Ciencia y Tecnología de los Alimentos: Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales

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

Córdoba, Argentina. 2009

Daniel Wunderlin y Rafael Borneo
Editores

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Avances en Análisis Físicos, Químicos y Sensoriales. Trabajos completos presentados al III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Córdoba, Argentina. 2009.
419 p., 24,5x17 cm
ISBN: 978-987-24620-8-6
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

ÍNDICE

Prólogo 2
Agudelo L. M. 3
Alianelli L. M. 12
Bosisio N. A. 20
Brousse M. M. 28
Caballero M. S. 35
Camino N. A. 45
Capitani M. I. 55
Chaillou L. L. 61
Ciapini M. C. 68
Coa M. 73
Correa M. J. 81
Deladino L. 90
Demmel G. I. 97
Demmel G. I. 106
Escalada M. A. 116
Fabani M. P. 123
Farías M. E. 133
Farroni A. 140
Felberg I. 147
Goldner M. C. 154
Iglesias B. F. 164
Ixtaina V. 172
Ixtaina V. 179
Lasanta C. 185
Linlaud N. 192
López L. 198
Matiacevich S. B. 207
Medina A. V. 213
Moro A. 220
Naranjo G. B. 238
Nolasco S. M. 247

Pennisi Forell S. C. 254
Rabey M. 263
Ramo P. 271
Rebechi S. R. 279
Repo de Carrasco R. 288
Roldán A. M. 297
Sabbag N. G. 306
Salcedo C. L. 312
Santana I. 319
Schmalko M. E. 326
Scipioni G. P. 333
Sobral P. A. 339
Sosa N. 348
Suárez D. 357
Vázquez A. M. 363
Vázquez A. M. 372
Vergara Roig V. A. 382
Villarreal M. E. 390
Wolf I. 399
Ciappini M. C. 408

PRÓLOGO

Sin dudas, la calidad de los alimentos que se consumen en nuestra región son motivo de preocupación por parte de empresarios, organismos de control, estados e individuos. En particular, los consumidores manifiestan una creciente preocupación por la calidad e inocuidad de sus alimentos. Tanto la calidad como la inocuidad de un producto pueden cuidarse verificando buenas prácticas de manufactura, procesos de análisis de riesgo (HACCP), certificaciones de calidad (ISO y otras). No obstante, siempre la palabra definitiva la tiene el departamento de aseguramiento de la calidad, en particular los laboratorios y grupos de individuos dedicados al control de la calidad de los alimentos.

En la actualidad, el control de calidad de alimentos involucra análisis físicos, químicos, microbiológicos y, particularmente, verificación de las características organolépticas/ sensoriales de un producto. Cada uno de estos análisis tiene un sentido y una importancia diferente en función del alimento que se requiera controlar. El análisis microbiológico es generalmente un modo de evaluar la seguridad del alimento, tratando de evitar transmisión de enfermedades por ingesta de productos contaminados (ETA). Los análisis físicos y químicos buscan diversos objetivos. Por un lado se busca determinar la presencia de tóxicos o toxinas dañinos para la salud, por otro lado se busca verificar la calidad nutricional de los alimentos, también es frecuente el uso de estos análisis como mecanismo de verificación del proceso y componentes utilizados en su producción. Más recientemente, el análisis químico de alimentos se está usando para evaluar la autenticidad, la procedencia y aún las cualidades medicinales de los alimentos que se consumen. En este punto, los análisis físicos y químicos constituyen una herramienta indispensable para verificar el origen de los alimentos, un concepto que se ha dado en llamar trazabilidad de productos. La verificación de propiedades benéficas para la salud constituye un área de creciente desarrollo en la ciencia de los alimentos (nutracéutica). Finalmente, el análisis sensorial cumple una función primordial a la hora de garantizar la satisfacción del consumidor. Entre los administradores de empresas con sistemas de calidad certificados se reconoce que a la calidad de un alimento la define el consumidor, no el productor. En efecto, un alimento que sea mal percibido o apreciado por un consumidor no tendrá éxito en el mercado, aunque las materias primas y los procesos productivos utilizados en su confección sean de primer nivel.

En resumen, cada día se aprecia más la necesidad del análisis de alimentos; tanto por parte de la población que los consume, como por parte de los empresarios que los producen, pasando por los organismos encargados de la verificación de los mismos.

