las hojas tienen una velocidad de secado mayor.

Al determinar el contenido de humedad a la salida del zapecador, se encontró que tenían valores muy diferentes, tanto las hojas como los palos. Esta variación se debe a las diferentes formas y pesos de las ramas y diferentes tiempos de residencia y de exposición a la llama. Se encuentran inclusive diferencias importantes de humedad entre las sub-ramificaciones de una misma rama.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Agencia para la Promoción Científica de la República Argentina y la Universidad Nacional de Misiones

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Crotti LO, Schmalko ME, Surkan S. 2002. Influencia de las características físicas de las ramas en el tiempo de residencia en secaderos rotatorios. Presentado en el IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos; Buenos Aires, 7 al 9 de Agosto de 2002.

IRAM 20503. 1995. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la Pérdida de Masa a 103° C.

Li C, Liu J, Chen L. 2003. The moisture distribution of high moisture content rough rice during harvestig, storage and drying. Drying Technology 21: 1115-1125.

Madamba PS, Yabes RP. 2005. Determination of the optimum intermittent drying condictions for rouh rice (Oryza sativa, L). Lebensm-Wiss. U.-Technol. 38: 157-165.

Nishiyama Y, Cao W, Li B. 2006. Grain intermittent drying characteristic analyzed by a simplified model. Journal of Food Engineering 76: 272-279.

Peralta JM, Schmalko ME. 2007. Modeling Heat and Mass Transfer in the Heat Treatment Step of Yerba Maté Processing.. Brazilian Journal of Chemical Engineering 24 (1): 73-82.

Schmalko ME, Alzamora SM. 2001 Color, Chlorophyll, Caffeine, and Water Content Variation During Yerba Maté Processing.. Drying Technology 19 (3&4): 599-610.

Shei HJ, Chen YL. 2002. Computer simulation on intermittent drying of rough rice. Drying Technology 20: 615-636.

Statgraphics. 2009. Centurion XV. Statpoint Technologies, Inc. Warrenton VA, U.S.A.

# Modelado matemático de la cinética de secado en capa delgada a baja temperatura de cebada cervecera variedad Scarlett

# Mathematical modelling of the low temperature thin-layer drying kinetics of malting barley Scarlett variety

Sologubik CA (1), Crozza DE (1,2), Pagano AM (1,2)

(1) Depto. de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería – UNICEN
(2) PROGRAMA INSTITUCIONAL ALIMENTOS – UNICEN
Av. Del Valle 5737, 7400 (Olavarría), Buenos Aires, Argentina,
Email: anamariapagano@yahoo.com.ar

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y modelar la cinética de secado y la difusividad de humedad de la cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) variedad Scarlett, bajo diferentes condiciones de humedad inicial del grano (15,16 y 18,24% b.s., base seca), temperatura (20, 28 y 38 °C) y velocidad del aire de secado (0,8 y 1,5 m/s). Las muestras fueron acondicionadas agregando agua en forma de *spray* para llevar el contenido de humedad a 15,16 y 18,24% b.s., se mantuvieron 48 horas en reposo y se sometieron al secado en un túnel secadero piloto de bandejas (Armfield). Se observó que el total de ensayos experimentales se desarrollaron en período de velocidad de secado decreciente y la humedad adimensional resultó ser afectada por el tiempo de secado, por la temperatura y el contenido de humedad inicial. El contenido de humedad de equilibrio se calculó mediante la ecuación de Chung-Pfost. El ajuste matemático de las curvas de secado se realizó a través de los modelos de Lewis, Wang-Singh, Henderson-Pabis, exponencial de dos términos, logarítmico, de dos términos, aproximación difusional, Verma et al. (1985), Midilli et al (2002), Page, Page modificado y Difusivo tiempos cortos, siendo los ocho últimos los que resultaron ser más apropiados para describir la cinética de secado. El coeficiente de difusión de humedad para las diferentes condiciones experimentales fue de $1{,}10 \times 10^{-12}$ a $6{,}25 \times 10^{-12}$ $m^2/s$, y resultó ser afectado por la temperatura del aire y el contenido de humedad inicial. Basándose en esto, se derivó un modelo general, y la energía de activación fue de 50,2641 kJ/mol. Considerando que los modelos seleccionados deben no sólo describir correctamente la cinética de cebada cervecera variedad Scarlett sino que, a su vez, es deseable que sean de fácil aplicación práctica al momento de diseñar los equipos de secado, es que se aconseja la aplicación de los modelos de Page y Page modificado. Adicionalmente, vista su adecuada calidad de ajuste y su fuerte basamento teórico, se selecciona también el modelo difusivo de tiempos cortos que permite tener una estimación de la difusividad de agua.

## ABSTRACT

The objective of this work was to study and model the drying kinetics and the water diffusivity of malting barley (*Hordeum distichum* L.) Scarlet variety under different conditions of initial moisture content (15,16 y 18,24% d.b., dry basis), drying temperature (20, 28 and 38°C) and air velocity (0,8 and 1,5 m/s). Samples were conditioned adding water in spray form in order to obtain moisture contents of 15,16 and 18,24% d.b., then were kept 48 h hermetically stored and dried in a tunnel pilot drier (Armfield). For all runs it was observed that drying occurs in the decreasing drying velocity period, and dimensionless humidity was affected by the drying time, temperature and initial moisture content.

The equilibrium moisture content was evaluated by the Chung-Pfost equation. Drying curves were fitted by mathematical models such us Lewis, Wang-Singh, Henderson-Pabis, Exponential Two terms, Logarithmic, Two terms, Approximate diffusional, Verma et al. (1985), Midilli et al. (2002), Page, Modified Page and Diffusional of Short times. The last eight models were the more adequate to describe the drying kinetics. The water diffusion coefficient for the different experimental conditions were in the range $1{,}10 \times 10^{-12}$ to $6{,}25 \times 10^{-12}$ $m^2/s$, resulting affected by the air temperature and initial moisture content. Based on this result, a general mathematical model was derived and the activation

energy was calculated as 50,2641 kJ/mol. Considering that the selected models must describe adequately the drying kinetics of malting barley grains as soon as must be of simple applications for drying equipment design, it was recommended the use of Page and Modified Page models. Additionally, due their good quality of fitting and their strong theoretical basement, the Diffusional of short times model was also selected to estimate the water diffusivity.

**PALABRAS CLAVE**: *cebada cervecera, cinética de secado, modelado matemático, coeficiente de difusión, energía de activación.*

**KEYWORDS**: *malting barley, drying kinetics, mathematical modelling, diffusion coefficient, activation energy.*

## INTRODUCCIÓN

La cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) es el cultivo de más amplia distribución en todo el mundo. Argentina en los últimos diez años ha incrementado la producción de este grano en un 50%, contribuyendo con aproximadamente 1,4 mill. de toneladas generadas de las cuales el 95% proviene de la provincia de Buenos Aires. La cebada se considera fisiológicamente madura en alrededor de 35% b.s de humedad en las semillas y se puede cortar cuando el contenido de humedad es del 20-30% b.s. y dejar secar en pilas o hileras. Si es cosechada con un contenido del 18% b.s. de humedad o mayor puede ser fácilmente dañada durante la trilla. Además, existe un alto potencial de riesgo de quebrar granos cuando la cebada madura permanece un largo período de tiempo en el campo antes de la cosecha, alcanzando valores de humedad inferiores al 13,5% b.s. (AMBAINC 2008).

Por lo tanto, los granos generalmente se cosechan con una humedad de entre el 13,5% b.s. y 18% b.s., acondicionándose al 12% b.s. para su almacenamiento seguro mediante operaciones como el secado y/o aireación, en las cuales la temperatura del grano no debe ser superior a 43 ºC para evitar la pérdida de poder germinativo, la destrucción enzimática y la predisposición a sufrir daños mecánicos lo que reduce la calidad y valor comercial del producto (AGRIC 2008).

Con el fin de optimizar estas operaciones, los modelos matemáticos de simulación para el secado constituyen una herramienta importante que deben conocerse para llegar a optimizar el diseño y gestión del proceso. Entre ellos se destacan los modelos de capa delgada que representan una herramienta valiosa para describir el comportamiento del secado de los productos biológicos, tales como las semillas de los cereales y oleaginosas (Tironi et al. 2006). El diseño de los sistemas de secado se basa en la predicción de la cinética de secado de cada producto en particular, que depende de las condiciones de secado y las características del materiales (Afzal y Abe 2000).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y modelar la cinética de secado y la difusividad de humedad de la cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) variedad Scarlett, bajo diferentes condiciones de humedad inicial del grano (15,16 y 18,24% b.s.), de temperatura (20, 28 y 38 °C) y de velocidad del aire de secado (0,8 y 1,5 m/s).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Se emplearon muestras de granos limpios y secos de cebada variedad Scarlett cosecha 2007/08, humedad 9,703% b.s., densidad real 1287 kg/m$^3$, peso hectolítrico 735 kg/m$^3$, peso de 1000 granos 42,751 g, diámetro equivalente 4,344 x 10$^{-3}$ m.

La muestra original se dividió en submuestras de 100 g, se acondicionaron agregando en forma de *spray* el agua necesaria para que alcanzar humedades del 15,16 y 18,24% b.s., y se colocaron en recipientes herméticos. Las muestras humidificadas se dejaron reposar a temperatura ambiente 24 horas permitiendo la distribución homogénea del agua añadida en todo el grano previo a realizar los ensayos de secado.

El contenido de humedad de los granos se determinó en estufa de aire forzado según la Norma AOCS Ba 2a-38 (1998) por triplicado.

### Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la temperatura, del contenido de humedad inicial y de la velocidad del aire en el proceso de secado se empleó un diseño experimental factorial consistente en 24 ensayos

considerando dos niveles para el contenido de humedad inicial $M_o$ (15,16 y 18,24% b.s.), tres niveles para la temperatura de secado (20, 28 y 38 °C) y dos niveles para la velocidad del aire de secado V (0,8 y 1,5 m/s), con dos repeticiones.

## Procedimiento experimental

Los ensayos de secado se realizaron en un secadero batch tipo túnel "Armfield" (rango de velocidad de 0 a 2 m/s y temperatura de 0 a 46 ºC). Las condiciones de secado se estabilizaron durante 60 min antes de los test, luego se procedió a disponer las muestras de 100 g en una capa delgada sobre los contenedores del equipo de secado (20 cm de largo, 7 cm de ancho y 2 cm de alto) y éstos se ubicaron dentro del secadero para dar inicio al proceso de secado. Durante la operación cada uno de los contenedores se extrajeron del túnel a intervalos regulares y se pesaron en una balanza electrónica (Ohaus modelo GT 410, 400 g de capacidad, sensibilidad 0,001 g) para poder cuantificar la pérdida de masa.

La velocidad del aire se controló por medio de un sistema electrónico y se registró con un anemómetro digital (LCA modelo 6000, serie 0,25-0,30 m/s, error 0,1 m/s). En tanto un controlador PID controló automáticamente la temperatura del aire. A su vez se registró mediante un psicrómetro aspirado (Papst modelo ZP 611) las propiedades (temperatura de bulbo seco y húmedo) del aire circundante al equipo de secado con el fin de calcular la humedad relativa del ambiente y del aire de secado mediante la carta psicrométrica electrónica Akton Psychrometric Chart Version 3.1 (Akton Associates Incorporated 1996).

## Modelado matemático de la cinética de secado en capa delgada

Los datos experimentales del contenido de humedad fueron expresados como humedad adimensional (MR) en función del tiempo (t) y se calcularon como:

$$MR = (M - M_o)/((M_o - M_e) \qquad (1)$$

donde $M_e$, $M_o$, M son la humedad de equilibrio, inicial y puntual, respectivamente.

A partir de datos experimentales de equilibrio de sorción de agua de cebada reportados en bibliografía (Sun y Woods 1994), mediante un análisis de regresión no lineal utilizando el módulo de NonLin paquete Systat (Wilkinson 1990) se realizó el ajuste del modelo de Chung-Pfost (ASAE 1999):

$$M_e = -\frac{1}{C_2}\ln\left[-\frac{(T + C_3)\ln(RH)}{C_1}\right] \qquad (2)$$

donde T es la temperatura de secado de bulbo seco (°C), RH es la humedad relativa decimal, y $C_1$, $C_2$ y $C_3$ son constantes para cada material. Los valores de $C_1$, $C_2$ y $C_3$ del modelo ajustado resultaron respectivamente 395,986; 17,397; 24,880 ($R^2$corr=0,998; $S_y$<0,001; p=0,009). Este procedimiento permitió obtener una ecuación matemática para evaluar la humedad de equilibrio ($M_e$) para cada una de las condiciones experimentales del trabajo.

Con la finalidad de determinar los modelos matemáticos que son más precisos para describir de la cinética de secado, los datos experimentales se reagruparon de acuerdo a las variables que afectaron más significativamente la humedad adimensional y se establecieron ajustes estadísticos mediante modelos los matemáticos que se muestran en la **Tabla 1**, los cuales son frecuentemente reportados en bibliografía.

Entre los numerosos modelos teóricos, empíricos y semiempíricos de secado en capa delgada, un simple modelo predictivo para la difusión dentro de los sólidos –conocido como "ecuación de tiempos cortos" de Becker (1959)- ha sido probado satisfactoriamente para la interpretación del secado de granos, y predice en la práctica valores cercanos a la serie infinita de la solución analítica de la ecuación difusiva (Giner 1999, Giner y Mascheroni 2001) de MR> 0,2. Para la geometría esférica, este modelo tiene la expresión:

$$MR = 1 - 2/\sqrt{\pi}\,(6/d_{eq})\sqrt{D_{ef}\,t} + 0{,}331\,(6/d_{eq})^2 D_{ef}\,t \qquad (3)$$

El radio de la partícula (R) se evaluó a partir del diámetro equivalente de la semilla ($d_{eq}$), el cual fue determinado usando la siguiente expresión (Gupta y Das 1997).

$$2R = d_{eq} = (L \times A \times E)^{(1/3)} \quad (4)$$

donde: L = longitud (mm), A = ancho (mm), E = espesor (mm).
Para evaluar el efecto de la temperatura de secado sobre el coeficiente de difusión de humedad, se empleó una ecuación del tipo Arrhenius frecuentemente aplicada (Brooker et al. 1992, Panchariyaa et al. 2002, Doymaz 2004) para numerosos materiales:

$$D_{ef} = D_o \exp(-Ea / R_g T_a) \quad (5)$$

donde $D_o$ es una difusividad infinita a alta temperatura, Ea es la energía de activación, $R_g$ es la constante de los gases ideales (8,314 J/mol-K) y $T_a$ es la temperatura absoluta.
Con el fin de incorporar el efecto de la humedad inicial ($M_o$) en el modelado de la difusión de humedad varios trabajos disponibles en literatura (Giner y Mascheroni 2001, Pagano y Mascheroni 2004) han propuesto una correlación lineal entre $D_o$ y $M_o$. Basándose en estos antecedentes, se consideró la siguiente ecuación:

$$D_o = D_{o1} + D_{o2}(15{,}16 - M_o) \quad (6)$$

La Ec. (6) se incluyó en la Ec. (5) y se procedió a reajustar el conjunto de datos:

$$D_{ef} = [D_{o1} + D_{o2}(15{,}16 - M_o)]\exp(-Ea/RT_a) \quad (7)$$

**Tabla 1.** Modelos matemáticos para el modelado de la cinética de secado en capa delgada.

| **Modelo** | **Ecuación** | | **Referencia** |
|---|---|---|---|
| Lewis | $MR = \exp(-k_L t)$ | | Ayensu 1997 |
| Page | $MR = \exp(-k_P t^n)$ | | Sun y Woods 1994 |
| Page modificado | $MR = \exp[-(k_{MP} t)^n]$ | | Panchariya et al. 2002 |
| Modelo difusivo de tiempos cortos | $MR = 1 - 2/\sqrt{\pi}\,(6/d_{eq})\sqrt{D_{ef} t} + 0{,}331(6/d_{eq})^2 D_{ef} t$ | | Giner 1999<br>Giner y Mascheroni 2001<br>Becker 1959 |
| Henderson-Pabis | $MR = a\exp(-k_{H\&P} t)^n$ | | Rahman et al. 1998 |
| Logarítmico | $MR = a\exp(-k_{LOG} t) + c$ | | Doymaz, 2004 |
| De dos términos | $MR = a\exp(-k_{0TT} t) + b\exp(-k_{1TT} t)$ | | Dandamrongrak et al. 2002 |
| Exponencial de dos términos | $MR = a\exp(-k_{TTE} t) + (1-a)\exp(-k_{TTE} at)$ | | Ertekin y Yaldiz 2004 |
| Wang-Singh | $MR = 1 + at + bt^2$ | | Chen y Wu 2001 |
| Aproximación difusional | $MR = a\exp(-k_{DA} t) + (1-a)\exp(-k_{DA} bt)$ | | Kassem 1998 |
| Verma et al. | $MR = a\exp(-k_V t) + (1-a)\exp(-gt)$ | | Verma et al. 1985 |
| Midilli et al. | $MR = a\exp(-k_M t^n) + bt$ | | Midilli et al. 2002 |

con $M_e$, $M_o$, M: humedad de equilibrio, inicial y puntual; a, b, c, n, g, $k_L$, $k_P$, $k_{MP}$, $k_{H\&P}$, $k_{LOG}$, $k_{0TT}$, $k_{1TT}$, $k_{TTE}$, $k_{DA}$, $k_V$, $k_M$: constantes; t: tiempo (s); $d_{eq}$: diámetro equivalente (m); $D_{ef}$: coeficiente de difusión ($m^2/s$).

## Criterios estadísticos

Los coeficientes de difusividad para cada condición experimental se determinaron a través de análisis de regresión no lineal utilizando el módulo de NonLin paquete Systat (Wilkinson 1990). La bondad de los ajustes fue cuantificada por medio de los criterios estadísticos coeficiente de correlación ($R^2$), coeficiente de correlación corregido ($R^2$ corr), error de la estimación (Sy) y desviación media relativa estándar (MRD).

# RESULTADOS Y DISCUSIONES

## Análisis de los datos experimentales

La **Figura 1** muestra las curvas de secado obtenidas para el conjunto completo de ensayos del diseño experimental. Para cada test, los puntos se muestran como valores promedio de duplicados.

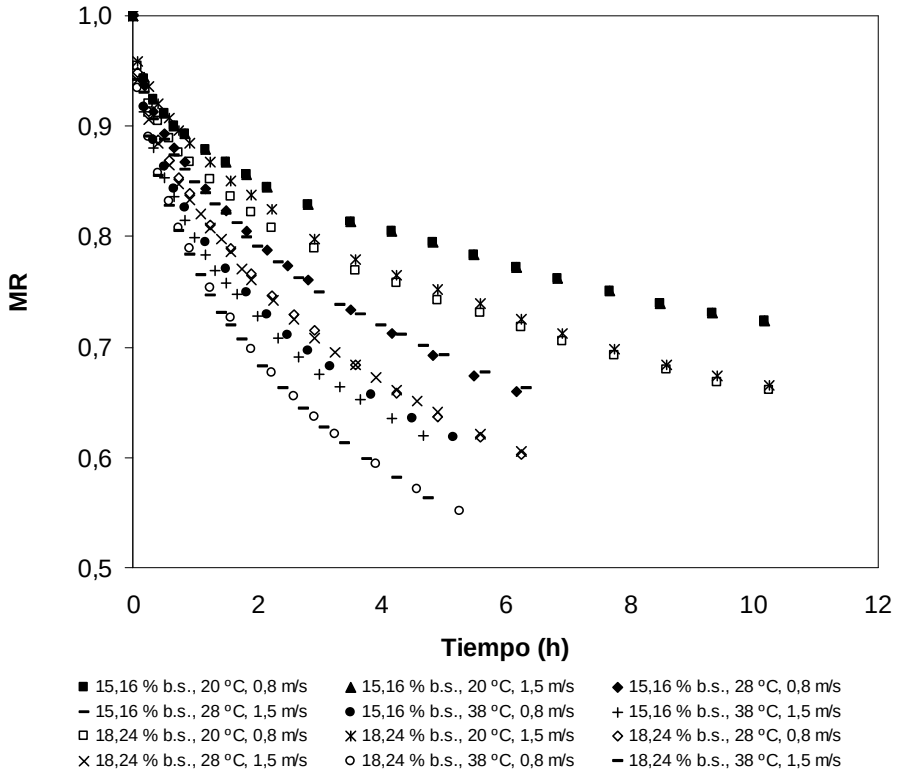


**Figura 1**. Curvas de secado de cebada cervecera variedad Scarlett en el rango de humedad inicial 15,16-18,24% b.s., temperatura de aire 20-38°C, y velocidad de aire 0,8-1,5 m/s.

El análisis de varianza (nivel de confianza 95%) realizados sobre el conjunto completo de datos del diseño experimental, constató que el tiempo de secado fue la variable que afectó más significativamente la humedad adimensional con un valor experimental de $F_{76;407;0,95}$=37,60502 frente a un valor teórico de tabla de 1,2753 ($p \leq 0,00001$). La temperatura de secado siguió en orden de importancia estadística al tiempo, presentando un valor de $F_{2;460;0,95}$=17,01501 ($F_{tabla}$=3,0138) ($p \leq 0,00001$). El contenido de humedad inicial de los granos se ubicó seguidamente en orden de significancia luego de las variables anteriormente mencionadas, demostrándose una funcionalidad con la humedad adimensional a partir del análisis de varianza (valor experimental $F_{1;460;0,95}$=10,73949 comparado a un valor de tabla teórico de 3,8601; $p \leq 0,00113$). En tanto, no se evidenció influencia estadísticamente significativa de velocidad del aire de secado, ni de interacciones entre las variables.

Para el conjunto de ensayos del diseño experimental se obtuvieron también las curvas de velocidad de secado. La **Figura 2** muestra estas curvas como promedio de duplicados obtenidos para una humedad inicial de 18,24% b.s., temperaturas de secado de 20º a 38ºC y velocidades de flujo de aire de 0,8 a 1,5 m/s. Para el total de los ensayos se observó una velocidad decreciente de secado en el transcurso de todo el proceso, concordando con lo reportado Brooker et al. (1992) para el secado de maíz.

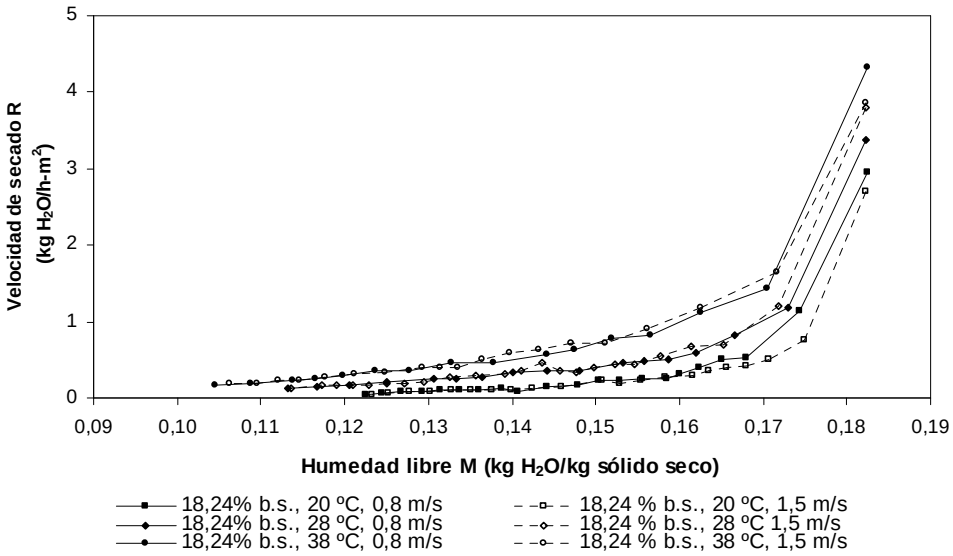


**Figura 2**. Curvas de velocidad de secado de cebada cervecera variedad Scarlett con humedad inicial 18,24% b.s., en el rango de temperatura de aire 20-38°C y velocidad de aire 0,8-1,5 m/s.

## Selección de los modelos matemáticos para describir la cinética de secado

La selección de los modelos se realizó sobre la base del conjunto completo de los criterios estadísticos coeficiente de correlación corregido ($R^2$ corr), error de la estimación ($S_y$) y desviaciones medias relativas estándar (MRD). Los modelos que resultaron más precisos para describir las curvas experimentales de secado a las dos humedades (15,16% y 18,24% b.s.) y tres temperaturas utilizadas (20, 28 y 38ºC) fueron Page, Page modificado, Difusivo de tiempos cortos, Logarítmico, De dos términos, Aproximación difusional, Verma et al. (1985), y Midilli et al. (2002). En tanto los modelos de Lewis, Exponential de dos términos, Wang-Singh y Henderson-Pabis no resultaron ser apropiados y fueron descartados.

Sobre la base del análisis estadístico anterior y teniendo en cuenta que los modelos seleccionados deben no sólo describir correctamente la cinética de cebada cervecera variedad *Scarlett* sino que, a su vez, es deseable que sean de fácil aplicación práctica al momento de diseñar los equipos de secado, fundamentalmente cuando son incorporados en modelos de simulación, es que se decidió aconsejar la aplicación de los modelos de Page y Page Modificado. Adicionalmente, vista su adecuada calidad de ajuste y su fuerte basamento teórico, se seleccionó también el modelo Difusivo de tiempos cortos que permite tener una estimación de la difusividad de agua. En la **Tabla 2** se presentan los parámetros estadísticos de los modelos seleccionados.

## Determinación del coeficiente de difusión de agua en el grano

Se pudo observar que el rango de variación del coeficiente de difusión ($D_{ef}$) fue de $1{,}10x10^{-12}$ a $6{,}25x10^{-12}$ $m^2/s$ (**Tabla 2**). Gastón et al. (2003) han informado valores en el rango $2{,}953x10^{-11}$ a $6{,}687x10^{-11}$ $m^2/s$ y $3{,}336x10^{-11}$ a $7{,}772x10^{-11}$ $m^2/s$ para la difusividad de agua en granos de trigo modelados mediante geometrías elipsoidal y esférica, respectivamente. Tagawa et al. (2003) reportaron menores coeficientes de difusión, en el rango de $1{,}1x10^{-12}$ a $1{,}0x10^{-11}$ $m^2/s$ para trigo y $3{,}5x10^{-12}$ a $3{,}9$ $x10^{-11}$ $m^2/s$ para cebada, a temperaturas entre 10 y 50 °C, éstos últimos en un rango de coincidencia con los resultados del presente trabajo. Para otros materiales como lentejas y porotos, se han encontrado difusividades de agua relativamente más altas que las de los mencionados cereales (rangos $3{,}53x10^{-10}$ a $1{,}33x10^{-9}$ $m^2/s$ y $4{,}35x10^{-11}$ a $3{,}79x10^{-9}$ $m^2/s$, respectivamente) (Seyhan-Gurtas 2001).

Como se observa en la **Tabla 2**, los valores de los coeficientes de difusión presentaron diferencias importantes para las distintas condiciones experimentales. El análisis de varianza demostró influencia significativa de la temperatura de secado $F_{1;3;0,95}$=147,810 ($F_{tabla}$=10,128) (p=0,0012) y del contenido inicial de humedad $F_{1;3;0,95}$=17,620 ($F_{tabla}$=10,128) (p=0,0247) sobre $D_{ef}$. En vista de estos resultados se procedió a realizar una evaluación más minuciosa de la funcionalidad de la difusividad de agua.

**Tabla 2.** Parámetros de los modelos de Page, Page Modificado, Difusivo de tiempos cortos para cebada cervecera variedad Scarlett.

| **Modelo** | **$M_o$ (% b.s.)** | **Constante** | ***Temperatura de secado*** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **20ºC** | **28ºC** | **38ºC** |
| **Page** | 15,16 | k | 0,0217 (0,0002) | 0,0201 0,0003) | 0,0280 0,0007) |
| | | n | 0,4198 (0,0018) | 0,5102 0,0027) | 0,5017 (0,0052) |
| | 18,24 | k | 0,0201 (0,0005) | 0,0213 0,0004) | 0,0283 (0,0010) |
| | | n | 0,4696 (0,0044) | 0,5332 0,0035) | 0,5328 (0,0070) |
| **Page modificado** | 15,16 | k | 0,0072 (0,0002) | 0,0277 0,0004) | 0,0470 (0,0012) |
| | | n | 0,4375 (0,0034) | 0,5093 0,0028) | 0,5003 (0,0055) |
| | 18,24 | k | 0,0146 (0,0004) | 0,0441 0,0006) | 0,0747 (0,0019) |
| | | n | 0,4696 (0,0045) | 0,5332 0,0037) | 0,5328 (0,0073) |
| **Difusivo de tiempos cortos** | 15,16 | $D_{ef}$ | $1{,}10x10^{-12}$ ($9{,}88x10^{-23}$) | $2{,}62x10^{-12}$ ($3{,}62x10^{-23}$) | $4{,}53x10^{-12}$ ($7{,}60x10^{-23}$) |
| | 18,24 | $D_{ef}$ | $1{,}68x10^{-12}$ ($9{,}25x10^{-23}$) | $3{,}71x10^{-12}$ ($4{,}47x10^{-23}$) | $6{,}25x10^{-12}$ ($9{,}5x10^{-23}$) |

(Entre paréntesis se informan los errores de los parámetros).

## Correlación entre el coeficiente de difusión y la temperatura de secado

Se advirtió que un incremento en la temperatura aumentó el coeficiente de difusión ($D_{ef}$). Resultados similares han sido reportados por Zhengfu Wang (2007) en el secado de pulpa de manzana, Doymaz (2008) en el secado de fresas, por Pagano y Mascheroni (2004) para granos de amaranto, y Tironi et al. (2006) para el secado de granos de cártamo.

En la **Figura 3** se presenta el gráfico semi-logarítmico del coeficiente de difusión de humedad ($D_{ef}$) en función de la recíproca de la temperatura de secado absoluta ($T_a$) a diferentes contenidos de humedad inicial ($M_o$), donde los datos experimentales son puntos y las rectas de regresión exponencial son líneas. Se pudo observar que el logaritmo de la difusividad guarda una relación lineal inversa con la recíproca de la temperatura absoluta, por lo tanto $D_{ef}$ podría ser expresada a través de una ecuación tipo Arrhenius como la planteada en la Ec. (5).

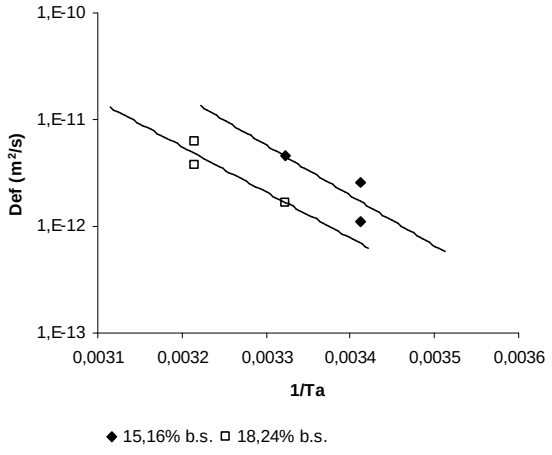


**Figura 3**. Relación del tipo Arrhenius entre la difusividad de humedad y la temperatura para el secado de cebada cervecera variedad Scarlett.

## Correlación entre el coeficiente de difusión y la humedad inicial del grano

En la **Figura 3** se pudo notar que las curvas para los distintos contenidos de humedad inicial fueron prácticamente paralelas, lo que indicaría que sólo el factor pre-exponencial se vería afectado por $M_o$. Ésto concuerda con lo informado por Pagano y Mascheroni (2004) para granos de amaranto y por Tironi et al. (2006) para granos de cártamo.

Se corroboró gráficamente que el coeficiente de difusión aumentó ante el incremento del contenido de humedad inicial ($M_o$). Coincidiendo con lo informado por Gastón et al (2004) para el secado de trigo a 64-75 ºC con humedades iniciales de 22,20% a 28,49% b.s. En la **Tabla 3** se muestran los valores de la energía de activación y factor pre-exponencial obtenidos por el ajuste de la Ec. (6) para cebada cervecera variedad Scarlett secada a temperaturas entre 20 y 38 °C partiendo de los dos contenidos de humedad inicial.

**Tabla 3.** Energía de activación y factor pre-exponencial del secado en capa delgada de cebada cervecera variedad Scarlett con distintos contenidos de humedad inicial secada a temperaturas entre 20 y 38°C.

| **Mo (% b.s.)** | **$D_o$ ($m^2$/s)** | **Ea (kJ/mol)** | **$R^2$** | **$R^2$ corr** | ***Sy*** | **MRD** | **Residuos** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 15,16 | 0,0022 | 51,6900 | 0,9955 | 0,9781 | $3{,}60 \times 10^{-13}$ | 0,1112 | random |
| 18,24 | 0,0010 | 48,8383 | 0,9963 | 0,9802 | $4{,}56 \times 10^{-13}$ | 0,0942 | random |

En la **Tabla 3** se puede observar que la energía de activación resulta algo menor (5,5%) cuanto mayor es el contenido de humedad inicial de los granos de cebada cervecera. Comportamiento similar fue informado por Gastón et al. (2004) para el secado de trigo a 64-75 ºC con humedades iniciales de 22,20, 25,28 y 28,49% b.s. No obstante, la diferencia entre las energías de activación es mínima (5,5%), en consecuencia, las líneas de la **Figura 3** serán consideradas con la misma pendiente equivalente a la energía de activación media.

En el mismo sentido $D_o$ es inversamente proporcional al contenido de humedad inicial $M_o$. Incorporándose el efecto del contenido de humedad inicial sobre el factor pre-exponencial, se aplicó la siguiente ecuación modificada de Arrhenius al conjunto completo de datos experimentales:

$$D_{ef} = \left[D_{o1} + D_{o2}\left(15{,}16 - M_o\right)\right]\exp\left(-\overline{E}a / R_g T_a\right) \qquad (8)$$

donde $\bar{E}a$=50,2641 kJ/mol fue el resultado del promedio de las energías de activación correspondientes a los ensayos a los distintos contenidos de humedad inicial (15,16% y 18,24% b.s.), y $R_g$=8,314 J/molºK.

Los valores de las constantes $D_{o1}$ y $D_{o2}$ obtenidos por regresión no lineal fueron respectivamente de 0,001264 y -0,0001624 ($R^2 \leq 99{,}59$; $R^2$ corr $\leq 98{,}10$; Sy $\leq 2{,}94 \times 10^{-13}$; MRD $\leq 0{,}1031$). Esta última ecuación generalizada permite predecir el coeficiente de difusividad de agua del grano de cebada variedad Scarlett para contenidos de humedad inicial en el rango 15-18% b.s. y temperaturas entre 20 y 38°C.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron datos experimentales de secado a baja temperatura (20-38°C) de cebada cervecera (*Hordeum distichum* L.) variedad Scarlett para humedades iniciales entre 15-18% b.s. y velocidades de aire de 0,8-1,5 m/s.

Bajo las condiciones experimentales del estudio el secado del grano se desarrolla en el período de velocidad de secado decreciente.

La cinética de secado es afectada significativamente por el tiempo de secado, por la temperatura de secado y el contenido de humedad inicial.

Los modelos logarítmico, de dos términos, aproximación difusional, Verma *et al*., Midilli et al., Page, Page modificado y difusivo de tiempos cortos predicen adecuadamente los resultados observados, siendo los tres últimos los más adecuados por su simplicidad práctica.

El coeficiente de difusión de agua está en el rango $1{,}10 \times 10^{-12}$ a $6{,}25 \times 10^{-12}$ $m^2$/s, aumenta con el incremento de la temperatura de secado y responde a una función exponencial de la temperatura, siendo la energía de activación de 50,2641 kJ/mol.

## RFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Afzal MT, Abe T. 2000. Simulation of moisture changes in barley during far infrared radiation drying. Computers and Electronics in Agriculture, 26: 137-145.

AGRIC. 2008. The Drying and Storage of Grain and Herbage Seeds, FAR, 1999. Disponible en http://www.agric.wa.gov.au. Última visita: 20/02/2008.

Akton Associates Incorporated. 1996. Akton Psychrometric Chart. Akton Associates Incorporated Engineering Software & Services, CA, USA.

AMBAINC. 2008. American Malting Barley Association, Inc. Institute for Barley and Malt Sciences, North Dakota State University Harvesting, Drying, and Storing Malting Barley. http://www.ambainc.org/pub/Production/Harvesting.pdf, 7 págs. Última visita: 25/02/2008.

AOCS. 1998. Official and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th edn., edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign Illinois, USA.

ASAE. 1999. ASAE Standards, Standards Engineering Practices Data, ASAE. St. Joseph, MI, USA.

Ayensu A. 1997. Dehydration of food crops using a solar dryer with convective heat flow. Solar Energy, 59: 121–126.

Becker HA. 1959. A study of diffusion of solids of arbitrary shape with application to the drying of the wheat kernel. Journal Applied Polymer Science, 1: 212-226.

Brooker DB, Bakker-Arkema F, Hall CW. 1992. Drying and Storage of Grains and Oilseeds. Van Nostrand Reinold, pag. 187-210.

Chen C, Wu PC. 2001. Thin layer drying model for rough rice with high moisture content. Journal of Agricultural Engineering Research, 80: 45–52.

Dandamrongrak R, Young G, Mason R. 2002. Evaluation of various pre-treatments for the dehydration of banana and selection of suitable drying models. Journal of Food Engineering, 95: 139–146.

Doymaz I. 2004. Drying kinetics of white mulberry. Journal of Food Engineering, 61: 341–346.

Doymaz I. 2004. Effect of drying treatment on air drying of plums. Journal of Food Engineering, 64: 465–470.

Doymaz I. 2008. Convective drying kinetics of strawberry. Chemical Engineering and Processing, 47: 914–919.

Ertekin C, Yaldiz O. 2004. Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model. Journal of Food Engineering, 63: 349–359.

Gaston AL, Abalone RM, Giner SA, Bruce DM. 2004. Effect of modelling assumptions on the effective water diffusivity in wheat. Biosystems Engineering, 88 (2): 175–185.

Gaston AL, Abalone RM, Giner SA. 2003. Geometry effect on water diffusivity estimation in PROINTA-Isla Verde and broom wheat cultivars. Lat. Am. Appl. Res., 33(3): 327-331.

Giner SA, Mascheroni RH. 2001. Diffusive drying kinetics in wheat, Part.1. Potential for a simplified analytical solution. Journal Agricultural Engineering, 80: 351–362.

Giner SA. 1999. Diseño de secadoras continúas de trigo. Simulación de la transferencia de calor y materia y de pérdidas de calidad. Tesis Doctoral. Departamento de Química e Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata.

Gupta RK, Das SK. 1997. Physical Properties of sunflower Seed. Journal Agricultural Engineering, 66: 1-8.

Kassem AS. 1998. Comparative studies on thin layer drying models for wheat. In: 13th International Congress on Agricultural Engineering, 2–6 February, Morocco, vol. 6.

Midilli A, Kucuk H, Yapar Z. 2002. A new model for single layer drying. Drying Technology, 20: 1503–1513.

Pagano AM, Mascheroni RH. 2004. Effective diffusion coefficient of amaranth grains. International Congress on Science and Tecnology of Foods "Córdoba 2004". November 24-26, Córdoba, Argentina.

Panchariya PC, Popovic D, Sharma AL. 2002. Thin layer modeling of black tea drying process. Journal of Food Engineering, 52: 349–357.

Rahman MS, Perera CO, Thebaud C. 1998. Desorption isotherm and heat pump drying kinetics of peas. Food Research International, 30: 485–491.

Seyhan-Gurtas F, Ak MM, Evranuz EO. 2001. Water diffusion coefficients of selected legumes grown in turkey as affected by temperature and variety. Turk Journal Agricultural For, © T†BÜTAK, 25: 297-304.

Sun DW, Woods J.L. 1994. Low temperature moisture transfer characteristics of barley: Thin-layer models and equilibrium isotherms. Journal Agricultural Engineering Research, 59: 273-283.

Tagawa A, Muramatsu Y, Nagasuna T, Yano A, Iimoto M, Murata S. 2003. Transactions of the ASAE 2003, 46(2): 361-366.

Tironi A, Crozza DE, Pagano AM. 2006. Influence of the drying conditions on the moisture diffusivity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. 15th International Drying Symposium (IDS 2006) Budapest, Hungary, 20-23 August 2006.

Verma LR, Bucklin RA, Endan JB, Wratten FT. 1985. Effects of drying air parameters on rice drying models. Transactions of the ASAE, 28: 296–301.

Wilkinson L. 1990. Systat: The System for Statistics, Systat, Inc., Evanston, IL, USA.

Zhengfu W, Sun J, Liao X, Chen F, Zhao G, Wu J, Hu X. 2007. Mathematical modeling on hot air drying of thin layer apple pomace. Food Research International, 40: 39–46.

# Parámetros de fluidización de soja cruda, remojada y cocida

# Fluidization parameters of raw, soaked and cooked soybeans

Torrez Irigoyen RM, Giner SA

(1) CIDCA, UNLP- CONICET, La Plata, Argentina.
(2) Área Departamental Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.
(3) Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires
ricardo_mart2@yahoo.com.ar, saginer@ing.unlp.edu.ar.

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros de fluidización con aire de soja cruda, remojada y cocida a efectos de delimitar un entorno de condiciones para el desarrollo de un proceso de secado/tostado en lecho fluidizado. Tal proceso conduce a un producto de soja crocante, listo para consumir, que no ha sido investigado. Se trabajó con soja variedad 5.5i provista por la empresa Don Mario Semillas. Se caracterizaron los tres materiales determinando su densidad y volumen de partícula por picnometría. La humedad se determinó mediante un método de grano entero, resultando de 9,94% en soja cruda, 58,08% para soja remojada, y 59,90% en soja cocida (peso en peso). Los tres productos se fluidizaron a temperatura ambiente en un equipo construido para este propósito. La altura del lecho fijo ($L_0$) fue de 0,10 m. Las densidades y porosidades de lecho fijo fueron: 744,66 kg/m$^3$ y 0,385 para soja cruda; 655,89 kg/m$^3$ y 0,399 soja remojada y 680,62 kg/m$^3$ y 0,367 para soja cocida. La velocidad superficial del aire ($V_0$) se midió con un anemómetro de hilo caliente y la diferencia de presión ($\Delta p$) del aire a través del lecho, con un micromanómetro digital. Se observó un comportamiento de fluidización de lechos de partículas grandes, con burbujas de gran tamaño y alto grado de mezclado. Graficando los valores de $\Delta p/L_0$ vs $V_0$, se observó, luego de la zona de lecho fijo, un comportamiento de transición entre éste y el de lecho fluidizado. Se ajustó una ecuación tipo Ergun a los datos de lecho fijo de cada producto para determinar los coeficientes laminar y turbulento, los que resultaron ser de 54,7 y 1,54 para soja seca, 64,31 y 0,85 en soja remojada, y 11,32 y 0,78 para soja cocida. A igual valor de $V_0$, los valores de $\Delta p$ fueron mayores en soja cruda que en soja remojada y cocida. Sin embargo, las menores densidades de partícula de estas últimas amortiguan en cierto modo la diferencia de velocidades de mínima fluidización ($V_{mf}$), que fueron calculadas por proyección de las respectivas ecuaciones tipo Ergun hasta el valor del peso del producto por unidad de sección transversal, resultando de 1,54 para soja cruda, 2,40 en soja remojada, y 2,31 m/s para soja cocida. Las velocidades de fluidización prácticas, determinadas en base a los gráficos de datos experimentales, fueron algo mayores, 1,6**,** 2,6 y 2,4 m/s, respectivamente**.** Conociendo la dependencia con la temperatura de la viscosidad y densidad del aire se estimó el efecto de la temperatura en la $V_{mf}$. Este resultó moderadamente importante: para un incremento de temperatura de 20 a 160 ºC, la $V_{mf}$ aumentó un 20% en promedio para los tres productos de soja.