Este libro presenta un resumen del estado del arte sobre el análisis de alimentos en Sudamérica. Podrán observarse diferencias entre los métodos utilizados por investigadores de distintas regiones, que están condicionados por distintos presupuestos y demandas de sus sociedades. No obstante, todos los trabajos muestran la gran preocupación de nuestros investigadores para tratar de colaborar en la verificación de la calidad e inocuidad alimentaria en la región. En particular, podrán observar el gran interés de nuestros investigadores en resaltar el valor de los productos de su región, presentándolos como buenas alternativas frente a alimentos de consumo masivo.

Daniel Wunderlin
Rafael Borneo

Evaluación del desarrollo de pardeamiento en frutas deshidratadas de diferente opacidad

Evaluation of browning development in dried fruits with different opacity

Agudelo LM, Acevedo N, Schebor C[(1)] y Buera MP[(1)]

Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. (1428) Ciudad de Buenos Aires. ARGENTINA. TEL/FAX: 0054114576-3366 e-mail: magudelo@di.fcen.uba.ar [(1)]Miembros de CONICET, Argentina.

RESUMEN

La reacción de Maillard es relevante para definir la estabilidad de alimentos deshidratados. Su cinética debe ser estrictamente controlada para evitar los efectos negativos (pérdida de valor nutritivo, desarrollo de aromas no deseados, cambios de color) y favorecer los efectos positivos (desarrollo de antioxidantes naturales y aromas agradables). En los últimos años se ha puesto énfasis en nuevas técnicas basadas en sistemas de visión computarizada y análisis de imágenes para cuantificar y caracterizar distintas propiedades relacionadas con la apariencia de los alimentos, como tamaño, forma, color y textura visual. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo de pardeamiento no enzimático en muestras que presentan diferencias de opacidad al variar la actividad de agua. Se emplearon muestras de melón y pera deshidratados dispuestos de dos formas: discos de tejido intacto y polvos. Se empleó un sistema de análisis de imágenes. Las muestras se liofilizaron y equilibraron en un amplio rango de a_w (actividad de agua) entre 0,11-0,84. Los sistemas se colocaron entre dos placas de vidrio selladas herméticamente para evitar pérdida de agua y se incubaron a 45ºC. Se analizó el cambio de reflectancia de las muestras utilizando un sistema que consta de una iluminación estandarizada, adquisición de imágenes a través de una cámara digital acoplada a una PC (dentro de una caja gris Munsell 7). Los resultados mostraron un aumento en el desarrollo de pardeamiento con el tiempo y la actividad de agua. Las muestras de melón presentaron mayor grado de pardeamiento y mayor velocidad de pardeo que las de pera. La variable L* fue adecuada para evaluar el oscurecimiento de las muestras en discos, que mantuvieron su opacidad. En cambio, la opacidad de las muestras en polvo disminuyó notoriamente a partir de a_w 0,22 y por lo tanto se analizaron empleando la teoría de Kubelka-Munk, mediante mediciones con fondo blanco y fondo negro. Las características de apariencia de frutas deshidratadas dependen fundamentalmente del contenido de agua y del tamaño de partícula de las muestras, afectando la determinación del grado de pardeamiento. Por lo tanto, deben seleccionarse el fondo sobre el cual se mide la muestra y las variables más representativas de los cambios. El sistema de análisis de imágenes resultó apropiado para determinar los cambios de apariencia durante el almacenamiento de frutas deshidratadas. Es un método sencillo, rápido, económico y no destructivo de la muestra que podría tener gran aplicación en la industria de alimentos.

ABSTRACT

Maillard reaction is relevant to define dehydrated food stability. Its kinetics should be strictly controlled to avoid negative effects (development of off flavors, color changes) and favor positive effects (development of natural antioxidants and nice aromas). In the last years new techniques have been developed based on computerized vision systems and image analysis to quantify and characterize different properties related to food appearance, like size, shape, color and visual texture. The objective of the present work was to evaluate the development of non-enzymatic browning in samples that show opacity changes with the increase of water activity (a_w). Intact tissue discs and powder of melon and pear samples were employed. The samples were freeze-dried and equilibrated in a broad range of a_w (0,11-0,84). Samples were placed inside rubber o-rings which in turn were sandwiched between two glass plates held hermetically with metal clamps to avoid water loss, and then were incubated at 45ºC. The changes in reflectance were analyzed using a computer vision system consisting of an illumination system, a digital camera (both inside a standardized grey box) and a PC. There was an increase in the browning development along time and pear samples showed higher rates than melon.