Como conclusión, en este proceso, donde la soja cocida experimentará un cambio de tamaño y estructura hasta finalizar deshidratada y tostada, la velocidad de fluidización deberá reducirse gradualmente, de 2,7 a alrededor de 1,5 m/s, lo que requerirá control manual o automático, a efectos de ahorrar energía.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the fluidization parameters of raw, soaked and cooked soybeans in order to find a range of operating conditions to develop a crispy, ready-to-eat, dehydrated soybean product which was not investigated yet. The cultivar used was 5.5i, provided by Don Mario Semillas company. The three materials were characterized by determining its particle size and density using a pycnometer. Moisture was determined using a whole grain method, resulting in 9.94% w / w for raw soybeans, 58.08 % for soaked soybeans and 59.90% in the cooked material. All three products were fluidized at room temperature in a purpose- built equipment. The height of the fixed bed ($L_0$) was 0.10 m. Densities and porosities of the fixed bed were: 744.66 kg/m$^3$ and 0.385 for raw soybeans; 655.89 kg/m$^3$ and 0.399 for soaked soybeans and 680.62 kg/m3 and 0367 for cooked soybeans. Air

velocity ($V_0$) was measured with a hot wire anemometer, while the air pressure drop ($\Delta p$) through the bed, with a digital micromanometer. The observed fluidization behaviour corresponded to beds of large particles, with bubbles and high degree of mixing. By plotting of $\Delta p/L_0$ vs $V_0$ a transitional behavior was observed between the fixed and fluidized bed zones, which was more evident in soaked and cooked soybeans. An Ergun type equation was fitted to the fixed bed data of each product in order to determine the laminar and turbulent coefficients. These were 54.7 and 1.54, respectively, for dry soybeans, 64.31 and 0.85 in soaked soybeans and 11.32 and 0.78 for cooked soybeans. At equal $V_0$, the values of $\Delta p$ were higher in raw soybeans, than in soaked or cooked soybeans. However, the lower densities of the two last materials reduced the differences in minimum fluidization velocity ($V_{mf}$), calculated by extrapolating the predictions by the Ergun type equation up to the value of the product weight per unit cross section. These resulted of 1.54 m/s in raw soybeans, 2.40 m/s for soaked soybeans and 2.31 m/s in cooked soybeans. Practical fluidization velocities, determined on the basis of of experimental data, were somewhat higher, 1.6, 2.6 and 2.4 m/s, respectively. Knowing the temperature dependence of air viscosity and density of, the effect of temperature on the $V_{mf}$ was estimated. This was moderately important in all three products: by increasing air temperature from 20 to 160ºC, the $V_{mf}$ increased by an average of 20 % in the three soybean materials. In conclusion, for this fluidization process, where cooked soybeans will experience a structural change to finish dry and toasted, the fluidization velocity should have to be reduced gradually, from 2.7 to about 1.5 m/s, which will require manual or automatic control in order to save energy.

**PALABRAS CLAVE**: *soja, tostado, fluidizado, Ergun.*

**KEYWORDS**: *soybeans, toasted, fluidized, Ergun.*

## INTRODUCCIÓN

La soja (*Glycine max*) es una planta leguminosa que se destaca por su alto contenido de proteína y por su calidad nutritiva. Posee un 40% de proteína, 20% de lípidos (por lo que se considera oleaginosa), 25% de carbohidratos 5% de minerales y 10% de agua. El aceite está compuesto por triglicéridos y fosfolípidos (lecitina) que aportan ácidos grasos esenciales y fósforo, además de un bajo contenido de grasas saturadas, fitoesteroles y tocoferoles (vitamina E). Es fuente de vitaminas del complejo B, beta caroteno (provitamina-A), niacina, ácido pantoténico, ácido ascórbico (vitamina C) entre otros de acuerdo a lo informado en un documento realizado por el Consejo Nacional de Coordinación de Políticas Sociales (Presidencia de la Nación, 2003). La SAGPyA en su informe de producción de 2004, indicó que para la campaña 2003/2004, en Argentina la superficie ocupada con soja fue 14,5 millones de ha, con una producción de 31,5 millones de t. La producción se incrementó en la campaña 2004/2005 en la cual el cultivo de soja ocupó 14,7 millones de ha. Su producción se industrializa en más del 80% y es exportada casi en su totalidad representando un valor cercano a los 6200 millones de dólares (2003/2004), de acuerdo a lo especificado en el manual técnico elaborado por Bragachini y Casini (INTA-PRECOP, 2005). Debido a estos factores, la producción de soja ha crecido de manera notable en los últimos años, pasando de 12,6 millones de toneladas en el período 1996/97 a 40 millones en la campaña 2004/2005. En Argentina, la soja se seca artificialmente desde un contenido de humedad inicial de 16 a 17 % p/p a valores finales de 13 a 14 % p/p (b.h.) en los cuales se considera que alcanza la estabilidad durante el almacenamiento. Valores inferiores de humedad pueden causar desprendimiento de tegumento y la separación de los cotiledones, que resulta perjudicial si se piensa destinar esa soja a la exportación o a otro proceso posterior (Giner et al. 1994, de Dios 1996, Erickson 1995). Sin embargo, un proceso de secado demasiado rápido puede generar daño estructural, químico y biológico en el producto, por lo que la temperatura de aire en las secadoras no debería superar los 50-60 ºC. La presencia de compuestos como inhibidores de tripsina, hemaglutininas, lecitinas y saponinas en soja cruda o no “desactivada” limita la utilización de los nutrientes, resultando en un compromiso para la salud. La existencia de estos factores antinutricionales hace necesario someter al grano de soja a un tratamiento térmico de inactivación. En nuestro caso, el tratamiento previo de remojado más la cocción produce la inactivación de la soja y permite utilizar el proceso de secado/tostado para otorgarle estabilidad en el almacenamiento y una textura y sabor atractivos. La fluidización es una alternativa novedosa y promisoria para el secado/tostado. En la industria

alimentaria la fluidización se aplica con éxito en el secado de productos lácteos (Kitic y Viollaz, 1984).
Cuando un gas circula a través de un lecho granular estático, experimenta una pérdida de presión que depende de diversas variables de operación como: la velocidad del gas, el espesor del lecho y el tamaño y forma de las partículas. Escardino et al. (1970), experimentando con arroz, cebada, trigo y maíz, desarrollaron una correlación empírica entre la caída de presión que experimenta el aire al circular a través de lechos de granos o semillas y las variables de proceso. La fluidización permite lograr una temperatura de producto uniforme en el lecho, con elevados coeficientes de transferencia de masa y energía. Esto debería conducir a una calidad de producto final más controlable comparada con otros métodos de secado convencionales Prachayawarakorn et al. (2006), Soponronnarit et al. (2008) y Osella et al. (1997) consideran al procesamiento en lecho fluidizado como una técnica muy adecuada para el tratamiento térmico de soja.
La inclusión de soja en la dieta ha representado en otros países una mejora en la calidad de la alimentación, al sumarse a culturas alimentarias basadas en arroz o maíz. No es ésta la situación en Argentina donde la mayor parte del grano de soja se exporta como aceite vegetal, harina desgrasada proteica y, recientemente, biodiesel. Si a esto se le suma el escaso hábito de consumo de legumbres enteras en Argentina, se comprende que la incorporación de la soja en la dieta requiere de un gran esfuerzo. Los únicos datos representativos referidos a la ingesta de legumbres en nuestra población se remiten a la Encuesta Nacional de Gasto e Ingreso de Hogares del INDEC en 1996-97; que indicaban un consumo estimado entre 2 o 3 porciones mensuales por unidad consumidora. Por lo tanto existe una gran oportunidad para incorporar la soja a la dieta, a través de un producto de mayor valor agregado exportable. Es importante indicar que no se ha encontrado bibliografía datos sobre fluidización de soja remojada y cocida, que es esencial para desarrollar un producto snack deshidratado/tostado con textura crocante listo para consumir. El producto se realizará en base a soja remojado o cocida. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue determinar los parámetros de fluidización con aire de soja cruda, remojada y cocida con el fin de obtener un entorno de condiciones operativas para el desarrollo del producto final.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con soja variedad 5.5i provista por la empresa Don Mario Semillas (Chacabuco, Provincia de Buenos Aires). Su humedad original fue de 9,94% p/p.

### Caracterización del grano

Se caracterizaron los tres tipos de muestra: soja seca (SS), soja remojada (SR) y soja cocida (SC). Se determinaron densidad y volumen de partícula por picnometría. El diámetro equivalente se calculó a partir del volumen de grano. Para el cálculo de la densidad de partícula ($\rho_P$), se introdujo una muestra de 50 g en un matraz de 250 ml ($V_{MZ}$), se lo llevó a aforo con agua destilada, y, conociendo el número de granos presentes ($N_{TP}$), la masa de los mismos ($m_{TP}$) y la densidad del agua empleada ($\rho_{H20}$), se calculó el volumen del agua primero:

$$\rho_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{V_{H_2O}} \Rightarrow V^0{}_{H_2O} \approx \frac{m_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} \qquad (1)$$

por diferencia entre el volumen del matraz a aforo=$V^0{}_{H20}$ y el de agua ($V_{H20}$) que completa el volumen del matraz cargado con una masa $m_{TP}$ de partículas, se obtiene el volumen total de partículas ($V_{TP}$):

$$V_{TP} = \left(V^0{}_{H_20} - V_{H_2O}\right) \qquad (2)$$

dado que la masa total de partículas es conocida, se calcula la densidad de partícula:

$$\rho_p = \frac{m_{TP}}{V_{TP}} \qquad (3)$$

Por su parte, el volumen de partícula ($V_P$) se calcula como sigue:

$$V_P = \frac{V_{TP}}{N_{TP}} \tag{4}$$

Conociendo este valor, y teniendo en cuenta que la soja tiene forma redondeada, se puede calcular el diámetro equivalente esférico de la partícula $D_e$ (diámetro de una esfera del mismo volumen que la partícula):

$$D_e = \left(\frac{6V_P}{\pi}\right)^{1/3} \tag{5}$$

Al asumir geometría esférica, el diámetro equivalente coincide con el diámetro efectivo ($D_p$) que es el utilizado en la Ec. tipo Ergun y corresponde al diámetro de una esfera de igual área por unidad de volumen que la partícula. Para la determinación de humedad, se compararon dos métodos de grano entero para oleaginosas, uno perteneciente al ASABE (American Association of Agricultural and Biological Engineers) (103 °C, 72 h) y el otro al SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agroalimentaria), Argentina (130 °C, 3 h). No se encontraron diferencias prácticas entre los mismos por lo que se decidió emplear el método más rápido. Con este fin, se utilizó una estufa de convección forzada (velocidad de aire de 0,25 m/s) y control automático digital. Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados obtenidos se expresaron como kg de agua por kg de materia seca (kg $H_2O$/kg MS).

## Acondicionamiento de las muestras

La soja se sometió a una limpieza manual para remover el escaso material extraño o fino que poseían las muestras. Para obtener la soja remojada, se lavó la soja cruda con agua caliente dos veces, posteriormente se puso en remojo en agua por 24 h en cámara de 10 ºC, utilizando una relación másica de agua a soja de 2:1. Para la obtención de soja cocida, se lleva agua potable a ebullición, se le agrega la soja remojada, y se cuentan 40 minutos a partir del momento en que el sistema recupera el hervor.

Las sojas remojada y cocida, cuyas humedades eran de 58,08 y 59,90 % se pre-secaron en estufa de convección forzada a 50 ºC hasta una humedad del 57 %, a efectos de eliminar la humedad superficial y facilitar su fluidización.

A continuación, en la **Figura 1**, podemos apreciar las fotografías de la soja cruda, remojada y cocida antes de ser sometidas al pre-secado, y posterior fluidizado. A partir de ellas podemos apreciar la diferencia de tamaño y forma que existe entre el estado inicial del producto y el obtenido después del remojo y la cocción.

1a, Soja seca 1b, Soja remojada

1c, Soja cocida

**Figura 1.** Fotografías de Soja Cruda, Remojada y Cocida.

## Fluidización

Los tres productos se fluidizaron a temperatura ambiente en un equipo construido para este propósito. La cámara de secado tiene un diámetro de 0,10 m y una altura de 0,30 m. La altura del lecho fijo ($L_0$) fue de 0,10 m. La **Figura 2** muestra un esquema del equipo.

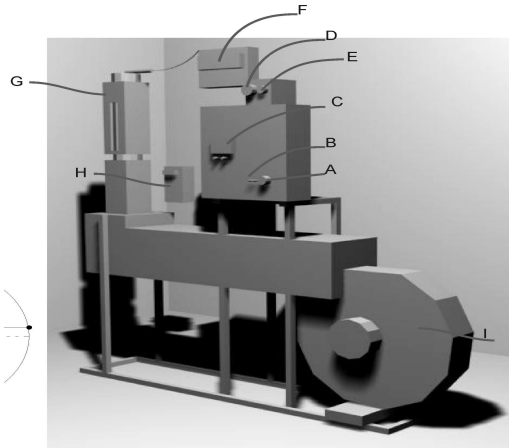


**Figura 2**. Diagrama del equipo de secado en lecho fluidizado. Equipo de Fluidización: A-Botón de encendido, B-Controladores de resistencias, C-Visor digital, D- Encendido de ventilador, E- Regulador de velocidad, F-Anemómetro, G-Cámara de fluidización, H- Manómetro digital, I- Ventilador.

Las densidades ($\rho_{L0}$) y porosidades de lecho fijo ($\varepsilon_0$) se determinaron para los tres materiales. La densidad de lecho fijo ($\rho_{L0}$) se calculó conociendo la masa de sólidos en el lecho, la altura de lecho fijo y la sección transversal. Una vez conocida ésta la se calculó la porosidad de lecho fijo haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\varepsilon_0 = 1 - \frac{\rho_{L0}}{\rho_P} \qquad (6)$$

La velocidad del aire ($V_0$) se midió con un anemómetro de hilo caliente TSI Mod.1650 y las diferencias de presión ($\Delta p$) del aire a través del lecho, con un micromanómetro TESTO 525 (Rango de medición, 25 milibar, error, 0,2% de fondo de escala), todas las experiencias se realizaron por triplicado.
Los valores reportados en las tablas incluyen el valor medio y su correspondiente desviación estándar.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Caracterización del grano

Las características de los tres materiales de soja empleados en la experiencia se detallan a continuación en la **Tabla 1**. Es evidente que la gran absorción de agua incrementa el diámetro equivalente de la soja remojada y cocida. La porosidad no varía con claridad y la densidad de partícula disminuye debido a la mayor presencia de agua.

**Tabla 1**. Características de lo granos de soja seca, remojada y cocida.

| **Parámetros** | **Soja Seca** | **Soja Remojada** | **Soja Cocida** |
|---|---|---|---|
| Humedad, $kgH_2O/kgMS$ | 0,110 ± 0.001 | 1,450 ± 0.040 | 1,494 ± 0.016 |
| Densidad, $kg/m^3$ | $1{,}21 \times 10^3 \pm 5.91$ | $1{,}09 \times 10^3 \pm 1.93$ | $1{,}08 \times 10^3 \pm 6.25$ |
| Volumen, $m^3$ | $1{,}60 \times 10^{-7} \pm 2.04 \times 10^{-9}$ | $3{,}09 \times 10^{-7} \pm 2.41 \times 10^{-9}$ | $3{,}72 \times 10^{-7} \pm 1.07 \times 10^{-8}$ |
| Diámetro, m | $6{,}74 \times 10^{-3} \pm 2.85 \times 10^{-5}$ | $8{,}38 \times 10^{-3} \pm 1.91 \times 10^{-5}$ | $8{,}92 \times 10^{-3} \pm 8.53 \times 10^{-5}$ |

$\bar{X} \pm S$

## Determinación de parámetros de lecho fijo

La porosidad ($\varepsilon_0$) y densidad de lecho fijo ($\rho_{L0}$) se informan en la **Tabla 2**. Como se puede apreciar, la densidad de lecho fijo disminuye al aumentar el contenido de humedad, esto se debe al incremento de volumen de las partículas por la absorción de agua. Sin embargo, dada la variación comparable en densidad de partícula y lecho, la porosidad no cambia en forma clara.

**Tabla 2**. Parámetros de lecho fijo.

| Parámetros | Soja Seca | Soja Remojada | Soja Cocida |
|---|---|---|---|
| $\rho_{L0}$, kg/m$^3$ | 744,66 ± 0.40 | 655,89 ± 0.09 | 680,62 ± 0.60 |
| $\varepsilon_0$ | 0,385 ± 0.003 | 0,399 ± 0.001 | 0,367 ± 0.004 |

—X ± S

## Determinación de los parámetros de la ecuación tipo Ergun

Se graficaron los valores de $\Delta p/L_0$ vs $V_0$, y se observó el comportamiento en cada uno de los tres casos. La ecuación tipo Ergun (Ergun 1952) se ajustó a los valores experimentales de la zona de lecho fijo:

$$\frac{\Delta p}{L_0} = K_1 \frac{(1-\varepsilon_0)^2 \mu_a}{\varepsilon_0^{\,3} D_p^{\,2}} V_0 + K_2 \frac{(1-\varepsilon_0)\rho_a}{\varepsilon_0^{\,3} D_p} V_0^2 \qquad (7)$$

Para resolver el sistema mediante regresión lineal, lo que facilita la identificación del comportamiento en lecho fijo, se divide la ecuación (7) por $(1-\varepsilon_0)V_0$ y se la reordena quedando de la siguiente forma:

$$\frac{\Delta p}{L_0(1-\varepsilon_0)V_0} = K_1 \frac{(1-\varepsilon_0)\mu_a}{D_P^2 \varepsilon_0^3} + K_2 \frac{\rho_a}{D_P \varepsilon_0^3} V_0 \qquad (8)$$

donde $\Delta p$ es caída de presión a través del lecho, Pa; $L_o$, el espesor del lecho fijo, m; $\varepsilon_o$, porosidad de lecho fijo; $D_p$, diámetro de la partícula, m; $\mu_a$, viscosidad del fluido, kg/m.s; $V_o$: velocidad superficial del aire, m/s; $K_1$, coeficiente laminar de la ec. (8), mientras que $K_2$ es el coeficiente turbulento.
Ergun trabajó con partículas pequeñas de origen inorgánico y encontró $K_1$=150 y $K_2$=1.75. Sin embargo, tales valores en realidad dependen de las características del producto.
Con los valores experimentales de $\Delta p/L_0$ vs $V_0$ obtenidos en cada producto se determinaron las constantes $K_1$ y $K_2$, de la ecuación tipo Ergun por ajuste de la ec. (8), utilizando el método de cuadrados mínimos en una planilla Excel.
La velocidad experimental se corrigió multiplicando la misma por $f_w$, definido como factor de Coulson, que tiene en cuenta el efecto de pared del recipiente (Calvelo 1975).

$$f_W = \frac{1}{\left[1 + \frac{\left(\frac{4}{D}\right)}{2\left(\frac{6}{D_e}\right)}\right]^2} \qquad (9)$$

donde el D representa el diámetro de la cámara de fluidización. Los valores de $f_w$ para soja seca, remojada y cocida fueron, 0,956, 0,946 y 0,943, respectivamente.
Como se mencionó anteriormente, el valor de los coeficientes laminar y turbulento es función de las características del producto como por ejemplo la forma y la rugosidad. La forma de los granos influye sobre la orientación de los mismos al formar el lecho y afecta a la sinuosidad e irregularidad de los canales. La rugosidad de los granos influye sobre la caída de presión del aire al circular a través del lecho de grano por dos razones: 1) un aumento de rugosidad en las paredes de los canales involucra un

aumento de Δp, 2) el aumento de rugosidad afecta a la superficie especifica de los granos y por tanto al $D_P$. Escardino et al. (1970) trabajando en diversos productos como arroz cáscara, arroz elaborado, cebada, trigo y maíz, informó valores de 242 a 867 para el coeficiente laminar y de 3,17 a 6,54 para el turbulento, muy superiores a los obtenidos por Ergun, lo cual se corresponde con la elevada rugosidad presentada por estos productos. De acuerdo a lo establecido anteriormente, los menores valores para $K_1$ y $K_2$ reportados en este trabajo, se deben probablemente a la escasa rugosidad del tegumento de los granos de soja, en especial cuando están remojados y cocidos.
En la **Figura 3a**, **3b** y **3c** se ponen de manifiesto los valores experimentales obtenidos de $\Delta p/L_0$ vs $V_0$ y la ecuación tipo Ergun modificada de acuerdo a los parámetros obtenidos anteriormente. Como puede observarse en todos los casos existe una mejor predicción en condiciones de lecho fijo, a bajas velocidades**.** En la **Figura 3d**, se observa lo predicho a lo largo de todo el proceso, en el rango completo de velocidades. A partir de estos gráficos se puede concluir que, a igual valor de $V_0$, los valores de Δp fueron mayores en soja cruda que en soja remojada y cocida.

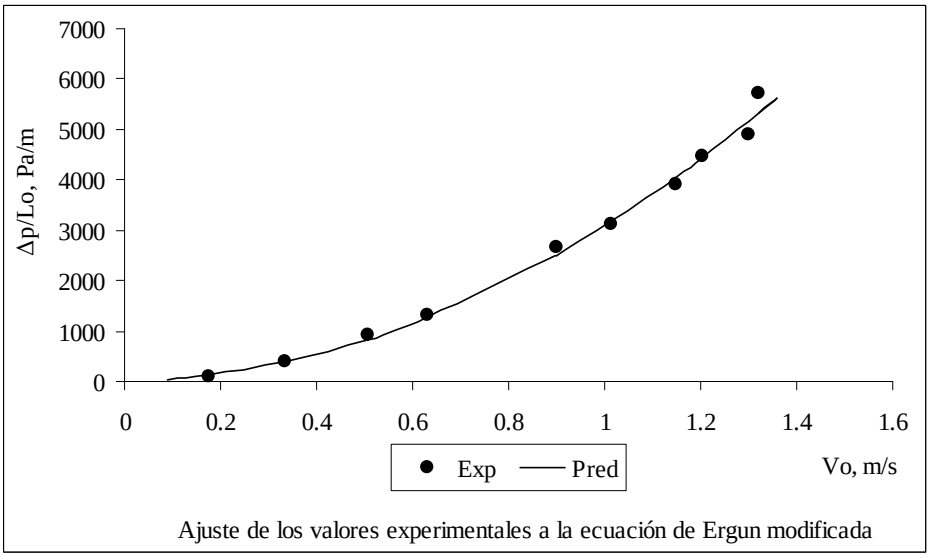


**Figura 3a**. Soja seca.

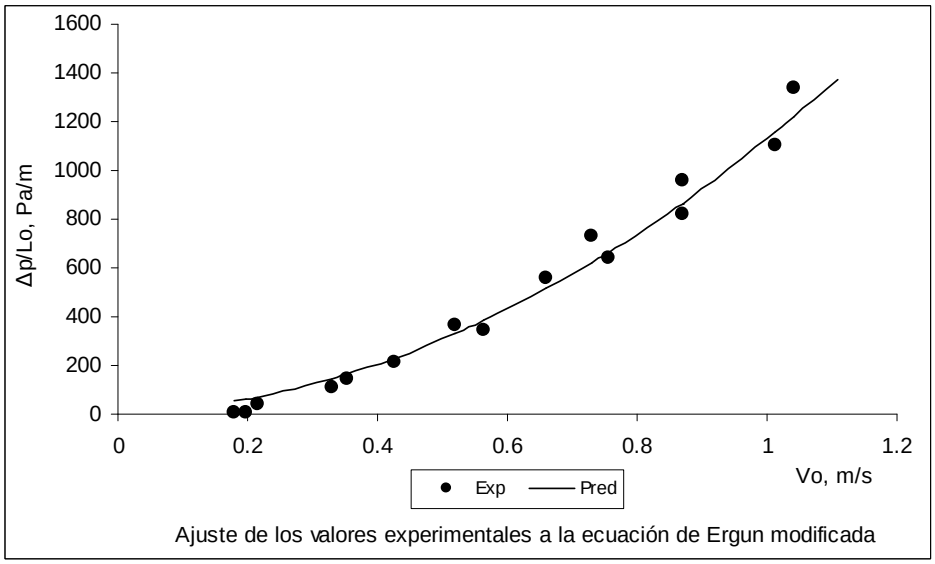


**Figura 3b**. Soja remojada.

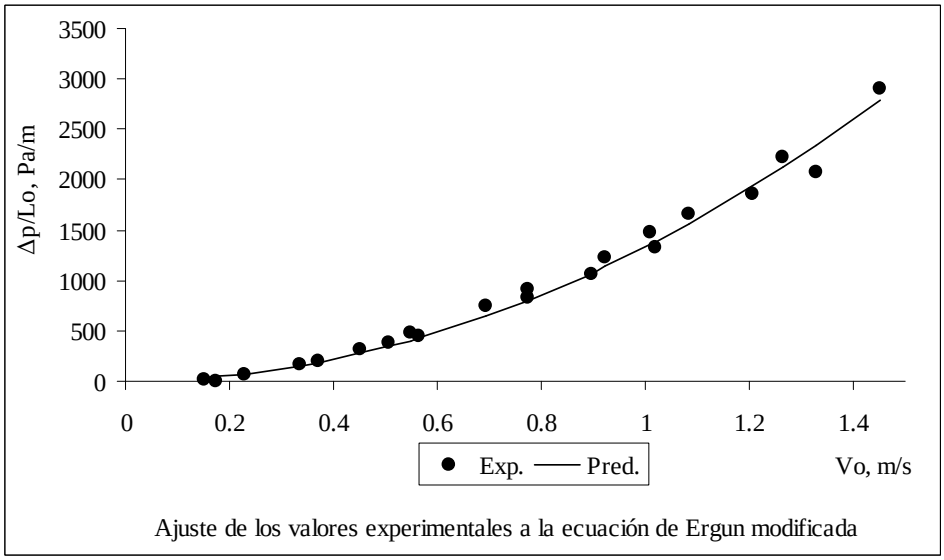


**Figura 3c**. Soja cocida.

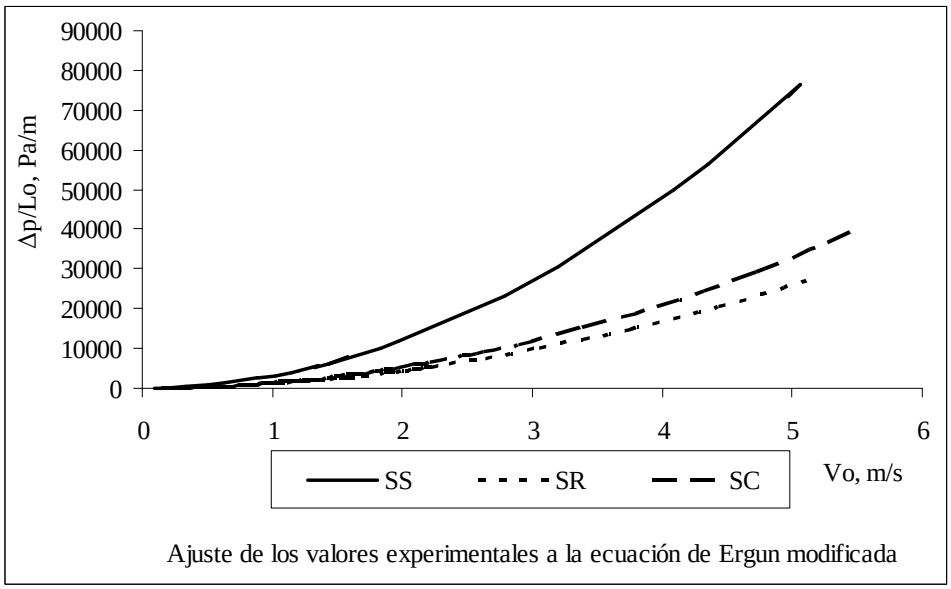


**Figura 3d**. Experiencia completa.

## Determinación de la $V_{mf}$

Con los valores de $K_1$ y $K_2$ obtenidos, se utilizó la ec. (7) (forma cuadrática clásica de Ergun). La velocidad $V_{mf}$ se alcanza cuando la pérdida de carga Δp (multiplicada por la sección transversal) iguala el peso del producto en el fluido. Con este fin el peso neto de las partículas en el lecho se obtiene de la diferencia entre el peso de éstas y el empuje del fluido:

$$\Delta p\ S = (\rho_P - \rho_a) g (1 - \varepsilon_{mf}) S L_0 \tag{10}$$

El lecho de partículas empieza a fluidizar cuando la pérdida de carga multiplicada por la sección transversal iguala el peso. Aproximando $\varepsilon_{mf} \approx \varepsilon_0$, dividiendo ambos miembros por $SL_0(1-\varepsilon_0)$, y haciendo las simplificaciones correspondientes, se obtiene

$$\frac{\Delta p S}{S L_0 (1 - \varepsilon_0)} = \frac{(\rho_P - \rho_a) g (1 - \varepsilon_0) S L_0}{S (1 - \varepsilon_0) L_0} = (\rho_P - \rho_a) g \tag{11}$$

si en el miembro izquierdo reemplazamos la ec. (7) para el cociente $\Delta p / L_0$ se llega a una ecuación cuadrática

$$K_2 \frac{\rho_a}{D_P \varepsilon_0^3} V_{mf}^2 + K_1 \frac{(1-\varepsilon_0)\mu_a}{D_P^2 \varepsilon_0^3} V_{mf} - (\rho_P - \rho_a) g = 0 \qquad (12)$$

donde $V_{mf}$: velocidad de mínima fluidización, m/s; $\rho_a$, densidad de fluido, kg/m$^3$; $\rho_P$, densidad de partícula, kg/m$^3$; g, constante de aceleración de la gravedad, 9,81 m/s.
Las menores densidades de partícula de la soja remojada y cocida respecto de aquella de la soja seca determinaron que las diferencias entre velocidades de mínima fluidización no fueran considerables. Los valores de $V_{mf}$ resultaron 1,58, 2,53 y 2,43 m/s respectivamente. La fluidización observada se corresponde con la de lechos de partículas grandes, con burbujas de gran tamaño y alto grado de mezclado.
Los valores de velocidad de mínima de fluidización encontrados, para soja seca se encuentran dentro del rango informado en diversos trabajos por Soponronnarit et al. (2001), Kundu et al. (2001) y Taechapairoj et al. (2002). Los valores de los coeficientes así como también los valores de las $V_{mf}$ se detallan a continuación en la **Tabla 3.**

**Tabla 3**. Determinación de constantes de la ecuación tipo Ergun y la $V_{mf}$.

| **Variedad de soja** | **$K_1$** | **$K_2$** | **$V_{mf}$ [m/s]** |
|---|---|---|---|
| **Seca** | 54,70 ± 2.40 | 1,54 ± 0.14 | 1,58 ± 0,07 |
| **Remojada** | 64,31 ± 7,45 | 0,85 ± 0,15 | 2,53 ± 0,37 |
| **Cocida** | 11,32 ± 4.06 | 0,78 ± 0,32 | 2,43 ± 0.49 |

$\bar{X} \pm S$

En la **Figura 4**, se pueden apreciar los valores experimentales $\Delta p/L_0$ vs $V_0$ para los tres tipos de soja, durante todo el proceso. Es evidente la diferencia que existe entre la soja cruda, y la soja remojada y cocida, este fenómeno probablemente se debe al efecto que ejerce el incremento del diámetro y volumen de partícula. Al tener una mayor densidad, pero un menor volumen y diámetro de partícula la soja cruda alcanzó valores elevados de $\Delta p/L_0$ en lecho fijo, con respecto a los de la soja remojada y la soja cocida. Por esta razón, y a pesar de sus menores densidades de partícula, los valores de $V_{mf}$ aumentaron en soja remojada y cocida.

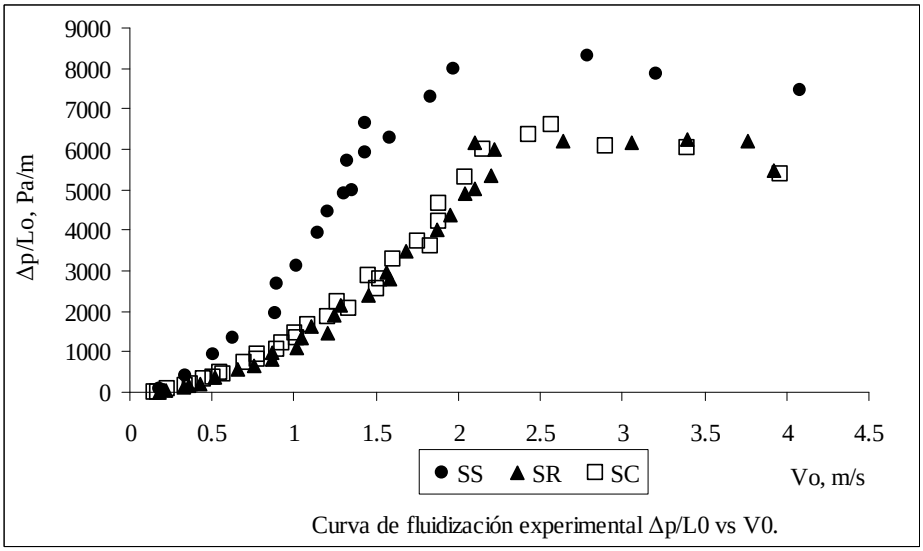


**Figura 4**. Curvas de Fluidización experimental.

**Efecto de la temperatura en la $V_{mf}$.**

Finalmente, el efecto de la temperatura en la velocidad de mínima fluidización se puede estimar con la ecuación tipo Ergun (Ec. 16) en base al conocimiento de la dependencia de la densidad y viscosidad del aire con la temperatura :

$$\rho_a = \frac{pPM}{RT_k} \tag{13}$$

$$\mu_a = 1.735x10^{-5} + 4.318x10^{-8} T_C \tag{14}$$

$$K_2 \frac{\left(\frac{pPM}{RT_k}\right)}{D_P \varepsilon_{mf}^3} V_{mf}^2 + K_1 \frac{(1-\varepsilon_{mf})\left(1.735x10^{-5} + 4.318x10^{-8} T_C\right) V_{mf}}{D_P^2 \varepsilon_{mf}^3} - \left(\rho_P - \left(\frac{pPM}{RT_k}\right)\right) g = 0 \tag{15}$$

$$V_{mf} = \frac{-\left(K_1 \frac{(1-\varepsilon_{mf})\left(1.735x10^{-5} + 4.318x10^{-8} T_C\right)}{D_P^2 \varepsilon_{mf}^{\ 3}}\right) + \sqrt{\left(K_1 \frac{(1-\varepsilon_{mf})\left(1.735x10^{-5} + 4.318x10^{-8} T_C\right)}{D_P^2 \varepsilon_{mf}^{\ 3}}\right)^2 - \left(4 \left(K_2 \frac{\frac{pPM}{RT_k}}{D_P \varepsilon_{mf}^3}\right)(\rho_P - \rho_a) g\right)}}{2\left(K_2 \frac{\frac{pPM}{RT_k}}{D_P \varepsilon_{mf}^3}\right)} \tag{16}$$

donde p: es la presión en Pa; PM, peso molecular del aire, 29 kg/kmol; R, constante de los gases, 8314 J/kmol K; $T_k$, temperatura en grados Kelvin, °K; $T_C$, temperatura, °C.

A partir de dicha relación, se evaluó la influencia de la temperatura en las $V_{mf}$ de los tres materiales, en un rango de temperaturas de 20 a 160 °C, como se puede visualizar en el **Figura 5**.

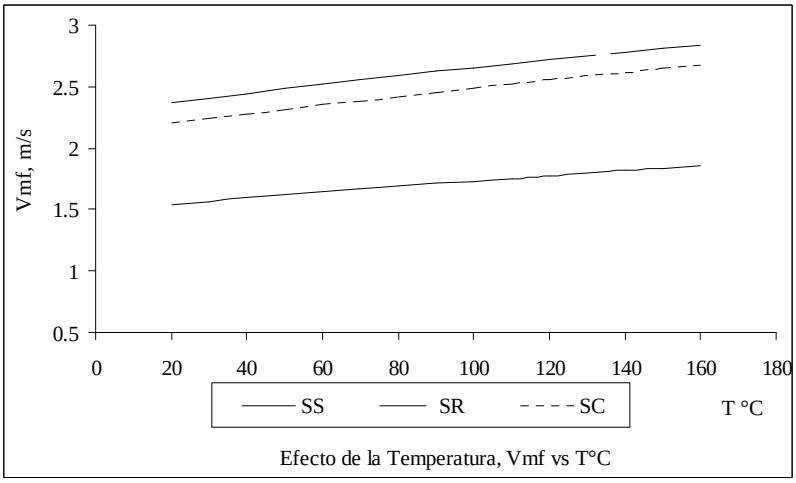


**Figura 5**. Efecto de la temperatura Vmf vs T°C.

Los resultados teóricos muestran que a medida que se incrementa la temperatura la velocidad de mínima fluidización aumenta, encontrando para la soja seca, remojada y cocida a 160 ºC valores de 1,85, 2,89 y 2,67 m/s respectivamente, lo que implica un incremento promedio de 20% con respecto a los valores determinados a 20 °C.

Los gráficos aquí presentados son muy útiles para conocer las características de la fluidización de estos tres productos, sobre todo en los casos donde no es posible la observación directa del lecho. Esto permitirá conocer las velocidades operativas del lecho fluidizado, y, asimismo, facilitará la selección del ventilador del equipo y su costo.

## CONCLUSIÓN

A igual valor de $V_0$, los valores de $\Delta p$ en lecho fijo fueron mayores en soja cruda que en soja remojada y cocida. Sin embargo, las menores densidades de partícula de estas últimas amortiguan en cierto modo la diferencia de velocidades de mínima fluidización ($V_{mf}$), de 1,58 para soja seca, 2,53 en soja cocida y 2,43 m/s en soja remojada.

Los coeficientes laminar y turbulento de la ecuación tipo-Ergun fueron de 54,7 y 1,54, respectivamente para la soja seca, de 64,31 y 0,85 en soja remojada y de 11,32 y 0,78 en soja cocida. Tales valores fueron menores que los coeficientes originales de la ecuación de Ergun (150 y 1,75), posiblemente por la escasa rugosidad del delicado tegumento de los granos de soja, especialmente cuando están remojados o cocidos.

La velocidad de mínima fluidización se incrementa aproximadamente un 20% entre 20 y 160 ºC. Por tanto, al pasar de grano remojado y cocido al tostado seco a elevadas temperaturas, la $V_{mf}$ deberá reducirse gradualmente, de 2,9 a alrededor de 1,8 m/s, lo que requerirá control manual o automático, a efectos de ahorrar energía.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Calvelo A. 1975. Fluidodinamica. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Curso de Reducción. Instituto Argentino de Siderurgia, Buenos Aires.

Consejo Nacional de Coordinación de Políticas Sociales. Consideraciones sobre la soja en la alimentación, Febrero 2003 Website:

http://www.a-campo.com.ar/espanol/el_tema/DocumentofinalSOJApoliticassociales.pdf 23/4/09.

De Dios CA. 1996. Secado de granos y secadoras. FAO Santiago, Chile 1996. Web site: http://www.fao.org/docrep/ X5028S/X5028S0E.HTM. 23/04 /09.

Ergun S. 1952. Fluid Flow through Packed Columns. Chemical Engineering Progress, 48: 89-94.

Erickson D R. 1995. Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization. St. Louis, Missouri. pag 9.

Escardino A, Ruiz F, Barbero P. 1974. Circulación de aire a través de lechos formados por granos de cereales. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 10: 528-539.

Giner SA, Borrás F, Robutti JL, Añon MC. 1994. Drying rates of 25 argentinian varieties of soybeans: A comparative study. LWT Food Science and Technology, 27: 308-313.

Kitic D, Viollaz PE. 1984. Comparison of drying kinetics of soybeans in thin layer and fluidized beds. Journal of Food Technology 19, 399-408.

Kundu KM, Datta AB, Chatterjee PK. 2001. Drying of Oilseeds. Drying Technology, 19 (2): 343-358.

Osella CA, Gordo NA, González RJ, Tosi E, Ré E. 1997. Soybean Heat-treated using a Fluidized Bed. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 30: 676-680.

Prachayawarakorn S, Prachayawasin P, Soponronnarit S. 2006. Heating process of soybeans using hot-air and superheated-steam fluidized-bed dryers. LWT Swiss Society of Food Science and Technology, 39: 770-778.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Web site: http://www.sagpya.mecon.gov.ar/. 23/04/09.

Soja. Eficiencia de Cosecha y Postcosecha. INTA-PRECOP, Manual Técnico No3. Editores Ing.Agr.Mario Bragachini, Ing.Agr.Cristiano Casini. ISSN 1667-9199. Web site: http://www.cosechaypostcosecha.org/data/pdfs/soja2005.asp; 23/04/09.

Soponronnarit S, Swasdisevi T, Wetchacama S, Wutiwiwatchai W. 2008. Fluidised bed drying of soybeans. Journal of Stored Products Research, 30 (2): 133-151.

Taechapairoj C, Dhuchakallaya I, Soponronnarit S, Wetchacama S, Prachayawarakorn S. 2003. Superheated steam fluidised bed paddy drying. Journal of Food Engineering, 58: 67-73.

# Modificaciones de la capacidad antioxidante y quelante en extractos de moras, obtenidos por diferentes tratamientos térmicos

# Modifications on antioxidant and quelant capacity in black mulberries extracts obtained by different heat treatments

Tosi E, Masciarelli R, Lucero H, Silvester S, Bonfigli M

Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de Alimentos
Universidad Tecnológica Nacional- Facultad Regional Rosario.
E. Zeballos 1341-S2000BQA-Rosario-Argentina
mascia@netcoop.com.ar

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar diferentes tratamientos térmicos para deshidratar moras, a los efectos de evaluar la capacidad antioxidante de la harinas obtenidas a través del efecto capturador de radicales libres y la capacidad quelante del ion ferroso partiendo de la variedad *Morus Nigra L.* Las moras se deshidrataron hasta alcanzar una humedad final entre el 10 y el 12% mediante los siguientes tratamientos: secado a temperatura ambiente (control); estufa con recirculación de aire a 60 ºC; estufa con recirculación de aire a 110 ºC y horno a microondas. Se obtuvo un extracto metanólico de concentraciones entre 0,5 y 50 mg de muestra seca (ms)/mL de solvente. En el tratamiento a 60 ºC, el efecto capturador de radicales libres superó el 90% a partir de concentraciones de extracto de 7,5 mg/mL. Para concentraciones entre 20 y 50 mg/mL los valores obtenidos a 60 ºC y 110 ºC se mantuvieron constantes y similares al control, entre 94,1 y 96,4%. Para microondas se obtuvieron valores de 94,9% para concentraciones de 50 mg/mL. En la capacidad quelante del ión ferroso, el control alcanzó valores de 51,5% para la concentración de extracto de 30 mg/mL y siguió creciendo hasta alcanzar un valor de 70,7% para la concentración de 50 mg/mL. En los tratamientos a 110 ºC y microondas se alcanzaron valores cercanos al 37%, los cuales se mantuvieron prácticamente constantes a partir de la concentración de 25 mg/mL. Para el tratamiento a 60 ºC la capacidad quelante del ión ferroso aumentó en todo el rango de concentraciones hasta alcanzar un valor de 32,1% a los 50 mg/mL

## ABSTRACT

The aim of the present research work was to develop different thermal treatments to dehydrate black mulberries, in order to assess the antioxidant capability of the flour obtained by means of free radical scavenging effect and the ferrous ion chelating capacity from *Morus Nigra L.* variety. Black mulberries were dehydrated up to final moisture between 10 and 12 % by means of the following treatments: drying at room temperature (control), in dry oven at 60 ºC with air recirculation, in dry oven at 110 ºC with air recirculation and microwave. Methanolic extracts with concentrations between 0.5 and 50 mg were obtained from the solvent dry sample (ms)/mL. The free radical scavenging effect exceeded 90 % in the 60º C treatment from 7.5 mg/mL extract concentration. Values obtained at 60º C and 110º C in 20 and 50 mg/mL concentrations were constant and similar to the control ones (94.1 and 96.4%). Values in microwave treatment were 94.9% for 50 mg/mL concentrations. The control in the ferrous ion chelating capacity reached values of 53.1% for 30mg/mL extract concentration and continued increasing up to 70.7% value for 50mg/mL concentration. Treatments at 110º C and microwave reached to values close to 37%. These were kept practically constant from the 25 mg/mL concentration. The ferrous ion chelating capacity in treatment at 60º C increased to a 30mg/mL concentration and kept that value up to the 50mg/mL concentration.

**PALABRAS CLAVE**: *Antioxidantes - capacidad quelante – mora deshidratada.*

**KEYWORDS**: *Antioxidant - quelant capacity - dehydrated black mulberry.*

## INTRODUCCIÓN

Estudios epidemiológicos han demostrado el efecto protectivo de vegetales y frutas contra el cáncer y afecciones cardiacas (Block et al.1992, Hertog et al.1993) los cuales pueden relacionarse con los antioxidantes presentes en dichos alimentos. El interés se ha centrado en su capacidad antioxidante, antimutagénica y secuestrante de radicales libres. Uno de los mecanismos es proveer átomos de hidrogeno a los radicales libres y detener la reacción en cadena (Benzei 2000) y la otra es la de sus propiedades quelantes de metales de transición.

Los radicales libres producidos provocan efectos perniciosos para la salud, dañando membranas celulares, inactivando enzimas, alterarando el núcleo celular, oxidando lipoproteínas, (Vicario-Romero 1997); atacando proteínas, modificando su estructura o función (Jacob 1995).

El mecanismo de acción de los polifenoles está vinculado a su capacidad para donar átomos de hidrógeno y a su acción quelante de iones metálicos (Bravo 1998).

Existen pocos datos sobre la ingesta recomendable de fitoquímicos, Toivo et al. (1998) estiman una ingesta per cápita de 160-360 mg/día en Estados Unidos, mientras que Bryngelson et al. (1997), proponen 80 mg/día en Suecia, a partir de cereales. Por otra parte es importante la adecuada proporción de antioxidantes, pues cuando se encuentran en exceso en nuestro organismo, su acción se vuelve prooxidante (Palozza 1998). Los fitoquímicos están relacionados con los pigmentos de los vegetales, por lo tanto las frutas y hortalizas de colores brillantes (amarillo, naranja, rojo y violeta) suelen tener mayor concentración de estos compuestos. Las coloraciones moradas de diversas frutas y el púrpura de la berenjena, se deben al contenido en polifenoles de estos vegetales.