The variable L* was adequate to evaluate the darkening developed in the discs samples, that remained opaque. However, the opacity of the powdered samples diminished from a_w 0,22, thus they were analyzed through the Kubelka-Munk theory measuring them with white and black backgrounds. The appearance characteristics of dehydrated fruits basically depend on the water content and the particle size in the samples, affecting the determination of the degree of browning. Therefore, the background to measure the samples and the more representative variables should be properly selected. The image analysis system was appropriate to determine the appearance changes during storage of dehydrated fruits. It is a simple, fast, cheap and non-destructive method that can have ample application in food industry.

PALABRAS CLAVE: *pardeamiento, melón, pera, análisis de imágenes, Kubelka-Munk.*

KEYWORDS: *browning, melon, pear, image analysis, Kubelka-Munk.*

INTRODUCCIÓN

Los alimentos que contienen azúcares reductores y proteínas, son especialmente sensibles a las reacciones de pardeamiento; siendo la disminución de la solubilidad, la coloración y pérdida del valor nutricional las causas principales de deterioro asociadas al pardeamiento.

En muchos estudios la velocidad de pardeamiento no enzimático se relacionó con el contenido de agua y con la actividad de agua (Labuza *et al.* 1970). El agua es un factor importante en la reacción de Maillard, ya que ejerce su influencia controlando la viscosidad de la fase líquida y la disolución, concentración o dilución de los reactivos (Warmbier *et al.* 1976, Labuza *et al.* 1977). Se comporta además como un agente inhibidor, ya que es un producto de la reacción (Eichner y Karel 1972, Labuza *et al.* 1977, Labuza y Saltmarch 1981). Existe por lo tanto un compromiso entre la aceleración que produce el agua al disminuir la viscosidad y el efecto inhibitorio de la misma.

Estudios previos han demostrado que en sistemas sólidos o semisólidos, la velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático en función de la a_w presenta un máximo a valores de a_w entre 0,6 a 0,8 (Labuza y Saltmarch 1981).

La teoría de Kubelka Munk (Kubelka y Munk 1931) ha sido aceptada por su aplicabilidad práctica, particularmente en las industrias que utilizan colorantes y fundamentalmente en las fábricas que elaboran pulpa y papel. El primer postulado de la teoría de Kubelka Munk (KM) es que la iluminación sobre el medio difusor es a su vez totalmente difusa, de extensión “infinita” (esto es: no tiene bordes).

Esta teoría se aplica para comparar diferencias de color entre dos muestras. Se basa en mediciones de reflectancia de capas delgadas del material con fondo blanco y con fondo negro, consecutivamente (Buera y Resnik 1989).

Little (1964) determinó que para alimentos translucidos la medición directa de reflectancia (realizada para alimentos opacos), no es satisfactoria debido a la gran cantidad de interacciones que ocurren entre este tipo de materiales y la luz. La medición directa de una capa delgada de un material translúcido sobre un fondo blanco es suficiente para separar las muestras en el espacio de color y coincide con la apreciación visual. Sin embargo, Mackinney *et al.* (1966) y Little y Brinner (1981) encontraron que a través de los coeficientes de atenuación (K) y de dispersión (S) de Kubelka Munk mejora la separación de muestras de salsa de manzana y té, y de soluciones de café.

La practicidad de la teoría KM radica en que sólo utiliza dos variables para describir el fenómeno: el coeficiente de difusión (S) y el de absorción (K) (Lozano 1978).

En los últimos años se ha puesto énfasis en nuevas técnicas basadas en sistemas de visión computarizada y análisis de imágenes para la evaluación del grado de pardeamiento y de otras propiedades relacionadas con la calidad del alimento (Aguilera y Stanley 1999, Aguilera y Briones 2005). Los sistemas de visión computarizada utilizan dispositivos para la adquisición de imágenes, computadoras y programas de procesamiento de las imágenes para simular el rol de los ojos y el cerebro. La visión computarizada ofrece una gran resolución espacial ya que cubre todo el objeto de interés, lo cual no es posible con los colorímetros triestímulo que requieren mediciones del objeto punto a punto y proporcionan, por lo tanto, valores de color promedios de zonas muy pequeñas. Las cámaras digitales capturan los colores mientras que las computadoras los almacenan usando el sistema RGB. En el sistema RGB cada color está representado por tres valores independientes: rojo (R), verde (G) y azul (B), ubicados a lo largo de los ejes de un sistema de coordenadas ortogonales, formando un