Saura Calixto et al (1996) clasifican a los polifenoles en extraíbles a aquellos que son solubles en agua, metanol y acetona y en no extraíbles a los que no se solubilizan en los solventes mencionados. Los polifenoles extraíbles tienen bajo peso molecular y alta biodisponibilidad en contraposición a los de alto peso molecular que no son extraíbles y tiene baja biodisponibilidad (Bravo et al.1992 y 1994, Martín Carrón et al.1997)

La literatura tradicional de medicina herbácea de China, en sus estudios sobre secado de batata (Dioscorea spp) para evitar su deterioro durante el almacenamiento, verificaron el efecto de los tratamientos sobre la actividad antioxidante de las harinas. Por otra parte las batatas frescas están sujetas a deterioro durante el almacenamiento y ello acarrea dificultades de comercialización, (Otusanya y Jeger 1996, Afoakwa y Sefa-Dedeh 2001)

Según Chin-Lin et al (2003), en sus estudios sobre batata (*Dioscorea spp*.) y los tratamientos térmicos de secado aplicados para evitar su deterioro durante el almacenamiento, determinaron además el efecto de dichos tratamientos sobre la actividad antioxidante de las harinas. Por otra parte las harinas de batata, fueron fácilmente almacenadas por largos periodos de tiempo sin inconvenientes. Encontraron que el método de secado por liofilización, preservó la mayor actividad antioxidante de las mismas y resultó el de mayor calidad. El método más barato es el secado con aire caliente, pero los largos tiempos operativos dieron lugar a productos con una capacidad antioxidante ligeramente inferior. Dichos autores encontraron que los diferentes métodos de secado produjeron variaciones sobre el efecto capturador de radicales libres y la capacidad quelante del ion ferroso, los cuales aumentaban con el incremento de la concentración de extracto utilizado, según la variedad de batata empleada y el tipo de tratamiento empleado. Para ello estudiaron los siguientes métodos de secado por liofilización, aire caliente y secado por tambor. Determinaron que para las diferentes variedades utilizadas y para concentraciones de extracto de 200mg/mL el efecto capturador de radicales libres alcanzó valores del 95%.

Gazzani et al. (1998) investigaron la actividad pro y antioxidante de jugos de distintos productos vegetales como zanahorias, coliflores, tomates, berenjenas, zuchinis, etc. obtenidos por centrifugación y luego tratados a diferentes temperaturas (2, 25 y 102 ºC). Los jugos de champiñones y repollo blanco, mostraron una actividad antioxidante superior al 80 % mientras que la de los jugos de coliflor, apio y berenjenas, incrementaron su actividad antioxidante luego del hervido. En cambio los tomates y el pimiento amarillo siempre mostraron resultados prooxidantes.

Cao et al (1996), estudiaron la actividad antioxidante contra los radicales peróxidos de 22 vegetales comunes cuyos valores para ajo, espinaca, berenjenas y apio fueron de 17,7; 12,6; 9,8 y 3,8 mol de Trolox equiv /g base húmeda respectivamente. Por otra parte sólo el té mostró una actividad prooxidante en presencia de Cu+2, lo que no fue producido por los otros vegetales estudiados. Nishibori et al. (2000), investigaron la presencia del radical anión superóxido disponible en jugos de

20 productos vegetales frescos y calentados, particularmente en los jugos de: zanahoria, tomates, cebolla y brotes de frijoles, encontrando que la presencia del superóxido disponible decrece particularmente en los tratamientos por hervido y por cocimiento mediante microondas.
Noda et al. (2000) estudiaron el efecto capturador de radicales libres, la capacidad quelante del ion ferroso y la inhibición de la peroxidación lipídica en derivados de delphinidin obtenidos a partir de la cáscara de berenjenas, como la nasunina (delfinidina 3-(p cumarilrutinosido)- 5 glucosido). Encontraron que la misma, a valores menores a 50 μM protege contra la peroxidación lipídica del homogenizado de sesos de ratas. Además concluyeron que el efecto inhibitorio de los radicales hidroxilos, no se debe sólo al efecto capturador de radicales libres sino también a la quelación del ion ferroso. La nasunina es una antocianina que ejerce una acción más potente que otras antocianinas como la rubrobrasicina y la malvidina.
Panes producidos reemplazando la harina de trigo hasta un 25 % por harina de batata, mostraron un marcado incremento en su actividad antioxidante, medida mediante el ensayo del efecto capturador de radicales libres. Los panes conteniendo harinas de batata, pueden ampliar la utilización de las mismas como alimentos promotores de la salud. (Hsu-Chin et al. 2004)
El objetivo del presente trabajo es desarrollar diferentes tratamientos térmicos para deshidratar moras, a los efectos de evaluar la capacidad antioxidante de la harinas obtenidas a través del efecto capturador de radicales libres (ERCL) y la capacidad quelante (CQ) del ion ferroso partiendo de la variedad *Morus Nigra L*., para utilizarlas como alimentos nutraceúticos antioxidantes .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Debido a que la producción de moras es estacional, en Diciembre del 2007, se realizó el acopio de la fruta y se acondicionó para su adecuada conservación hasta el momento de los ensayos.
Las moras (Morus Nigra L) fueron provistas por un productor de la localidad de Uranga (Santa Fe) Argentina. Una vez recibidas fueron lavadas con una solución acuosa de detergente neutro y se enjuagaron con agua corriente tres veces, luego se blanqueó con vapor seco en autoclave a 110ºC durante 360 segundos. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró para separar el jugo del resto del fruto, este último, que es el objetivo de estudio, se colocó en bolsas de polietileno de 30 micrones, y se conservó a -18ºC hasta su utilización.

**Reactivos químicos**

Los siguientes reactivos químicos fueron provistos por Sigma comercial Co. (St. Louis, USA):
1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH*); 3-(2-piridil)-5-6-bis (4-fenil-acido sulfónico)-1,2-,4-triazina (Ferrozina), cloruro ferroso. Todos los reactivos químicos y solventes usados son de grado reactivo analítico.

### Métodos

**Deshidratación del material por diferentes tratamientos térmicos**

El descongelamiento anterior al procesado térmico se efectuó en una cámara termostatizada a 25 ºC. Chin-Li et al. (2003) Los tratamientos térmicos ensayados para deshidratar el material fueron los siguientes:
- Secado a temperatura ambiente en desecador a vacío (control o testigo)
- Secado en estufa con recirculación de aire a 60ºC
- Secado en estufa con recirculación de aire a 110ºC
- Secado con horno microondas

Debe destacarse que en el procesamiento por microondas para evitar el quemado del producto se realizó el tratamiento cada 30 segundos, con enfriamiento intermedio exponiendo la muestra al aire durante 5 minutos y repitiéndose la secuencia hasta completar el tiempo de procesamiento.
Los tiempos se establecieron hasta alcanzar pesada constante.

**Molienda del material deshidratado**

El material seco (harina de mora) que se obtuvo en cada tratamiento se molió con molino de cuchillas hasta que el material pasó por tamiz malla 40. De la harina obtenida en cada tratamiento, se tomaron 5 gramos y se dispersaron en 25 mL de metanol, para extraer los flavonoides solubles. Las dispersiones se mantuvieron con agitación, durante 10 horas al abrigo de la luz (los recipientes se taparon con film de polietileno oscuro). Luego se filtraron (papel de filtro Whatman Nº 40), desechando el sólido remante.

**Preparación de soluciones de extracto**
A partir del filtrado, (solución madre), se prepararon soluciones de diferentes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 30 y 50 mg muestra seca/mL solvente. Las que se conservaron a -18 ºC en frascos herméticos de vidrio hasta su utilización.

## Técnicas

Se evaluó el efecto capturador de radicales libres (ERCL) por el método espectrofotométrico de Shimada et al. (1992) utilizando el DPPH*. Se mezcló 1 mL de los extractos metanólicos de las harinas de moras deshidratadas con 5 mL de una solución metanólica 0,1 mM de DPPH* recientemente preparada y se las dejó al abrigo de la luz durante 50 minutos. Luego la absorbancia se midió a 517 nm contra un blanco de reactivos con un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). El ERCL se expresa en porcentaje el cual puede calcularse de la siguiente forma:

ERCL (%)= (1- (Absorbancia de la muestra/Absorbancia del blanco de reactivos)) x100

La capacidad quelante del ion ferroso (CQ) se evaluó mediante el método espectrofotométrico de Decker and Welch (1990) con algunas modificaciones. A 1 mL de los extractos metanólicos de las harinas de moras deshidratadas se les adicionaron 0.1 mL de 2 mM de FeCl2.4H2O; 0,2 mL de solución de ferrozina 5mM y 3,7 mL de metanol, fueron mezclados en un tubo de ensayo y se los dejaron reaccionar por 10 minutos. La absorbancia se midió a 562 nm contra un blanco de reactivo en un espectrofotómetro. Una baja de la absorbancia indica una alto capacidad quelante de ion ferroso. La CQ se expresa en porcentaje, el cual puede calcularse de la siguiente manera:

CQ (%)= (1-(Absorbancia de la muestra/Absorbancia del blanco de reactivos)) x100

## Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el test t de Student para comparar datos. Todos los ensayos se consideraron estadísticamente significativos con una P <0,05

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

El ERCL de la mora deshidratrada se muestra en la **Figura 1**. A la concentración de 1 mg/mL, los valores del ERCL son: 34,2; 26,5; 17,3 y 12,03 % para los tratamientos de microondas, estufa a 60 ºC, estufa a 110 ºC y control, respectivamente. Este ERCL se incrementó con el aumento de las concentraciones de extracto de 1 a 15 mg/mL. A partir de la concentración de 15 mg/mL en todos los tratamientos se alcanzaron valores superiores al 90%, con excepción del tratamiento a 60 ºC, en donde este valor se alcanzó a la concentración de extracto de 7,5 mg/mL. Para concentraciones entre 20 y 50 mg/mL los valores obtenidos a 60 ºC y 110 ºC se mantuvieron constantes y similares al control, entre 94,1 y 96,4%. Para microondas se obtuvieron valores de 94,9% para concentraciones de 50 mg/mL.

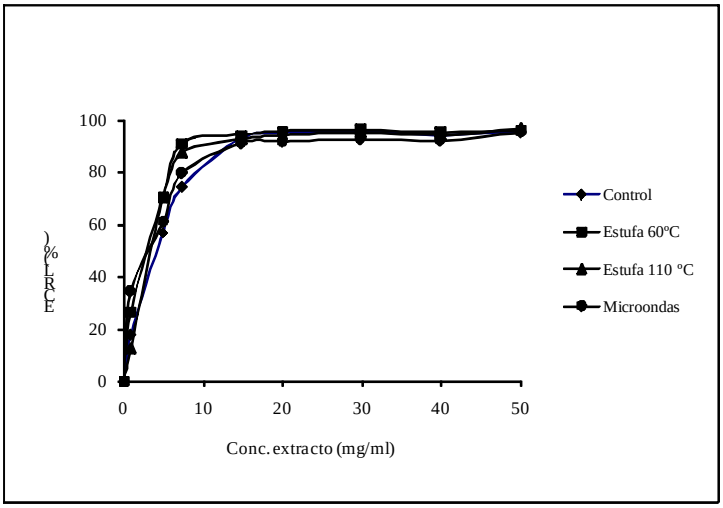


**Figura 1**. Efecto capturador de radicales libres de la mora deshidratada.

A los efectos comparativos, Chun-Hsien et al (2005) investigando sobre brócoli pre-cocido, encontraron valores de efecto capturador de radicales libres del 95% a partir de concentraciones de extracto de 12 mg/mL. En tanto que para harina de mora obtenida por el tratamiento a 60 ºC se alcanzaron valores del 96% a partir de concentraciones de extracto de 20 mg/mL.
La CQ de la mora deshidratada para los distintos tratamientos térmicos se muestra en la **Figura 2**. A la concentración de 1 mg/mL los valores de CQ son: 17,1, 13,1, 9,3 y 5,5 % para los tratamientos microondas, estufa a 60 ºC, estufa a 110 ºC y control, respectivamente. Estos valores de CQ se incrementaron levemente con el incremento de las concentraciones de extracto de 1 a 10 mg/mL. Para concentraciones entre 10 y 40 mg/mL los valores de CQ se mantuvieron en un rango entre 20 y 40 % para los tratamientos microondas, estufa a 60 ºC y 110 ºC. En cambio para el control los valores de CQ continuaron incrementandose hasta alcanzar un máximo de 70,7 % para una concentración de 50 mg/mL. Para esta última concentración se alcanzaron valores de 37,8 , 35,2 y 32,1%para los tratamientos de, microondas , estufa a 110 ºC y estufa a 60 ºC respectivamente.

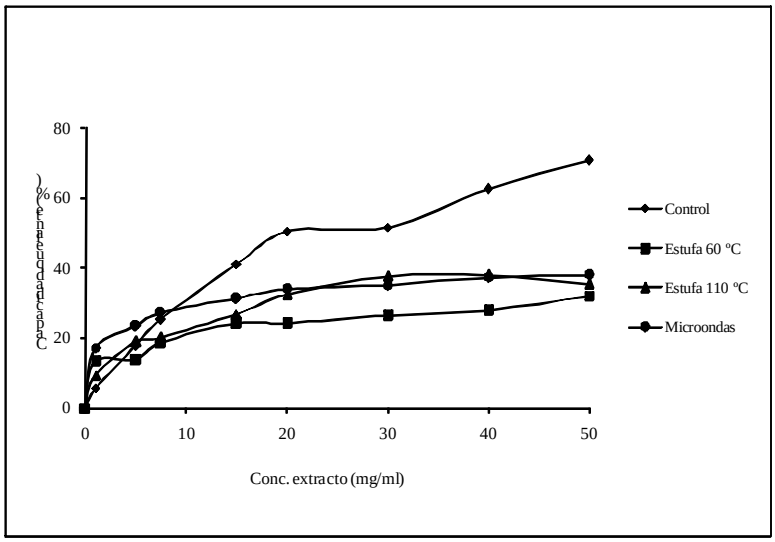


**Figura 2**. Capacidad quelante del ion ferroso de la mora deshidratada.

Con referencia a la capacidad quelante del ion ferroso de batatas deshidratadas Chin-Lin et al (2003) encontraron valores de 98 % para concentraciones de extracto de 48 mg/mL, mientras que para la harina de mora deshidratada a 60 ºC y el control alcanzamos valores de 53,1 y 70,7% para concentraciones de extracto de 50 mg/mL.

## CONCLUSIONES

Los extractos metanolicos mostraron excelente ERCL, y no se modificaron para los diferentes tratamientos térmicos. En todos los casos los valores de ECRLse incrementaron con el aumento de la concentración de extracto hasta alcanzar un valor prácticamente constante, cercano al 96% a partir de 20 mg/mL.
Los extractos metanolicos mostraron baja CQ en todos los tratamientos de deshidratación, excepto en el tratamiento control. Los mayores valores de capacidad quelante del ion ferroso se obtuvieron en el control alcanzándose el 70,7% para una concentración de extracto de 50 mg/mL. Los distintos tratamientos térmicos produjeron modificaciones en la CQ de los extractos de mora deshidratada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afoakwa E, Sefa-Dedeh S. 2001. Chemical composition and quality changes occurring in Dioscorea dumetorum pax tubers after harvest. Food Chemistry, 75: 85-91.

Benzie I. 2000. Evolution of antioxidant defense mechanisms. European Journal of Nutrition, 39: 53-61.

Block G, Patterson B, Subar A.1992. Fruit and vegetable. A review of the epidemiological evidence. Nutrition and Cancer, 18:12-29.

Bravo L.1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutritional Review, 56: 317-333

Bravo L, Saura Calixto F, Goñi I.1992. Effects of dietary fibre and tannins from apple pulp on the composition of faeces in rats. British Journal of Nutrition, 67: 463-473.

Bryngelson S, Johnsson M, Normen L, Dutta P. Anderson H.1997. Plant sterol in cereal products. In 2do.Worshop Bioactive Inositol Phosphates and Phytosterol in Foods. Goteborg, Suecia.

Cao G, Sofic E, Prior R.1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44:11, 3426-3431.

Chin-Lin H, Wenlung C, Yih-Ming W, Chin-Yin T. 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. Food Chemistry, 83: 85-92.

Chun-Hsien, L, Chi-Yue, C. 2005. Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments. Food Chemistry, 90: 9-15.

Decker E, Welch B. 1990. Role of ferritin as lipid oxidation catalysis in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38:674-678.

Gazzani G, Papetti A, Massolini G, Daglia M.1998. Anti and prooxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46-10: 4118-4122.

Hertog M, Feskens E, Hollman P, Katan M, Krohout D.1993. Dietary antioxidant flavonoids ant the risk of coronary Heart disease: The Zutpphen elderly study. Lancet, 342: 1007-1011.

Hsu –Chin L, Hurang- Shu L, Chen-Wen L, Weng-Yih M, Tseng-Chin Y. 2004. Qualities and antioxidant properties of bread as affected by the incorporation of yam flour in the formulation. International Journal of Food Science and Technology, 39:2,231-238.

Jacob R.1995. The integrate antioxidant system. Nutrional.Research, 15:755-766.

Martín–Carrón N, García-Alonso A, Goñi I, Saura-Calixto F. 1997. Nutritional and physiological properties of grape and pomace as a potential food ingredient. American Journal of Enology and Viticulture, 48:328-332.

Nishibori S, Namiki K.1998. Peroxidase anion radical scavenging ability of fresh heated vegetable juices. Journal Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, 45-2:114-148

Noda Y, Kneyuki T, Igarashi K, Mori A, Packer L. 2000. Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels.Toxicology, 148: 119-123.

Otusanya M, Jeger M.1996. Effect of Aspergillums Niger shoot emergence and vine develot in field-sown yams (Dioscorea spp.) and rot development under long-term storage conditions. International Biodeterioration & Biodegradation, 89-100.

Palozza P.1998. Prooxidant actions carotenoids in biologic systems. Nutritional Review, 56(9): 257-265.

Saura Calixto F. 1998. Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potencial food ingredient. Journal Agriculture Food Chemistry, 10: 4303-4306.

Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, and Nakamura T. 1992. Antioxidant properties of xhantan on the antioxidant of soybean oil in cyclodextrin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 945-948.

Toivo J, Phillips K, Lampi AM, Puronen V. 1998. Plant sterols and cholesterol in different types of diets. In The 13 Th International Symposium on Plant lipids. Seville, Spain.

Vicario-Romero I. 1997. Peroxidación lipídica, antioxidantes de la dieta y enfermedad cardiovascular. Nutritional.Clinical, 16: 19-28.

# Obtención de mora deshidratada por diferentes tratamientos térmicos y su influencia en el poder reductor y la concentración de flavonoides totales

# Obtaining dehydrated black mulberry by different termal treatments and their influence on reducing power and concentration of total flavonoids

Tosi E, Masciarelli R, Lucero H, Silvester S, Casconi G, García A.

Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Alimentos.
Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Rosario.
E. Zeballos 1341 - S2000BQA - Rosario – Argentina
mascia@netcoop.com.ar

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los diferentes tratamientos térmicos en la deshidratación de moras (*Morus Nigra L*) y su influencia sobre el poder reductor y la concentración de flavonoides totales. Las moras se deshidrataron hasta alcanzar una humedad final entre el 10 y el 12% mediante los siguientes tratamientos: secado a temperatura ambiente (control); estufa con recirculación de aire a 60 ºC; estufa con recirculación de aire a 110 ºC y horno a microondas. Se obtuvo un extracto metanólico de concentraciones de entre 0,5 y 50 mg de muestra seca (ms)/mL de solvente. Los tratamientos a 60 ºC y control experimentaron los mayores valores del poder reductor hasta concentraciones de extracto cercanas a 9 mg/mL, a partir de la cual el control alcanzó los mayores valores. Por otra parte los valores de la concentración de flavonoides totales se incrementaron con la concentración de extractos. A 60 ºC se obtuvieron los mayores valores en todo el rango de concentraciones de extracto y los valores menores se obtuvieron en el tratamiento a 110 ºC

## ABSTRACT

The aim of the present research work was to develop different thermal treatments to dehydrate black mulberries (*Morus Nigra L*) and its influence over the reducing power and the total flavonoids concentration. Black mulberries were dehydrated up to final moisture between 10 and 12 % by means of the following treatments: drying at room temperature (control), in dry oven at 60 ºC with air recirculation, in dry oven at 110 ºC with air recirculation and microwave. Methanolic extracts with concentrations between 0.5 and 50 mg were obtained from the solvent dry sample (ms)/mL. Both treatments, dry oven at 60ºC and control showed the highest values of reducing power until 9 mg/mL. For higher concentrations, values for control were the biggest and remained constant for concentrations over 15 mg/mL. On the other hand, the total flavonoids concentration values increased with extract concentration. Highest values were obtained within the whole range of extract concentrations at 60 ºC treatment and lowest values were obtained at 110 ºC treatment.

**PALABRAS CLAVE**: *Poder reductor - flavonoides - mora deshidratada.*

**KEYWORDS**: *Reducing power-flavonoids-dehydrated black mulberry.*

## INTRODUCCIÓN

Se ha determinado que los productos vegetales que contienen flavonoides poseen capacidad antioxidante y de esta manera su ingesta contribuye a reducir el riesgo de contraer enfermedades como el cáncer, afecciones cardiacas, hipertensión, osteoporosis, enfermedades del tracto urinario, etc. (Shahidi y Wanasundara 1992, Saura Calixto 1998)

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidativos, ya que son excelentes dadores de electrones o hidrógenos con la formación de radicales libres intermedios relativamente estables. Representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales.

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras, semillas, flores y en diversas bebidas como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja. Se encuentran también en extractos de plantas como arándanos, ginkgo, biloba, cardo, etc.
El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.
Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.
Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante.
Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descripto su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las liproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de placa de ateroma).
Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones de hendiduras, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de destoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras.( Martinez-Flores et al. 2002)
Estructura química
Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde 2 al 6 (**Figura 1**). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:
- Flavanol, como la catequina, con un grupo –OH en posición 3 del anillo C y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.
- Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.(**Figura 1**).

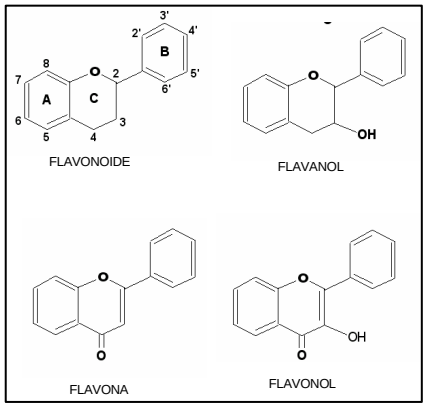


**Figura 1**. Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Tres características estructurales son importantes para su función: a) la presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3; c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5. La quercitina es el flavonoide que presenta estas tres características (**Figura 2**).