cubo. La línea diagonal desde negro (0,0,0) hasta blanco (1,1,1), que une esquinas opuestas del cubo, representa el rango de valores de la escala de grises. Existen programas de computación que permiten determinar los valores promedio (y las desviaciones estándar) de R, G y B para el objeto de interés. El sistema RGB se puede transformar mediante fórmulas matemáticas en el sistema CIELab (Gonzalez y Woods 1992) el cual se utiliza comúnmente para análisis de color superficial.
La toma de imágenes mediante una cámara fotográfica y su procesamiento por medio de programas adecuados se presenta como una alternativa interesante para sistemas heterogéneos, debido a que proporcionan gran cantidad de información en forma práctica (Jayas *et al.* 2000).
El objetivo de este trabajo fue evaluar el desarrollo de pardeamiento no enzimático en muestras que presentan diferencias de opacidad al variar la actividad de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con melones (Rocío de miel) y peras (Packam´s triumph). Los alimentos utilizados fueron seleccionados, descartando aquellos que presentaron golpes o defectos en la superficie. Todas las frutas empleadas se obtuvieron en el mercado local y se almacenaron a 4ºC hasta el momento de su procesamiento. Las frutas empleadas se eligieron como ejemplos de sistemas ricos en azúcares. La elección de estos materiales permite evaluar el pardeamiento sin interferencia de los colorantes propios del medio.

Métodos

Preparación de los materiales. Las frutas se lavaron y cortaron en rodajas de 0,5 cm de espesor, luego se cortaron cilindros de 2 cm de diámetro. Los cilindros fueron rápidamente congelados con nitrógeno líquido y almacenados a -20ºC hasta el momento de su tratamiento. Posteriormente el material se liofilizó por 48 horas en un liofilizador ALPHA 1-4 LD2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GMBH Alemania), el cual opera a una temperatura de -84ºC y una presión de 0,04 mbar. Los discos liofilizados fueron ubicados en placas de vidrio de 15 cm de largo, 10 cm de ancho y 0,5 cm de alto, dentro de aros de goma de 2 cm de diámetro interno. Parte de los discos se molieron empleando un molinillo eléctrico y se distribuyeron en recipientes.
Humidificación. Los sistemas en discos y en polvo se almacenaron en desecadores de vacío, a 20ºC por un período de 14 días a diversas actividades de agua empleando soluciones saturadas de sales que proveen actividades de agua en un rango de 0,11 a 0,84 (Greenspan 1977). Luego de la humidificación el material en polvo se distribuyó en placas de vidrio similares a las descriptas anteriormente pero con aros de goma de 1,5 cm de diámetro interno y 0,5 cm de altura. Tanto las muestras en discos como en polvo fueron selladas herméticamente colocando otra placa de vidrio en la parte superior y sujetadas de forma que no varíe la humedad adquirida.
Tratamiento térmico. Las placas selladas herméticamente se almacenaron en una estufa de corriente de aire a 45±1°C. A determinados intervalos de tiempo las muestras fueron retiradas de la estufa para realizar las distintas determinaciones, y luego se almacenaron nuevamente para continuar el tratamiento térmico.
Medición del grado de pardeamiento. Se realizó a través de la toma de imágenes usando un sistema de visión computarizada. Este sistema consta de una caja color gris estándar (L= 50 en escala CIELab) de dimensiones internas de 48 cm de ancho, 62 cm de largo y 48 cm de alto. El interior de la caja cuenta con un sistema patrón de iluminación (iluminante D_{65}) ubicado en la parte superior de la misma, y una cámara digital (Power Shot A70, Canon, USA) ubicada de manera de formar un ángulo de 45º con el plano de la muestra a una distancia de lente de 36 cm. Se fijaron los siguientes parámetros: velocidad de obturación 1/8 segundos (sin zoom, ni flash), modo macro enfocado, apertura de f=8 y sensibilidad ISO 50. Las imágenes fueron obtenidas con una resolución de 2048 x 1536 píxeles, y guardadas en formato JPG. El sistema de adquisición de imágenes se encuentra conectado a una computadora y emplea un programa de captura remota de imágenes (Canon Zoombrowser, Canon Inc., USA). Se tomaron imágenes de las muestras sobre fondos blanco y negro. Las fotografías obtenidas se digitalizaron en píxeles de 24 bits formados por niveles de los colores primarios: rojo, verde y azul (RGB), estos datos fueron convertidos al sistema CIELab (1974) (L*, a* y b*) mediante la aplicación de las ecuaciones descriptas por Papadakis *et al.* (2000).