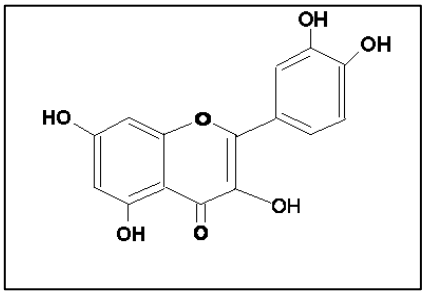


**Figura 2**. Estructura de la quercitina.

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son:
Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C.
Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.
El flavonoide quercitina es el que mejor reúne estos criterios para una efectiva función antioxidante.
La función antioxidante de la quercitina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercitina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo. Por otra parte, la quercitina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. (Martinez-Flores et al. 2002)
Kuskoski et al. (2005) determinaron el índice de fenoles totales (FT), antocianos totales (AT) y la capacidad antioxidante de las pulpas de frutos comerciales congelados, aplicando para la determinación de la capacidad antioxidante los métodos espectrofotométricos ABTS, DPPH* y DMPD (compuestos cromógenos utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos para captar los radicales libres generados, que implican las especies reactivas de oxígeno). Los valores TEAC (capacidad antioxidante equivalente al Trolox) oscilan entre 2 y 67.2 µmol/g. La capacidad antioxidante obtenida por los métodos ABTS y DPPH* se encuentran correlacionados con el contenido de compuestos fenólicos y antocianos. En este trabajo la mora si bien no tiene la mayor capacidad antioxidante, tiene alto contenido de antocianos, a los cuales se les atribuye esta cualidad.
Alvarez-Moreno et al. (2002) evaluaron la estabilidad química de antocianos totales en tres jugos pasteurizados en presencia de diferentes proporciones de ácido ascórbico elaborados a partir de pulpa de mora (Rubus glaucus Benth). Las evaluaciones se efectuaron durante un período de almacenamiento de 9 días. El contenido de antocianinas totales expresado como gramos de pelargonidina-3-glicósido/ litro no varió significativamente en ninguno de los tratamientos.
Elisia et al. (2007) evaluaron la capacidad antioxidante de un extracto concentrado de antocianinas a partir de la filtración de un gel etanólico de mora y obtuvieron que la concentración de antocianina, especialmente la presencia de cianidina-3-glucósido, en la mora, contribuye a mejorar la respuesta antioxidante para suprimir los radicales peróxidos inducidos químicamente y la oxidación intracelular.
Wei-Dong et al. (2007) estudiaron la estabilidad térmica y durante el almacenamiento de la antocianina en el jugo de mora y en el jugo concentrado en un rango de temperatura de 60-90 ºC y 5-37 ºC. Los resultados indicaron que la degradación térmica de la antocianina sigue una reacción cinética de primer orden. El valor de energía de activación para la degradación de la antocianina durante el calentamiento fue de 58,95 Kj/mol para el jugo de mora de 8,90 ºBrix. Durante el almacenamiento la antocianina del jugo concentrado de 65 ºBrix se degradó más rápidamente que el jugo de 8,90 ºBrix.
Agostini et al. (2004) determinaron la capacidad antioxidante de los flavonoides en manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebollas frescas y tratadas térmicamente por calor húmedo (hervido y vapor), seco (horno) y alta frecuencia (microondas). Los resultados indican que la capacidad antioxidante de los flavonoides de las manzanas rojas con y sin cáscaras, fresas, tomates y cebolla fue de 0,259, 0,267, 0,278, 0,165 y 0,223 µmol/g equivalente Trolox, disminuyendo estos valores luego del tratamiento térmico en mayor grado por calor seco a 0,128, 0,072, 0,077 y 0,048

µmol/g equivalente Trolox respectivamente y 0,146 µmol/g equivalente Trolox en la cebolla hervida. En conclusión los flavonoides presentaron mayor actividad antioxidante en estado fresco, disminuyendo al ser sometidos a los distintos tipos de calor (cocción).

Actividad pro-oxidante de los flavonoides

Moskaug et al. (2004) describieron algunos efectos adversos cuando se suministran suplementos con altas concentraciones de flavonoides. Estas altas concentraciones producirían radicales reactivos que inducirían la autoxidaciòn y aumentarían excesivamente la respiración mitocondrial

Aunque la mayoría de los potenciales de óxido reducción de los flavonoides son menores a los radicales superóxidos y peróxidos, el impacto de estos radicales en la generación de la peroxidaciòn oxidativa, réplicas de ADN y mutaciones puede llegar a ser significativa en el desarrollo de enfermedades.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los diferentes tratamientos térmicos en la deshidratación de moras (*Morus Nigra L*) y su influencia sobre el poder reductor (PR) y la concentración de flavonoides totales (CFT).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

Debido a que la producción de moras es estacional, en Diciembre del 2007, se realizó el acopio de la fruta y se acondicionó para su adecuada conservación hasta el momento de los ensayos. Las moras (*Morus Nigra L*) fueron provistas por un productor de la localidad de Uranga (Santa Fe) Argentina.

Una vez recibidas fueron lavadas con una solución acuosa de detergente neutro y se enjuagaron con agua corriente tres veces, luego se blanqueó con vapor seco en autoclave a 110 ºC durante 360 segundos. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró para separar el jugo del resto del fruto, este último, que es el objetivo de estudio, se colocó en bolsas de polietileno de 30 micrones, y se conservó a -18 ºC hasta su utilización.

**Reactivos químicos**

Los siguientes reactivos químicos fueron provistos por Sigma comercial Co. (St. Louis, USA):

Hexaciano ferrato de potasio, cloruro férrico, ácido tricloroacético, nitrito de sodio y cloruro de aluminio. Todos los reactivos químicos y solventes usados son de grado reactivo analítico.

### Métodos

**Deshidratación del material por diferentes tratamientos térmicos**

El descongelamiento anterior al procesado térmico se efectuó en una cámara termostatizada a 25 ºC. (Chin-Li Hsu et al. 2003). Los tratamientos térmicos ensayados para deshidratar el material fueron los siguientes:

Secado a temperatura ambiente en desecador a vacío (control o testigo)

Secado en estufa con recirculación de aire a 60 ºC

Secado en estufa con recirculación de aire a 110 ºC

Secado con horno microondas

Debe destacarse que en el procesamiento por microondas para evitar el quemado del producto se realizó el tratamiento cada 30 segundos, con enfriamiento intermedio exponiendo la muestra al aire durante 5 minutos y repitiéndose la secuencia hasta completar el tiempo de procesamiento. Los tiempos se establecieron hasta alcanzar pesada constante.

**Molienda del material deshidratado**

El material seco (harina de mora) que se obtuvo en cada tratamiento fue molido con molino de cuchillas hasta que el material pasó por tamiz malla 40. De la harina obtenida en cada tratamiento, se tomaron 5 gramos y se dispersaron en 25 mL de metanol, para extraer los flavonoides solubles. Las dispersiones se mantuvieron con agitación, durante 10 horas al abrigo de la luz (los recipientes se taparon con film de polietileno oscuro). Luego se filtró (papel de filtro Whatman Nº 40), desechando el sólido remante.

**Preparación de soluciones de extracto**

A partir del filtrado, (solución madre), se prepararon soluciones de diferentes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 30 y 50 mg muestra seca/mL solvente. Las que se conservaron a -18 ºC en frascos herméticos de vidrio hasta su utilización.

## Técnicas

Se evaluó el poder reductor (PR) mediante el método de Duh y Yen (1997), su valor se expresa en unidades de absorbancia y su incremento indica un aumento del poder reductor. A 1 mL del extracto metánolico de mora deshidratada se le adicionaron 0,5 mL de buffer fosfato (0,2 M, pH 6,6) y 2,5 mL de hexacianoferrato de potasio, se dejó reaccionar por 20 min en baño de agua a 50 ºC. Se enfrío rápidamente en baño de agua con hielo y se le adicionaron 0,5 mL de ácido tricloroacético. Se centrifugó a 3000g durante 10 min y a una alícuota de 1 mL del sobrenadante se mezcló con 1 mL de agua bidestilada y 0,1 mL de cloruro férrico (0,1%) y se dejó reaccionar por 10 min, se produjo una coloración que permitió evaluar la absorbancia a 700 nm con un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón).

La concentración de flavonoides totales (CFT) se evaluó mediante el método de Kim et al. (2003) con algunas modificaciones, se basa en la capacidad de los flavonoides de formar un compuesto coloreado en presencia de aluminio en medio alcalino, con máxima absorbancia a 510 nm y su valor se expresa como mg de quercitina equivalente por gramo de muestra seca (mg QE/g ms). A 1 mL del extracto metánolico de mora deshidratada se le adicionaron 4 mL de agua bidestilada y 0,3 mL de nitrito de sodio, éste es considerado el tiempo cero, a los 5 min se le agregaron 0,3 mL de cloruro de aluminio al 3%, a los 6 min, 2 mL de hidróxido de sodio (1 M) e inmediatamente 2,4 mL de agua bidestilada, midiéndose la absorbancia de la mezcla a 510 nm contra un blanco de reactivo con un espectrofotómetro.

## Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el test t de Student para comparar datos. Todos los ensayos se consideraron estadísticamente significativos con una $P < 0,05$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de PR se muestran en la **Figura 3**. A una concentración de 1 mg/mL el PR en el tratamiento estufa a 60 ºC fue 1,31, mientras que para los tratamientos control, microondas y estufa a 110 ºC fueron 0,26, 0,24, y 0,16 respectivamente. A la concentración de 7,5 mg/mL, el PR alcanzó los valores: 1,34; 1,18; 1,13 y 1,02 para los tratamientos estufa 60 ºC, microondas, control y estufa a 110 ºC, respectivamente. A partir de la concentración 7,5 mg/mL el tratamiento control presentó el mayor PR alcanzando el valor 2,1 para la concentración 20 mg/mL, luego creció levemente y alcanzo el valor 2,35 a la concentración de 50 mg/mL. Los valores del PR presentaron un incremento pronunciado para el tratamiento a 60 ºC a bajas concentraciones para luego mantenerse prácticamente constante a partir de 20 mg/mL, alcanzando valores cercanos a 1,8 unidades de absorbancia Por otra parte los tratamientos microondas y a 110 ºC crecieron levemente a concentraciones bajas de extracto, pero a partir de la concentración de 20 mg/mL estos se mantuvieron prácticamente constantes alcanzando 1,85 unidades de absorbancia a 50 mg/mL.

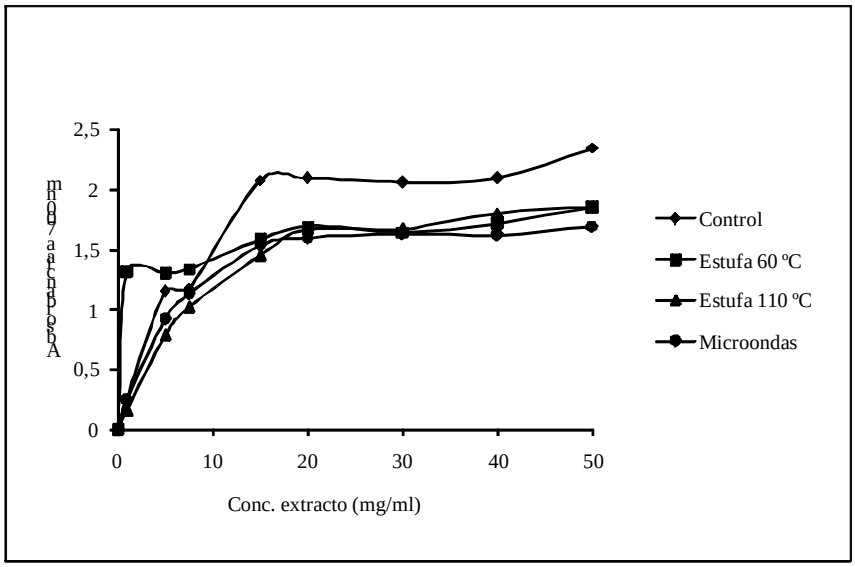


**Figura 3**. Poder Reductor de mora deshidratada.

El CFT se muestran en la **Figura 4**. Para todos los tratamientos el CFT se incrementó con el aumento de la concentración de los extractos. Con respecto a la CFT, a 60 ºC se produjeron los mayores valores en todo el rango de concentraciones de extracto, alcanzando valores de 129,5 mg QE/g ms a la concentración de 50 mg/mL; por otra parte, la CFT para el tratamiento a microondas y el control a la concentración de 50 mg/mL fueron de 105,6 y 112,7 mg QE/mg ms respectivamente; el tratamiento a 110 ºC, fue el que sufrió mayores pérdidas en la CFT ya que para una concentración de extracto de 50 mg/mL alcanzó 60,8 mg QE/mg ms

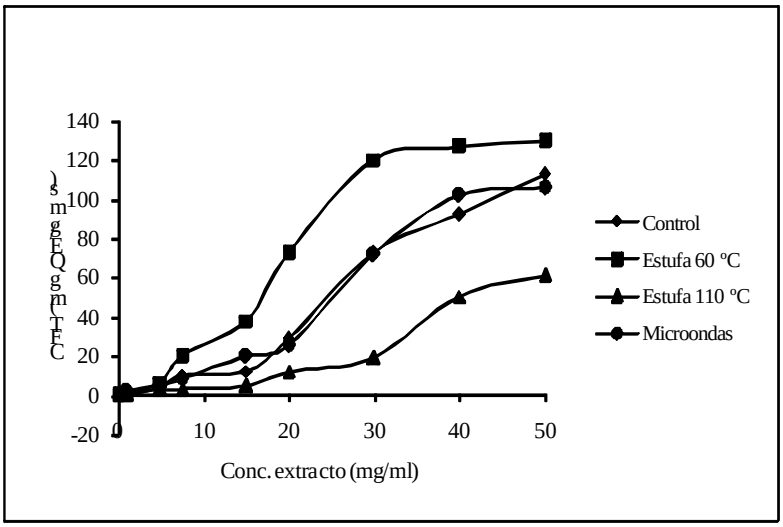


**Figura 4**. Concentración de Flavonoides Totales de mora deshidratada.

## CONCLUSIONES

Los tratamientos más recomendados son a 60 ºC y control ya que experimentaron los mayores valores del PR hasta concentraciones de extracto de 9 mg/mL, a partir de la cual el control alcanzo los mayores valores, los que se mantuvieron constantes y cercanos a 2 unidades de absorbancia, a partir de la concentración de extracto de 15 mg/mL.

Pero por otra parte los valores de CFT se incrementaron en mayor medida para el tratamiento a 60 ºC con la concentración de extractos, correspondiendo los valores menores al tratamiento a 110 ºC

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la estimable colaboración de la Licenciada en Nutrición Daniela Pascualini.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agostini L, Morón Jiménez MJ, Ramón AN, Ayala Gómez A. 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 54:1.

Chin-Lin H, Wenlung C, Yih-Ming W, Chin-Yin T. 2003. Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. Food Chemistry, 83: 85-92.

Duh PD, Yen GC. 1997. Antioxidant activity of three herbal water extracts. Food Chemistry, 60: 639-645.

Elisia I, Hu C, Popovich D. 2007. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. Food Chemistry, 101, 3: 1052-1058.

Kim D, Jeoung S, Lee CH. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chemistry, 81: 321-326.

Kuskoski M, Asueri AG, Troncoso AM, Filho Manzini J, Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Campinas, 25(4):726-732.

Martinez-Flóres S, González-Gallego J, Culebras JM, Muñón Y M. ª J. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Nutrición Hospitalaria. XVIII, 6: 271-278.

Moreno-Alvarez MJ, Vilora MA, López E, Douglas BC. 2002. Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (Rubus glaucus Benth) Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 52, 2, supl 2.

Moskaug J, Carisen H, Myhrstad M, Blumhoff R. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. American Journal of Clinical Nutrition, 81: 1-3

Saura Calixto F. 1998.Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potencial food ingredient. Journal Agriculture Food Chemistry, 10: 4303-4306.

Shahidi F, Wanasundara PK. 1992. Phenolics antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 32: 67-103.

Wei-Dong W, Shi-Yin X. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. Journal of Food Engineering, 82: 271-275.

# Aumento de la accesibilidad de grasa láctea a lipasas por daño mecánico de la membrana del glóbulo graso

# Increase of milk fat availability to lipases by physical damage to the milk fat globule membrane

Vélez MA, Rebechi S, Perotti MC, Hynes E, Meinardi CA, Zalazar CA

Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET).
1ro de Mayo 3250, Santa Fe capital (CP 3000). Argentina
srebechi@fiq.unl.edu.ar

## RESUMEN

En la leche existe más de un 3% de triglicéridos y también una enzima lipolítica, la lipoproteína lipasa. Sin embargo, la acción de la enzima sobre el sustrato en condiciones normales es limitada o nula, ya que la materia grasa se encuentra emulsionada en forma de microgotas denominadas glóbulos, protegida por una membrana, y la lipasa nativa está asociada a la micela de caseína. En quesos duros de pasta cocida, es deseable que se alcance una moderada lipólisis de la grasa láctea durante la maduración, para incrementar el sabor picante y el aroma típico. El objetivo del presente trabajo fue identificar estrategias tecnológicas apropiadas para incrementar la lipólisis en quesos duros, mediante tratamientos físicos a la materia grasa de la leche que permitan un deterioro controlado de la membrana del glóbulo graso. Para ello, se evaluaron distintos procedimientos: agitación a alta velocidad y daño mecánico por recirculación en bomba, que se aplicaron a mezclas de leche descremada y crema nativa. Se estudiaron distintos niveles de concentración de grasa en la mezcla, desde 5 a 40%, y diferentes temperaturas de trabajo, en el rango de 5 a 45 ºC. Se evaluó el daño a la membrana del glóbulo graso mediante determinación de la grasa libre por centrifugación a 60 ºC y microscopía óptica de contraste de fases. Entre todos los tratamientos ensayados, se descartaron aquellos que condujeron a resultados extremos: los que ocasionaron un deterioro muy intenso y aquellos para los que no se encontró diferencias con la crema nativa, y se seleccionó un procedimiento que permitió obtener un daño moderado de la membrana. Para ello, se utilizó una mezcla de más del 20 % de materia grasa, a temperatura de refrigeración, que se trató por agitación mecánica. La mezcla intervenida se diluyó con leche descremada hasta alcanzar un 3 % de materia grasa y se utilizó para preparar cuajadas miniatura, según una adaptación de la tecnología de un queso duro de pasta cocida; en la experiencia se incluyeron controles que contenían crema nativa. Se comprobó que el tiempo de coagulación y las características del coágulo eran similares para las minicuajadas elaboradas con crema intervenida o nativa, y que éstas tampoco diferían significativamente en la humedad y el contenido de materia grasa. La pérdida de grasa total en el suero de las cuajadas experimentales fue despreciable. Sin embargo, se visualizó algo de grasa libre en el suero, lo que no se verificó en las cuajadas controles. De esta manera, se obtuvo un método de tratamiento para la leche de elaboración de quesos duros que reduce la compartimentalización inicial entre enzimas lipolíticas y su sustrato, que actualmente se aplica a la elaboración de quesos duros a escala piloto.

## ABSTRACT

In milk there is more than 3% of triglycerides and also an indigenous lypolitic enzyme, the lipoprotein lipase. However, the action of the enzyme on the substrate in normal conditions is limited or does not exist because the milk fat is emulsified and protected by the milk fat globule membrane (MFGM), while the lipase is associated to casein micelle. In hard cooked cheeses, moderated lypolisis during ripening is a desirable event in order to increase piquant taste and genuine flavour. The aim of this work was to find technological approaches to increase lypolisis in cheese by means of applying physical treatments to the milk fat addressed to induce controlled damage to the fat globule membrane. For that purpose, two different procedures were tested: agitation at high rates and pumping, both applied to mixtures of skim milk and native cream. Different concentrations of fat in the mix were studied, from 5 to 40% at different temperatures, ranging from 5 to 45 ºC. The damage to the MFGM

was estimated by assessing free fat by centrifugation at 60 ºC, and by phase contrast microscopy. Among all the treatments tested, those that conduced to extreme results were rejected. In fact, treatments that caused a very strong deterioration to the globules and those whose results did not differ from the controls with native cream were not further considered. The selected method allowed moderate damage to the membrane when a mix of more than 20% of fat was treated with mechanic agitation at refrigeration temperature. The treated mix was diluted with skim milk to 3% fat and used to prepare minicurds, following a protocol similar to the technology of cheesemaking of hard cooked cheeses. In the experiment, control cheeses which contained native cream were included. The time of coagulation and the characteristics of the curd were similar for the minicurds made with native or treated cream and no significant differences in moisture and fat content were found between them. The loss of fat in the whey of experimental curds was negligible, although some free fat was visible in the whey of treated curds, which did not appear in the controls. Hereby, a method of treatment was obtained for the milk aimed to hard cheesemaking that reduces the initial barrier between lypolitic enzymes and their substrate. The procedure is currently applied in our Institute to the production of hard cheeses in pilot scale.

**PALABRAS CLAVE**: *grasa láctea / membrana del glóbulo graso / lipólisis.*

**KEYWORDS**: *milk fat / milk fat globule membrane (MFGM)/ lypolisis.*

## INTRODUCCIÓN

Las lipasas son enzimas que actúan en la interfase lípido-agua de emulsiones de triglicéridos; la leche, que contiene más del 3% de triglicéridos en forma de emulsión, es un alimento susceptible a la lipólisis. La enzima nativa lipoproteína lipasa (LPL) es la responsable de la mayor parte de la actividad lipolítica en esta matriz alimenticia. La misma se encuentra normalmente asociada a las micelas de caseínas a través de uniones electrostáticas e interacciones hidrofóbicas (Deeth 2005).

Por otro lado, la LPL se inactiva por acción de la luz ultravioleta, agentes oxidantes y ácidos y por los tratamientos térmicos, requiriéndose temperaturas superiores a 60 ºC y pH inferior a 6,5 para su desnaturalización. La actividad de esta enzima desaparece casi totalmente cuando la leche se somete a pasteurización de alta temperatura un corto tiempo (72 ºC por 15 segundos) (Collins *et al.* 2003, Hickey *et al*. 2007). Asimismo, en leche cruda la hidrólisis enzimática no se produce espontáneamente debido a que la enzima y su sustrato se encuentran compartimentalizados: los triglicéridos (TG) dentro de glóbulos de 0,2-10 µm de diámetro rodeados por una membrana y la enzima asociada a la fase proteica (Lopez *et al*. 2007). La membrana biológica que recubre los TG conforma una barrera natural que impide el acceso de la LPL a su sustrato (Deeth 2005).