Para evaluar las reacciones de pardeamiento en los discos se utilizó la función "L_0*- L*", que es la más adecuada en muestras opacas, donde L_0* es el valor de luminosidad obtenido de los diferentes sistemas antes de comenzar el tratamiento térmico y L* corresponde al valor obtenido a cada tiempo.
Para las muestras translúcidas, (alimentos en polvo) luego de realizar las mediciones sobre fondo negro y blanco se aplicó la teoría de Kubelka Munk de tal manera de obtener los parámetros adecuados (variable K/S) para la determinación del grado de pardeamiento.
Medición de la opacidad. El grado de opacidad se calculó mediante el cociente de los valores de luminosidad L* obtenidos sobre fondo negro y blanco. El valor de opacidad igual a 1 corresponde a muestras opacas, valores menores corresponden a diferentes grados de translucidez.
Evaluación de las constantes cinéticas de pardeamiento. Se calcularon las velocidades de pardeamiento para todos los sistemas analizados como la pendiente de la región lineal de las curvas de pardeamiento en función del tiempo de almacenamiento y corresponden a una cinética de pseudo orden cero. El modelado de los datos experimentales y las regresiones presentadas en este trabajo se realizaron mediante el empleo del programa GraphPad Prism V 4,02 a través de la correlación lineal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al cabo del proceso de liofilización tanto las muestras en discos como en polvo se presentaron como materiales opacos. Los sistemas en discos permanecieron opacos luego de la humidificación y el tratamiento térmico, sin embargo, las muestras en polvo presentaron características de materiales translúcidos a medida que aumentó la actividad de agua, lo cual se evidenció por la presencia de diferentes grados de opacidad. En la **Figura 1** se muestran los cambios en la opacidad desarrollados durante la humidificación de los sistemas de melón en discos y en polvo en función de la actividad de agua. Los sistemas de melón en discos mostraron un grado de opacidad cercano a 1 (material opaco) a las diferentes actividades de agua estudiadas. Los sistemas de melón en polvo presentaron una disminución del grado de opacidad con el aumento de la actividad de agua a partir de 0,22, indicando la translucidez de las muestras. Este comportamiento fue similar al ocurrido en el sistema de pera.

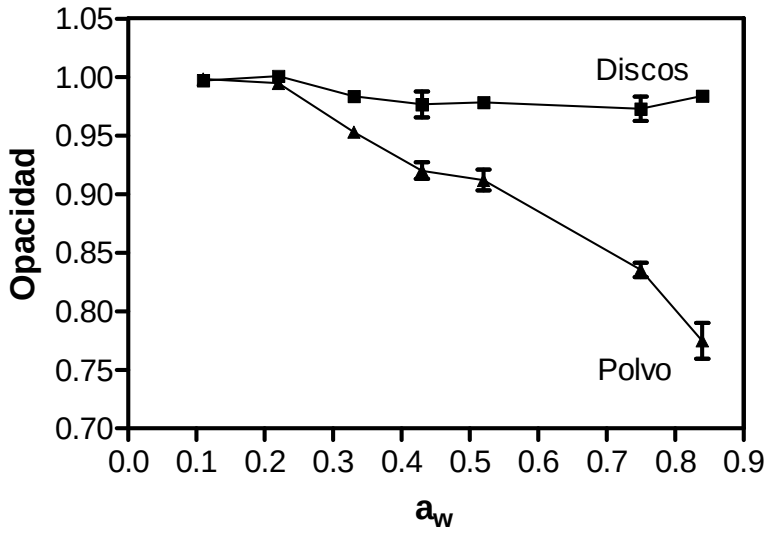


Figura 1. Grado de opacidad para melón en discos y en polvo con respecto a la actividad de agua, luego de humidificar las muestras durante 14 días a 20ºC.

Durante la liofilización se producen pequeños poros, los cuales quedan llenos de aire y aportan un grado de opacidad a las muestras, durante la humidificación el agua ocupa parte de los poros (Lana *et al.* 2006 y Talens *et al.* 2002). En el caso de los tejidos íntegros (discos) la presencia de la estructura celular puede conservar la opacidad del material. Por el contrario, en los polvos, en los que la estructura no conserva el aire, a partir de un cierto contenido de agua, ésta produce cambios en la apariencia del material y disminuye la opacidad.

Debido a que los sistemas en polvo utilizados en este trabajo presentaron características de translucidez, se decidió analizar qué variable sería más apropiada para evaluar el pardeamiento. Para ello se midió la variable L* empleando un fondo blanco y uno negro. Además se calculó la variable K/S de la teoría de Kubelka–Munk que suele utilizarse para determinar el oscurecimiento de materiales translúcidos (Kubelka y Munk 1931). Para evaluar cuál parámetro era más adecuado en la determinación del grado de oscurecimiento de estos materiales translúcidos, se graficaron los valores de K/S en función de L* (con fondo blanco) obtenidos luego de un tratamiento térmico a 45ºC a diferentes actividades de agua (**Figura 2**). Se pudo observar que para muestras hasta a_w 0,22 (muestras opacas debajo de la línea punteada), la variación de los valores de K/S fue muy pequeña, sin embargo, a medida que aumentó la actividad de agua y los sistemas presentaron translucidez, estas variaciones aumentaron y fueron mayores que los cambios en L*. Se calcularon las pendientes correspondientes a las curvas obtenidas a diferentes a_w de manera de comparar la sensibilidad de las variables K/S y L*. Se observó que para a_w bajas (hasta 0,33) las pendientes eran pequeñas del orden de 10^{-3}, pero a medida que aumentó la actividad de agua aumentaron los valores en el orden de 10^{-2}. Por lo tanto, a bajas a_w la función L* fue mucho más sensible que K/S para revelar los cambios de oscurecimiento, y lo opuesto ocurrió a actividades de agua más altas. Teniendo en cuenta que la mayoría de las muestras en polvo presentaron translucidez, se consideró que la variable K/S era más adecuada para evaluar el desarrollo de pardeamiento, aunque no fue la más apropiada en el rango de a_w entre 0,11 y 0,33. La variable L* se empleó para todas las muestras en discos.

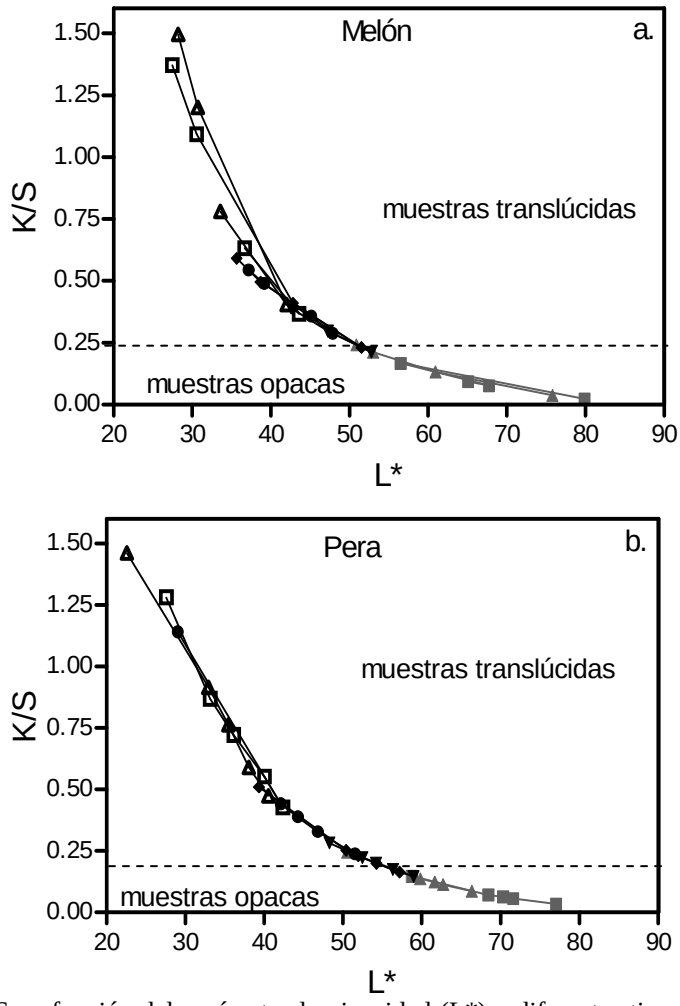


Figura 2. Relación K/S en función del parámetro luminosidad (L*) a diferentes tiempos de tratamiento a 45ºC para melón (**a**) y pera (**b**) en polvo liofilizados y humidificados a a_w 0,11 (■), 0,22 (▲), 0,33 (▼), 0,43 (♦), 0,52 (●), 0,75 (□) y 0,84 (Δ). La línea de puntos divide la zona de muestras opacas y translúcidas.