Bajo ciertas circunstancias, la protección de la membrana disminuye o incluso puede desaparecer. A temperaturas inferiores a 40 ºC la grasa comienza a cristalizar, lo que conlleva a daños estructurales en la membrana que pueden conducir a una agregación y/o coalescencia de los glóbulos. La agitación (batido o bombeo) puede producir la disrupción de la membrana, lo cual se acentúa cuando los glóbulos poseen mayor diámetro. Se ha comprobado que la resistencia de la emulsión a la coalescencia parcial es determinada por una combinación de factores que incluyen el tamaño del glóbulo, el contenido de grasa y la temperatura de la leche (Evers 2004a).

En quesos duros de pasta cocida, es deseable que se alcance una moderada lipólisis de la grasa láctea durante la maduración, los ácidos grasos libres que se producen contribuyen al sabor picante y al aroma típico. Si la leche de elaboración se somete a un tratamiento físico que genere inestabilidad en la emulsión grasa y daño en la membrana, es esperable que la disminución de la compartimentalización entre la enzima y su sustrato acentúe el proceso de lipólisis.

Objetivos

Identificar estrategias tecnológicas apropiadas para incrementar la lipólisis en el proceso de elaboración de quesos duros, que permitan un deterioro controlado de la membrana del glóbulo graso y una moderada inestabilidad de la emulsión. Para ello, se evaluaron procedimientos de agitación y bombeo en mezclas de leche descremada y crema nativa y se ensayaron los procedimientos adecuados en la elaboración de cuajadas miniatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tratamientos de la materia grasa.

Un volumen de 30 L de leche cruda de gran mezcla, procedente de una industria láctea de la zona de Santa Fe se descremó con una descremadora centrífuga mecanizada (Alfa Laval, Suecia) y se obtuvo leche descremada (< 0,5 % de materia grasa) y crema nativa (50 % materia grasa, aproximadamente). Las mismas se utilizaron para preparar mezclas con diferentes contenidos de materia grasa que se sometieron a tratamientos mecánicos en distintas condiciones de temperatura y velocidad de agitación. Para corroborar la eficiencia de los tratamientos, se incluyeron controles que consistieron en mezclas no tratadas.

El porcentaje de grasa de las mezclas osciló entre el 5 y el 40 %. Las mismas se trataron empleando los procedimientos de bombeo centrífugo a razón de 3 L/min durante 8 min y agitación mecánica trabajando en un rango de temperatura desde 5 a 45 °C. El daño de la membrana del glóbulo graso se evaluó mediante la determinación de grasa libre por centrifugación, comparándose las mezclas tratadas con las controles, para seleccionar el procedimiento más efectivo. Además, se realizó una observación por microscopía óptica de las muestras obtenidas de la determinación de grasa libre.

### Preparación de la leche de elaboración

Por razones de confidencialidad no se detallan las combinaciones de temperatura, % de materia grasa (MG) y tiempo de agitación que se emplearon en los tratamientos realizados.

Con las mezclas, ya sea tratadas según el procedimiento seleccionado o controles, se preparó leche al 3 % de MG que se empleó para la elaboración de minicuajadas tratadas y controles, respectivamente.

### Elaboración de minicuajadas

Para la obtención de cuajadas mini, se buscó reproducir la tecnología de elaboración de quesos duros desarrollada en el INLAIN. Para ello, se colocaron aprox. 40 mL de leche en tubos de 50 mL de capacidad en un baño a 33 ºC. Luego, se agregó $CaCl_2$ (Merck, Alemania) y coagulante (100 % quimosina, Maxiren 150; Gist Brocades, France) a una concentración final en la leche de 0,02 % y 0,023 % (p/v), respectivamente.

Una vez que se produjo la coagulación, se realizaron dos cortes en la cuajada, se esperó a que el coágulo se desprenda de las paredes del tubo y exude suero. Luego los tubos se colocaron en un baño a 50 ºC, y la mezcla de suero y granos de cuajada se agitó continuamente con una espátula hasta alcanzar dicha temperatura. Finalmente, se detuvo la agitación y se permitió que la cuajada se depositara en el fondo de los tubos. Los mismos se centrifugaron a 600 g, separándose el suero y las minicuajadas. Se determinó el contenido de grasa total y de humedad en la cuajada y la grasa libre en el suero. Se realizaron 2 réplicas por cada tratamiento ensayado.

### Determinación de grasa libre

La grasa libre se determinó por centrifugación a 60 ºC. Los métodos de centrifugación para determinar grasa libre se basan en la diferencia de densidad que existe entre la grasa libre y la grasa que se encuentra en el interior de los glóbulos (Evers 2004b).

Las muestras se termostatizaron a 40 ºC durante 15 minutos. En tubos de 50 mL de capacidad se colocaron aproximadamente 40 mL de muestra que se mantuvieron en baño a 60 ºC durante 15 min. Los tubos se centrifugaron a 600 g por 10 minutos y se colocaron nuevamente a 60 ºC durante 5 min. Finalmente se evaluó visualmente el volumen de grasa liberada en la parte superior de los tubos.

Las muestras provenientes de los distintos tratamientos se analizaron por duplicado.

### Microscopía Óptica

Se realizó la observación microscópica con contraste de fases (Microscopio trinocular Jenned 2- Carl Zeiss-Jena, Alemania) de muestras de la fase de grasa libre y de la interfase crema-grasa libre provenientes de la determinación de grasa libre de las mezclas sometidas a agitación, y se compararon con muestras controles.

El procedimiento consistió en colocar una gota de la muestra sobre un portaobjeto, y realizar la observación por inmersión a 1000X (se tomaron fotos en un dispositivo microfotográfico nit-AKS 24x36, automatic 2).

## Análisis de las minicuajadas

### Humedad

El porcentaje de humedad se determinó por secado de las muestras de cuajada en estufa a 102 ± 1 ºC hasta pesada constante, de acuerdo a la metodología normalizada de la Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF Nº 4 A,1982).

En primer lugar, se pesó un cristalizador conteniendo arena tratada con ácido (alrededor de 25 g) y una varilla de vidrio, y que previamente habían sido secados a la misma temperatura del ensayo. Luego, se colocó una cantidad de muestra de aproximadamente 3 g de queso (pesada exacta) en el cristalizador y se pesó nuevamente. La muestra se homogeneizó lo mejor posible con la arena con la ayuda de la varilla para evitar la formación de una capa que dificulte la evaporación. Se colocó en estufa a 102 ºC hasta pesada constante, aproximadamente 5 h. Finalmente, se registró el peso del cristalizador con la muestra seca y se determinó el contenido de humedad calculando la diferencia entre el peso de la muestra húmeda y el peso de la muestra seca. El resultado se expresó como porcentaje en la masa de la cuajada (% p/p), y cada muestra se analizó por duplicado.

### Materia grasa

El contenido de materia grasa en el queso fue determinado por el método butirométrico de Gerber van Gulik (FIL-IDF Nº 152 A 1997). Para ello, se utilizó un butirómetro específico para queso. Se pesaron aproximadamente 2,5 g de cuajada (pesada exacta) y se agregó una solución de ácido sulfúrico de densidad 1,52 hasta llenar completamente el bulbo del butirómetro. Luego se adicionó 1 mL de alcohol isoamílico. Se cerró el butirómetro, se agitó suavemente, y se colocó en un baño a 60 – 70 ºC para favorecer la completa disolución de la cuajada. Por último, se centrifugó a máxima velocidad entre 5 y 10 minutos utilizando una centrífuga específica para butirómetros (Centrífuga de Gerber). Finalmente, se leyó, en la escala el espacio ocupado por la grasa a una temperatura de 65 ºC y este valor se utilizó para el cálculo de la materia grasa en el queso (% p/p). Cada muestra fue analizada por duplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para buscar las condiciones óptimas de agitación mecánica, se realizaron distintas pruebas variando el tiempo de agitación desde 2 a 5 minutos. Debido a que cuando la mezcla se agitó durante un tiempo mayor a 3 minutos se produjo la desestabilización de la emulsión con inversión de fases (obteniéndose una emulsión de agua en grasa), se seleccionó un tiempo óptimo de agitación de 2 minutos.

Con respecto al tratamiento con bomba centrífuga, se probaron distintos tiempos de recirculación desde 2 a 10 minutos manteniendo el caudal constante a razón de 3 L/min. Se seleccionó un tiempo óptimo de bombeo de 8 minutos debido a que al superar este tiempo se generó una cantidad elevada de espuma y por consiguiente una rotura excesiva de la membrana del glóbulo graso.

De los dos tratamientos tecnológicos ensayados, la agitación mecánica fue el más efectivo y repetitivo. El mismo consistió en agitar la mezcla durante dos minutos, en forma discontinua (1 min de agitación, 1 minuto de descanso, y 1 min de agitación). De todas las combinaciones ensayadas, la mezcla preparada al 30% de MG y tratada a 5 ºC experimentó mayor rotura del glóbulo graso. A modo de ejemplo, en la **Figura 1** se presentan los resultados obtenidos en la determinación de grasa libre, para una mezcla al 30% sometida a bombeo y agitación a 5 ºC.

Paralelamente, se realizó la observación microscópica de la grasa libre de la mezcla al 30% de MG a 5 ºC. En la **Figura 2** (**a**) se muestra la mezcla sin tratar y en las **Figuras 2** (**b**) y (**c**) se observa la interfase crema-grasa libre y la fase de grasa libre de muestras sometidas a agitación, respectivamente. En la **Figura 2** (**b**) se observa la agregación de los glóbulos en forma de racimos y en (c) una fase continua de aceite que evidencia la disrupción de los mismos, evidenciándose además fragmentos de membranas.

Con respecto a la elaboración de las minicuajadas, el tiempo de coagulación y las características del coágulo fueron similares cuando se utilizó mezcla tratada y sin tratar. Los porcentajes de humedad y materia grasa en las cuajadas controles y tratadas fueron similares, presentando un promedio de 54,66% de humedad y un 22,01% de MG. El contenido de grasa total en el suero de las cuajadas tratadas y controles fue despreciable. Sin embargo, en el suero proveniente de las cuajadas tratadas se observaron gotas de aceite en una cantidad menor a la cuantificable (**Figura 3**), lo que no se apreció en las cuajadas controles (**Figura 4**).

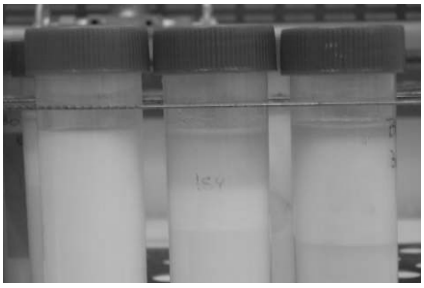

**Figura 1**: De izquierda a derecha, se observa la grasa libre en la mezcla sin tratar, en la mezcla tratada con agitación mecánica y en la tratada con bomba centrífuga. Porcentaje de grasa de la mezcla: 30% y temperatura de ensayo: 5 ºC

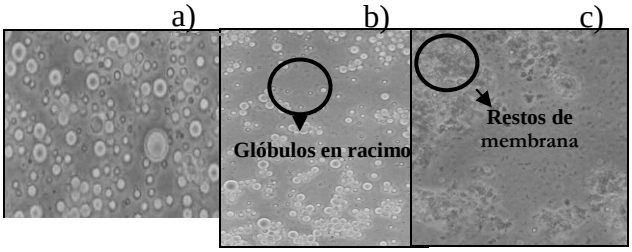


**Figura 2**: Microscopía Óptica de muestras provenientes de la determinación de grasa libre (a) Mezcla sin tratar. (b) Interfase crema-grasa libre de una mezcla agitada. (c) Grasa Libre de la mezcla sometida a agitación. Porcentaje de grasa de la mezcla: 30% y temperatura de ensayo: 5 ºC

**Figura 3.** Grasa libre del suero proveniente de minicuajadas elaboradas con crema tratada (por duplicado).

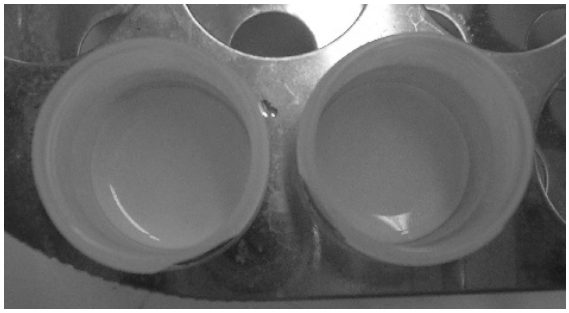

**Figura 4.** Grasa libre del suero proveniente de minicuajadas elaboradas con crema nativa (por duplicado).

## CONCLUSIONES

A bajas temperaturas, las mezclas con mayor contenido de MG fueron las que experimentaron mayor rotura del glóbulo graso cuando se utilizó la agitación mecánica. En efecto, la agitación resultó el tratamiento más efectivo y repetitivo, comparándolo con la recirculación en bomba.

Con respecto a la elaboración de las minicuajadas con crema intervenida o nativa, el contenido de grasa total y de grasa libre en el suero de las mismas fue muy bajo. Sin embargo, se visualizaron gotas de grasa libre en los sueros de las cuajadas tratadas.

De esta manera, se logró identificar un método de tratamiento para la leche de elaboración de quesos duros que reduce la compartimentalización inicial entre enzimas lipolíticas y su sustrato, sin provocar cambios en la retención de la MG en la matriz proteica del queso. Actualmente esta intervención tecnológica se aplica a la elaboración de quesos duros a escala piloto.
En este trabajo se seleccionaron los tratamientos más adecuados para la leche de elaboración y en investigaciones en curso se determina su impacto en la lipólisis durante la maduración de quesos duros de pasta cocida.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Collins Y, McSweeney PLH, Wilkinson, M. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. International Dairy Journal, 13: 841-846.

Deeth, H. 2005. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. International Dairy Journal 16: 555-562.

Evers,JM. 2004a. The milkfat globule membrane-compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell. International Dairy Journal, 14: 661-674.

Evers, JM. 2004b. The milkfat globule membrane-methodologies for measuring milkfat globule (membrane) damage. International Dairy Journal, 14: 747-760.

FIL-IDF (1982). Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia secca. Metodo di riferimento Nº 4 A. International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica, pág.184-188.

FIL-IDF (1997). Lait produits laitiers. Determination de la teneur en matiere grasse. Guide de directives generales appliquees aux methodes butyrometriques. Norme FIL Internationale 152A :1997, Bruselas, Bélgica.

Hickey DK., Kilcawley K.N, Beresford TP, Wilkinson MG. 2007. Lipolysis in Cheddar Cheese Made from Raw, Thermized and Pasteurized Milks. American Dairy Association, 90: 47-56.

Lopez C, Camier B, Gassi JY. 2007. Development of the milk fat microstructure during the manufacture and ripening of Emmental cheese observed by confocal laser scanning microscopy. International Dairy Journal, 17 : 235-247.

# Coeficientes de actividad a dilución infinita en tocoferol, tocoferol-triacetin y tocoferol-aceite de girasol

# Activity coefficients to infinite dilution in tocopherol, triacetin-tocopherol and tocopherol-sunflower oil

Mateos L (1), Foco G (1), Bottini S (1), Crapiste G (1)

PLAPIQUI (Universidad Nacional del Sur-CONICET), Argentina.
lmateos@plapiqui.edu.ar

## RESUMEN

El modelado y simulación del proceso de desodorización requiere conocer la dependencia con la temperatura del coeficiente de actividad a dilución infinita del α-tocoferol. El objetivo del presente trabajo fue la determinación de coeficientes de actividad a dilución infinita por cromatografía gas-líquido, debido a que no se cuentan con datos bibliográficos. De esta manera se generó una base de datos experimentales que permitieron establecer parámetros para caracterizar las interacciones entre pares de grupos estructurales. Luego, dichos parámetros se incorporaron a un modelo de contribución grupal para predecir sistemas de fase en equilibrio. Finalmente, a partir de las predicciones del modelo a contribución grupal se modeló la dependencia con la temperatura del coeficiente de actividad del tocoferol en el aceite.

Los coeficientes de actividad a dilución infinita fueron medidos por cromatografía gas-líquido. La fase estacionaria de las distitnas columnas rellenas, fueron preparadas disolviendo en cloroformo masas conocidas de los distintos solventes y un soporte inerte (Chromosorb W60/80 mesh, Johns Manivelle), a una relación másica de tres partes de Chromosorb por una parte de solvente. El cloroformo fue luego evaporado de la mezcla en un roto-evaporador a baja temperatura (30$^{o}$C) y bajo nitrógeno. Columnas de acero inoxidable, de 1/8 de diámetro externo por 2 m de largo, fueron empacadas con masas conocidas de fase estacionaria (aproximadamente 4 g). Los solventes utilizados para preparar el relleno para las distintas experiencias fueron, columna 1: tocoferol (100 % p/p), columna 2: tocoferol-triacetin (50-50 % p/p), columna 3: tocoferol-triacetin (80-20 % p/p), columna 4: tocoferol-triacetin (20-80 % p/p), y columna 5: tocoferol-aceite de girasol (50-50 % p/p). Las temperaturas a las cuales se realizaron las distintas experiencias fueron 323, 353 y 373 K.

A partir del presente trabajo se ha generado una importante información experimental dada la variedad de componentes utilizados y las distintas temperaturas de operación. Se han utilizado más de 15 solutos para cada experiencia. Con estos datos experimentales se podrían obtener los parámetros para caracterizar los grupos estructurales presentes en el tocoferol y ampliar así la base de datos del modelo de contribución grupal. Para el tocoferol no están determinados los parámetros de volúmen R y de área Q de todos los grupos funcionales, necesarios en el modelo UNIFAC. Como así tampoco los parámetros de interacción binarios. A partir del presente trabajo se caracterizó al grupo TCF presente en la molécula de tocoferol y se determinaron los parámetros de interacción entre los grupos TCF/CH2, CH2/TCF, TCF/TGL y TGL/TCF.

## ABSTRACT

The modeling and simulation of the desodorización process requires knowing the dependence with the temperature of the activity coefficient to infinite dilution of α-tocopherol. The objective of the present work was the determination of activity coefficients to infinite dilution by cromatography gas-liquid, because they are not had bibliographical data. This way an experimental database was generated that allowed to establish parameters to characterize the interactions among even of structural groups. Then, these parameters were incorporated to a model of grupal contribution to predict phase systems in balance. Finally, starting from the predictions of the model to contribution grupal the dependence with the temperature of the coefficient of activity of the tocopherol in the oil was modeled.

The infinite dilution activity coefficients were measured by gas-liquid chromatography. The stationary phase for each column was prepared by dissolving, in chloroform, known masses of solvent and inert

support (Chromosorb W60/80 mesh, Johns Manivelle), at a ratio of 3 parts by mass of chromosorb per part of solvent. The chloroform was then slowly evaporated from the mixture, in a roto-evaporator at low temperature (30°C) and under a dry nitrogen atmosphere. Stainless steel tubes, 1/8 in. external diameter by 2 m long, were packed with known masses of about 4 g of each stationary phase. Solvents used to prepare the filling for the various experiments were, column 1: tocopherol (100% w / w), column 2: triacetin-tocopherol (50-50% w / w), column 3: triacetin-tocopherol (80 -- 20% w / w), column 4: triacetin-tocopherol (20-80% w / w), and column 5:-tocopherol, sunflower oil (50-50% w / w). The temperatures for the different experiments were 323, 353 and 373 K.
From this work has generated considerable experimental information given the variety of components used and the different operating temperatures. Have been used more than 15 solutes for each experience. With these experimental data could be obtained for the parameters characterizing the structural groups present in the tocopherol and expand the database of the group contribution model. For tocopherol are not certain volume parameters R and Q area of all functional groups needed for the model UNIFAC. As neither the binary interaction parameters. Since this work was the group in the TCF tocopherol molecule and identified the parameters of interaction between groups TCF/CH2, CH2/TCF, TCF / TGL and TGL / TCF.

**PALABRAS CLAVE**: *coeficiente de actividad, tocoferol, cromatografía gas-líquido.*

**KEYWORDS**: *activity coefficient, tocopherol, cromatography gas-liquid.*

## INTRODUCCIÓN

La desodorización es la última etapa del proceso de refinado de aceites vegetales y está orientada a eliminar los ácidos grasos libres y productos volátiles que confieren sabores y olores indeseables a los aceites comestibles. La desodorización se realiza por un proceso de destilación y arrastre con vapor a relativamente altas temperaturas (200-270 °C) y bajas presiones (1-8 mm Hg). La desodorización es factible debido a la gran diferencia de volatilidades entre los triglicéridos presentes en los aceites neutralizados y blanqueados, prácticamente no volátiles, y las sustancias que se desea eliminar. La utilización de un gas inerte o vapor de arrastre aumenta la vaporización y reduce la temperatura necesaria para la destilación.
Durante el proceso también se eliminan parcialmente otros componentes importantes de los aceites, como tocoferoles, tocotrienoles, esteroles y esteres grasos. Además, pueden formarse isómeros trans y originarse pérdidas de triglicéridos por arrastre o degradación térmica e hidrolítica. La aplicación de bajas presiones durante la operación protege el aceite caliente de la oxidación atmosférica, reduce el daño térmico y la hidrólisis indeseada del aceite por el agua, y reduce la cantidad necesaria de vapor.
En general los compuestos indeseables en el aceite sin desodorizar tienen menor presión de vapor que los ácidos grasos, de modo que cuando el contenido de los ácidos grasos libres se reduce de 0,01-0,03% y el valor de peróxido es cero en el aceite desodorizado, la mayoría de estos compuestos han sido eliminados.
Para modelar y simular el proceso de desodorización es necesario conocer, entre otras propiedades de los compuestos presentes, la dependencia con la temperatura del coeficiente de actividad del tocoferol infinitamente diluido en el aceite. Es por ello que se realizó el siguiente trabajo para determinar coeficientes de actividad a dilución infinita por cromatografía gas-líquido (de distintos solventes y distintos solutos). Para luego, a partir de los valores experimentalmente obtenidos, poder modelar la dependencia del coeficiente de actividad con la temperatura.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción de la técnica: Cromatografía gas-líquido

Los coeficientes de actividad a dilución infinita fueron medidos por cromatografía gas-líquido (Din *et al.* 1995, Foco *et al.* 1996, Bermudez *et al.* 2000, Ferreira y Foco 2003). El volumen específico de retención $V_g^0$ a 273,15 K , es decir el volumen normalizado del gas carrier necesario para que el soluto i eluya de una columna con una masa de solvente $W_S$, se calcula a partir de las mediciones del tiempo de retención ($t_i$ ) del soluto i a partir de la Ecuación 1:

$$V_g^0 = (t_i - t_a)\,F\left(\frac{273{,}15}{T_f}\right)\left(\frac{\left(P_f - P_w^S\right)}{P_0}\right)\frac{J_3^2}{W_S} \qquad [1]$$

donde:

$t_a$ es el tiempo muerto o eltiempo de retención del gas inerte (aire)

F es el flujo de gas carrier medido a la temperatura $T_f$ y presión $P_f$ en un medidor de película de detergente

$P_w^S$ es la presión de vapor saturado del agua a $T_f$

$P_0$ es la presión de salida de la columna

$J_3^2$ es un factor de corrección para el gradiente de presión y la compresibilidad del gas dentro de la columna.