Se analizaron los cambios de oscurecimiento producidos en discos de melón y pera humidificados a distintas actividades de agua luego de 0 y 9 días de almacenamiento a 45ºC. Se observó un aumento progresivo del oscurecimiento de las muestras a medida que aumentó la a_w, tanto durante la humidificación a 20ºC como en el almacenamiento a 45ºC. Con la finalidad de comparar la contribución al pardeamiento ocurrida durante la humidificación y el tratamiento térmico se calcularon los porcentajes de pardeamiento (calculado a través de la variable L*) a 0 y 9 días de almacenamiento a 45ºC (**Figura 3**). El desarrollo de pardeamiento se vio afectado por la actividad de agua de diferente manera a 20ºC que a 45ºC. En el caso de las muestras de melón al cabo de la humidificación (a 20ºC) se desarrollaron bajos niveles de pardeo hasta a_w 0,52 y a partir de esta actividad de agua el pardeamiento fue mayor. Para los sistemas de pera el comportamiento fue similar y se alcanzaron valores mayores de pardeo (14%) a a_w 0,84 mientras que el melón sólo alcanzó 9% de pardeo a esa actividad de agua. El oscurecimiento ocurrido a 20ºC podría atribuirse en parte a la contribución del pardeamiento enzimático que sería más importante a partir de a_w 0,75. Por otro lado el oscurecimiento producido durante el tratamiento térmico a 45ºC mostró un máximo entre actividad de agua 0,52 y 0,75 para melón. Para los sistemas de pera los valores de pardeo alcanzados fueron mucho menores y no se presentó un máximo. En el caso de las muestras en polvo, el desarrollo de pardeamiento se vio afectado por la actividad de agua de diferente manera a 20ºC que a 45ºC. Se observó que en el caso de las muestras de pera la contribución al pardeamiento fue siempre menor en la humidificación que al cabo de 9 días a 45ºC. En el caso de muestras de melón, las contribuciones al pardeamiento fueron similares a 20 y 45ºC (**Figura 4**).

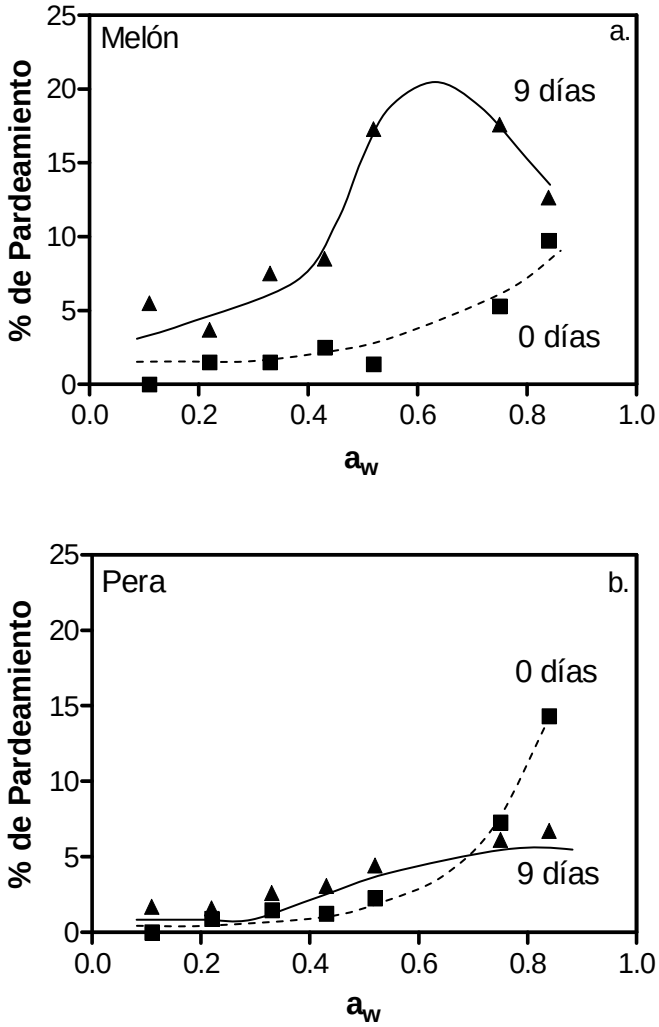


Figura 3 Porcentaje de pardeamiento (calculado a través de la variable L*) desarrollado durante la humidificación a 20ºC y luego de 9 días de almacenamiento a 45ºC para los sistemas de melón (**a**) y pera (**b**) en discos en función de la a_w.