La Ecuación 2 representa la relación termodinámica entre el volumen de retención $V_g^0$ y el coeficiente de actividad a dilución infinita $\gamma_i^\infty$ del soluto i en el solvente s.

$$\ln\left(\gamma_i^\infty\right) = \ln\left(\frac{273.15\ R}{M_S P_i^S V_g^0}\right) - \frac{\left(B_{ii} - v_i\right)P_i^S}{RT} \qquad [2]$$

donde:

$B_{ii}$, $v_i$ y $P_i^S$ representan, respectivamente el coeficiente virial secundario, el volumen molar del líquido y la presión de vapor del soluto i a la temperatura de la columna T

R constante universal de los gases

$M_S$ peso molecular del solvente

Para las mediciones se utilizó un cromátografo Varian (Modelo 3700) con un detector FID y un integrador Packard (Modelo 3392). El gas carrier fue hidrógeno con un caudal de flujo de 30 $cm^3$/min, un burbujometro fue utilizado para medir los flujos del gas. Las presiones de entrada y salida de la columna se midieron con un transductor de quarzo (Paroscientific). La caída de presión en la columna estuvo entre 400-600 mbar. Los solutos fueron inyectados en el gas carrier usando una jeringa Hamilton de 1μL.

La fase estacionaria para el relleno de las distintas columnas fue preparada disolviendo en cloroformo masas conocidas de los distintos solventes y un soporte inerte (Chromosorb W60/80 mesh, Johns Manivelle), con una relación másica de tres partes de Chromosorb por una parte de solvente. El cloroformo fue luego evaporado de la mezcla en un rotoevaporador a baja temperatura (30 °C) y bajo atmósfera de nitrógeno. Columnas de acero inoxidable, de 1/8 de diámetro externo por 2 m de largo, fueron empacadas con masas conocidas de fase estacionaria (aproximadamente 4 g). Con el fin de obtener el volumen muerto o el tiempo de retención $t_a$, siempre se inyectó aire junto con cada soluto. Reactivos de Aldrich Chem. Co. fueron usados en las experiencias.

## Esquema de experimentos

En la **Tabla 1** se detallan los solventes utilizados para preparar el relleno de cada columna para las distintas experiencias realizadas. Las temperaturas a las cuales se llevaron a cabo dichas experiencias fueron 323, 353 y 373 K.

**Tabla 1**. Solventes de las distintas columnas.

| | Solventes | %Solventes |
|---|---|---|
| Columna 1 | Tocoferol(1) | 100 |
| Columna 2 | Tocoferol –Triacetin(2) | 50-50 |
| Columna 3 | Tocoferol -Triacetin | 80-20 |
| Columna 4 | Tocoferol -Triacetin | 20-80 |
| Columna 5 | Tocoferol – Aceite(3) | 50-50 |

(1) (±) α-tocopherol 95% Sigma.
(2) Triacetin 99+% Aldrich Chemical Company.
(3) Aceite comercial de girasol.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 2** contiene los coeficientes de actividad a dilución infinita de los diferentes solutos para las distintas columnas preparadas (**Tabla 1**).

**Tabla 2.** Coeficientes de actividad a dilución infinita en las distintas columnas preparadas.

| SOLUTO | γ∞ (columna 1) | | | γ∞ (columna 2) |
|---|---|---|---|---|
| | 323 K | 353 K | 373 K | 324 K |
| Heptano | 1,2593 | 1,1602 | 1,123 | 2,9006 |
| Hexano | 1,2173 | 1,1147 | 1,0481 | 2,4102 |
| Ciclohexano | 0,8846 | 0,7959 | 0,7709 | 1,8435 |
| Isoctano | 1,3869 | 1,2489 | 1.1986 | 3,3859 |
| Benceno | 0,7261 | 0,6477 | 0,6169 | 0,8737 |
| Tolueno | _ | 0,6626 | 0,6583 | _ |
| 1-Hexeno | 1,0622 | 0,9719 | 0,9358 | 1,9641 |
| Metanol | 1,8992 | 1,8515 | 1,7317 | 2,3882 |
| Etanol | 1,6625 | 1,606 | 1,5391 | 1,9291 |
| Acetona | 0,561 | 0,6658 | 0,7104 | 0,9378 |
| 1-Propanol | 1,5259 | 1,3958 | 1,3786 | 2,1592 |
| 2-Propanol | 1,4364 | 1,3504 | 1,2966 | 1,7699 |
| Cloroformo | 0,5015 | 0,494 | 0,4977 | 0,4558 |
| Tricloroetileno | 0,5817 | 0,5677 | 0,5681 | 0,7094 |
| 1-2 DCE | 0,7627 | 0,6959 | 0,6739 | 0,6273 |
| Metiletilacetona | 0,4878 | 0,5731 | 0,6272 | _ |
| Etil Benceno | _ | 0,7647 | 0,7283 | _ |
| Anisol | _ | 0,7734 | 0,7604 | _ |

**Tabla 2**. Continuación.

| SOLUTO | γ∞ (columna 3) | | γ∞ (columna 4) | | γ∞ (columna 5) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 324 K | 354 K | 324 K | 354 K | 324 K | 354 K | 374 K |
| Heptano | 1,953 | _ | 7,0213 | 5,1054 | 0,9879 | 0,9295 | 0,8283 |
| Hexano | 1,7896 | 1,5402 | 6,0374 | 4,5661 | 0,8122 | 0,8998 | 0,7926 |
| Ciclohexano | 1,299 | _ | 4,0643 | 3,0835 | 0,7041 | 0,6236 | 0,5518 |
| Isoctano | 2,0497 | _ | 7,5696 | 5,4923 | 1,0834 | 0,994 | 0,8866 |
| Benceno | 0,8547 | _ | 1,078 | 1,129 | 0,5417 | 0,4534 | 0,4204 |
| Tolueno | _ | _ | _ | _ | _ | 0,4947 | 0,4509 |
| 1-Hexeno | 1,4827 | _ | 3,3003 | 3,1375 | 0,7036 | 0,73 | 0,677 |
| Metanol | 2,2185 | 2,1601 | 2,404 | 1,5909 | 2,3812 | 1,8216 | 1,4975 |
| Etanol | 2,1746 | 1,8676 | 2,6881 | 1,6324 | 1,8793 | 1,6396 | 1,2982 |
| Acetona | 0,9109 | 0,8739 | 1,2303 | 1,0667 | 0,8432 | 0,7939 | 0,7188 |
| 1-Propanol | 2,5225 | _ | 2,5911 | 1,5719 | 1,8287 | 1,4367 | 1,1308 |
| 2-Propanol | 1,8494 | _ | 2,6151 | 1,5557 | 1,7986 | 1,3362 | 1,0884 |
| Cloroformo | 0,4718 | _ | 1,4968 | 0,5319 | 0,297 | 0,3285 | 0,3211 |
| Tricloroetileno | 0,6895 | _ | 1,0535 | 1,0653 | 0,4846 | 0,3962 | 0,3804 |
| 1-2 DCE | 0,8113 | 0,7578 | 0,7238 | 0,778 | 0,4616 | 0,4884 | 0,4534 |
| Metiletilacetona | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |
| Etil Benceno | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |
| Anisol | _ | _ | _ | _ | _ | _ | _ |

Para el tocoferol no están determinados los parámetros de volumen R y de área Q de todos los grupos funcionales, necesarios en el modelo UNIFAC. Es por ello que se arma la molécula teniendo en cuenta un nuevo grupo (TCF) el cual será caracterizado, más los grupos funcionales restantes, que forman parte de la cadena hidrocarbonada (**Figura 1**).

El método de contribución grupal combina el concepto de solución de grupos funcionales con un modelo de estimación para los coeficientes de actividad, basado en la teoría cuasi química de mezclas líquidas (UNIQUAC).

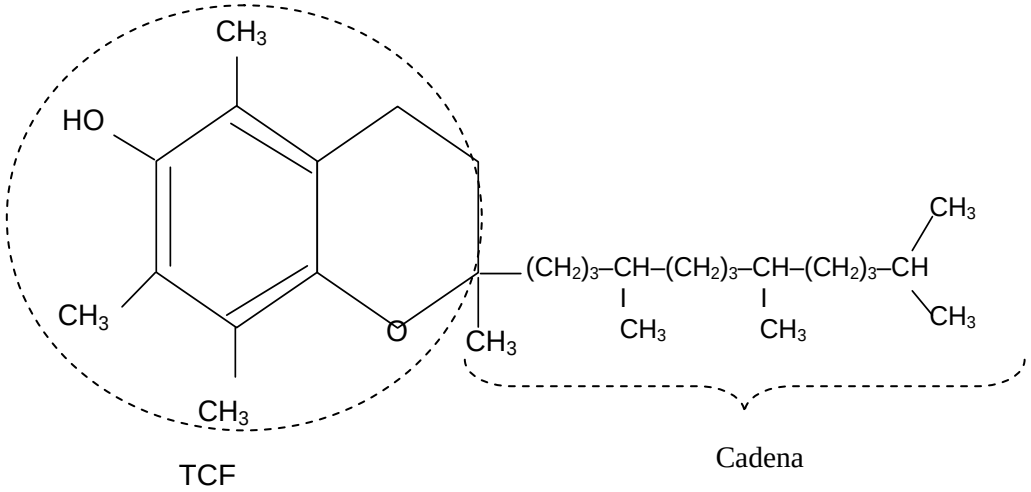


**Figura 1.** Esquema de una molécula de α-Tocoferol.

La idea fundamental del modelo resultante, UNIFAC solución grupal, es utilizar datos existentes de fases en equilibrio para predecir sistemas de fase en equilibrio de los cuales no existen datos experimentales.
Conceptualmente el modelo UNIFAC sigue un modelo en el que los coeficientes de actividad en una mezcla dada, están relacionados con las interacciones entre los grupos estructurales.
El modelo implica lo siguiente: una reducción conveniente de datos de coeficiente de actividad experimentalmente obtenidos, para establecer parámetros que caracterizan las interacciones entre pares de grupos estructurales en sistemas de no electrolitos; y el uso de esos parámetros para predecir coeficientes de actividad de otros sistemas los cuales no han sido estudiados experimentalmente pero que contienen los mismos grupos funcionales.
El coeficiente de actividad molecular está determinado por dos términos: una parte provee la contribución debida a las diferencias en el tamaño molecular y el otro provee la contribución debida a las interacciones moleculares. La primera parte está arbitrariamente estimada por el uso de la ecuación atérmica de Flory-Huggins, y la ecuación de Wilson, aplicada a grupos funcionales, es elegida para estimar la segunda parte (Fredenslund 1975).
El nuevo grupo TCF se arma con subgrupos conocidos del modelo UNIFAC, para luego poder calcular los valores de los parámetros R y Q que lo caracterizan. En la **Tabla 3** se describen los subgrupos del TCF y los correspondientes valores de R y Q, dando como resultado para este nuevo grupo, al multiplicar el valor de los parámetros por la cantidad de subgrupos presentes, R=8,1616 y Q=6,324. En la **Tabla 4** se describen los subgrupos del modelo UNIFAC que forman la cadena hidrocronada del α-tocoferol.

**Tabla 3.** Cantidad de subgrupos presentes en grupo TCF del tocoferol. Valores de los parámetros R y Q de los subgrupos.

| TCF / Subgrupo | $CH_2$ (2) | AC (11) | $ACCH_3$ (12) | OH (15) | $CH_2O$ (26) |
|---|---|---|---|---|---|
| R | 0,6744 | 0,3652 | 1,2663 | 1 | 0,9183 |
| Q | 0,540 | 0,120 | 0,968 | 1,2 | 0,780 |
| Cantidad en TCF | 2 | 3 | 3 | 1 | 1 |

**Tabla 4.** Cantidad de subgrupos presentes en la cadena hidrocarbonada que forma el α-tocoferol.

| Molécula | Subgrupo | Cantidad en la cadena hidrocarbonada |
|---|---|---|
| $CH_3$ | 1 | 5 |
| $CH_2$ | 2 | 9 |
| CH | 3 | 3 |

A partir de los datos experimentales (columna 1) y una vez identificado el tocoferol por los parámetros R y Q, se calcularon los parámetros de interacción binarios (A) de los grupos funcionales que no estaban presentes en el modelo UNIFAC, es decir, entre el grupo TCF y alcanos, resultando:

$$A_{TCF/CH2} = -184{,}2$$

$$A_{CH2/TCF} = 479{,}9$$

A partir de los datos experimentales obtenidos con la columna 2 se obtienen los parámetros de interacción binaria entre el grupo TCF y el grupo definido en trabajos previos (Din *et al.* 1995) como TGL presente en la molécula de triacetin (y en la molécula de triglicérido que representa al aceite), como muestra la **Figura 2**.

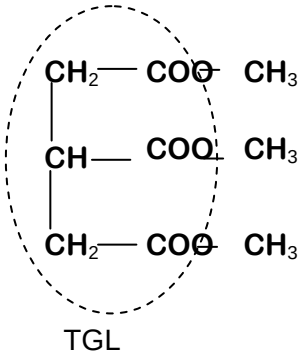


**Figura 2.** Esquema de una molécula de triacetin.

Dado que los parámetros de interacción se pueden obtener sólo para mezclas binarias, se define un pseudosolvente formado por el α-tocoferol y el triacetin. Los valores de los parámetros R y Q que lo caracterizan, se calcularon teniendo en cuenta la fracción molar de cada compuesto presente en la experiencia realizada con la columna 2 ($x_{tocoferol} = 0{,}33642$, $x_{triacetin} = 0{,}66358$) y los grupos funcionales que conforman el pseudosolvente, resultando dichos parámetros: R=11,7346 y Q=9,727. Luego con los valores de los coeficientes de actividad para los distintos solutos, se obtuvieron los parámetros de interacción, resultando:

$$A_{TCF/TGL} = 211$$

$$A_{TGL/TCF} = -\ 71{,}61$$

## Variación con la temperatura del coeficiente de actividad

Una vez caracterizados todos los grupos del tocoferol, se realizaron las predicciones de coeficientes de actividad a dilución infinita del tocoferol en los distintos aceites. Se asume que no existe interacción entre el tocoferol y los demás compuestos que están infinitamente diluidos en el aceite: ácidos grasos libres, mono- y diglicéridos. La validez de esta simplificación se comprobó al calcular los coeficientes de actividad en mezclas binarias (aceite más un ácido graso, aceite más un monoglicérido o aceite más un diglicérido) y en mezclas multicomponentes (aceite, ácidos grasos libres, mono- y dilgicérido). Se obtuvo que el valor del coeficiente de actividad a dilución infinita de un determinado compuesto a una dada temperatura fue prácticamente el mismo para el sistema binario o para el multicomponente.

En el caso del aceite se considerará que está formado por moléculas de triglicérido y cuyos ácidos grasos tienen una composición igual a la del aceite elegido (Ziller 2001). En la **Figura 3** se puede ver como se agrupan las moléculas para formar los grupos funcionales, de un aceite vegetal, incluidos en UNIFAC.

Para estimar el valor del coeficiente de actividad se realiza una corrección en uno de los términos que representa el volumen molecular, el cual se encuentra elevado a una potencia igual a uno. Esta corrección se realiza en forma empírica y con la ayuda de datos experimentales de coeficientes de actividad. El valor de esa potencia estará en un rango de 2/3-1. Este valor se reduce de 1 a 2/3 ya que las moléculas cuando interactúan ven superficies y no volúmenes. Al elevar el término volumétrico a una potencia igual a 2/3 lo que se hace es transformar el volumen en área.

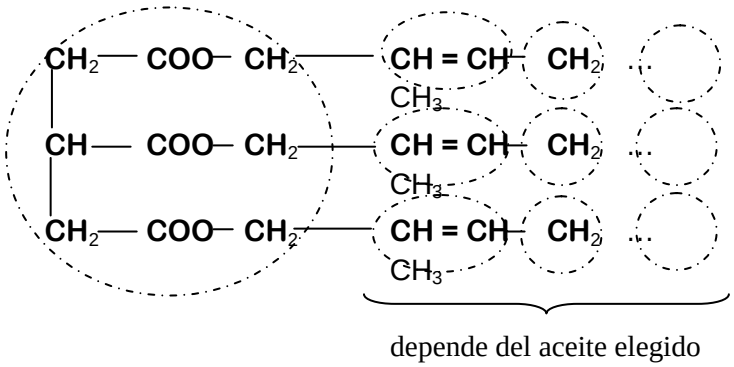


**Figura 3.** Representación de una molécula de triglicérido.

El modelo de contribución de grupo UNIFAC ha sido usado para calcular el coeficiente de actividad a dilución infinita, aplicando un exponente p<1 en la definición de la fracción de volumen de Flory $\Phi_i$ (Foco 1996).

La matriz de parámetros de interacción utilizada para calcular los coeficientes de actividad a dilución infinita a partir del modelo UNIFAC se describe en la **Tabla 5**. Las predicciones del modelo a distintas temperaturas se presentan en la **Figura 4**.

**Tabla 5.** Parámetros de interacción entre los distintos grupos.

| | $CH_2$ | C=C | TGL | TCF |
|---|---|---|---|---|
| $CH_2$ | 0 | 86,02 | 438,3 | 479,9 |
| C=C | -35,36 | 0 | 163,8 | 479,9 |
| TGL | 328,8 | 294,1 | 0 | -71,61 |
| TCF | -184,2 | -184,2 | 211,0 | 0 |

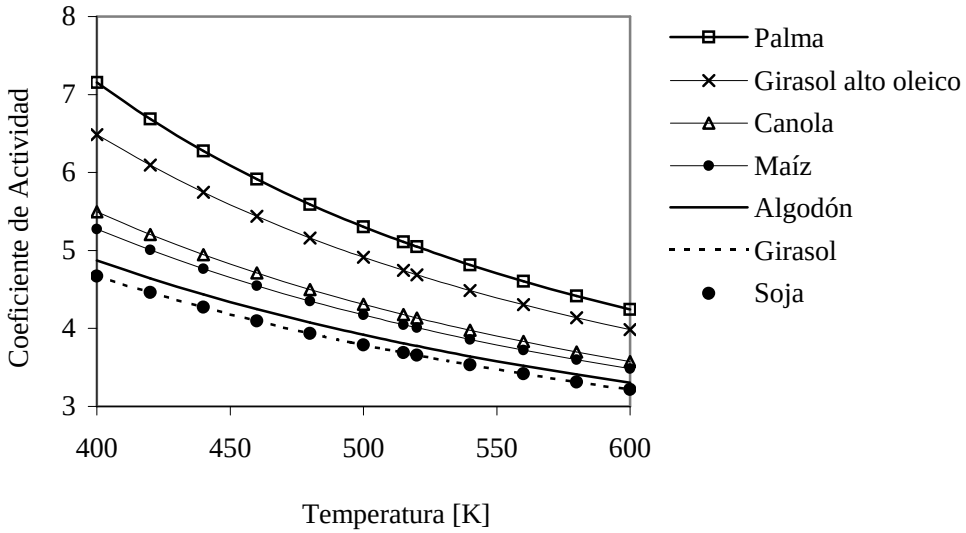


**Figura 4**. Variación del coeficiente de actividad con la temperatura para distintos aceites vegetales.

Los valores obtenidos para cada aceite en función de la temperatura se ajustaron luego con un polinomio de segundo orden del tipo:

$$\gamma^{\infty} = A + BT + CT^2 \qquad [3]$$

donde:

$\gamma^{\infty}$ coeficiente de actividad a dilución infinita

A, B y C constantes

T temperatura en K.

En la **Tabla 6** se muestran los valores de las constantes del polinomio para cada aceite.

**Tabla 6**. Constantes para el ajuste de la variación con la temperatura del coeficiente de actividad del tocoferol en los distintos aceites.

| | **Girasol Soja** | **Maíz** | **Algodón** | **Palma** | **Oliva** | **Canola** | **Girasol alto oleico** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 11,2346 | 13,7429 | 12,0379 | 22,28877 | 18,007 | 14,6675 | 19,1038 |
| B | -0,0225747 | -0,0294396 | -0,02474 | -0,0536809 | -0,0413844 | -0,0319849 | -0,0444838 |
| C | $1{,}53711\ 10^{-5}$ | $2{,}05961\ 10^{-5}$ | $1{,}70006\ 10^{-5}$ | $3{,}94238\ 10^{-5}$ | $2{,}98038\ 10^{-5}$ | $2{,}25352\ 10^{-5}$ | $3{,}22011\ 10^{-5}$ |

## CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo se ha generado una importante información experimental dada la variedad de componentes utilizados y las distintas temperaturas de operación. Se han utilizado más de 15 solutos para cada experiencia. Con estos datos experimentales se pudo obtener los parámetros para caracterizar los grupos estructurales presentes en el tocoferol y ampliar así la base de datos del modelo de contribución grupal. Además se pudo modelar la dependencia con la temperatura del coeficiente de actividad del tocoferol en los distintos aceites.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Bermudez A, Foco G, Bottini SB 2000. Infinite dilution activity coefficients in tributyl phosphate and triacetin. J. Chem. Eng. Data. 45(6): 1105-1107.

Din C, Foco G, Fornari T, Brignole EA, Bottini SB. 1995. Infinite dilution activity coefficients in triglycerids. Lat. Am. Applied Research. 25(4): 243-247.

Ferreira O, Foco GM. 2003. Infinite dilution activity coefficients of solvents in fatty oil derivatives. Lat. Am. Applied Research. 33(3): 257-260.

Foco G, Bermudez A, y Bottini S. 1996. Infinite dilution activity coefficients in mono-, di-, and tripalmitin and palmitic acid. J. Chem. Eng. Data. 41(5): 1071-1074.

Fredenslund A, Jones RL, Prausnitz JM. 1975. Group-Contribution Estimation of Activity Coefficients in Nonideal Liquid Mixtures. AICHE Journal. 21 (6): 1086-1099.

Ziller S. 2001. Grasas y aceites alimentarios. Parte 4. Aceites y Grasas. Tomo XI (44)3: 366-372.