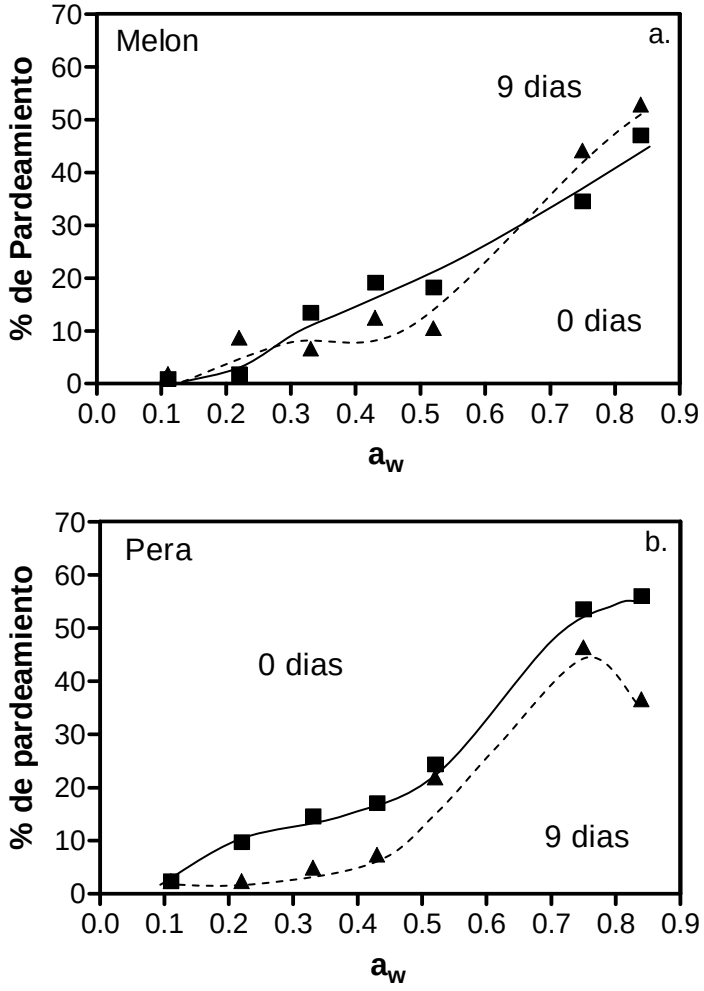


Figura 4. Porcentaje de pardeamiento (calculado a través de la variable K/S) desarrollado durante la humidificación (0 días) y luego de 9 días de almacenamiento a 45ºC para los sistemas de melón (**a**), y pera (**b**) en polvo en función de a_w.

En la **Figura 5** se muestra la velocidad de pardeamiento de los sistemas de melón y pera en discos (a) y en polvo (b) en función de la actividad de agua durante el almacenamiento a 45ºC. Se pudo observar que a actividades de agua bajas hay una velocidad de desarrollo de pardeamiento más lenta que para a_w altas. Las muestras en discos presentaron un máximo de velocidad, a a_w 0,52 para pera y 0,75 para melón. En el rango de a_w en que se realizó el estudio no se presentaron máximos de velocidad de pardeamiento para las muestras en polvo. Los sistemas de melón tanto en discos como en polvo tuvieron constantes de velocidad mayores en todo el rango de actividades de agua analizado.

De acuerdo con Labuza *et al.* (1970), existe un máximo de velocidad de pardeamiento no enzimático en sistemas sólidos, en un rango de actividades de agua entre 0,6 y 0,8. Los sistemas con componentes estructurales, como biopolímeros insolubles de los tejidos vegetales, muestran un máximo de velocidad de pardeamiento no enzimático a elevadas actividades de agua. Acevedo *et al.* (2006) observaron un máximo de pardeo a a_w 0,75 en manzana en discos almacenados a 70ºC. Las curvas resultantes de la velocidad de pardeamiento presentaron forma de campana. A bajas a_w el factor limitante es la dificultad en la movilidad de los reactivos, que no pueden interactuar entre ellos, y la reacción tiene lugar a velocidades muy bajas. A medida que aumenta la a_w del sistema, ocurren dos fenómenos: disminución de la viscosidad de la fase acuosa, y disolución de los reactivos en esa fase (Warmbier *et al.* 1976, Labuza 1980). Como consecuencia, se va produciendo un cambio gradual de la concentración de los reactivos y un aumento de su velocidad de difusión en la fase acuosa, lo cual se traduce en un aumento sostenido de la velocidad de reacción al aumentar a_w. Llega un momento en

que la fase acuosa se satura y un aumento del contenido acuoso no altera la concentración de reactivos, sino hasta el momento en que cesa la disponibilidad de los mismos para disolverse, y un aumento de a_w solo produce dilución. Este efecto, sumado al hecho de que el agua, por ser producto de la reacción tiene una acción inhibitoria sobre la misma, ocasiona una disminución de la velocidad de reacción (Eichner y Karel 1972, Labuza *et al.* 1977, Labuza y Saltmarch 1981).

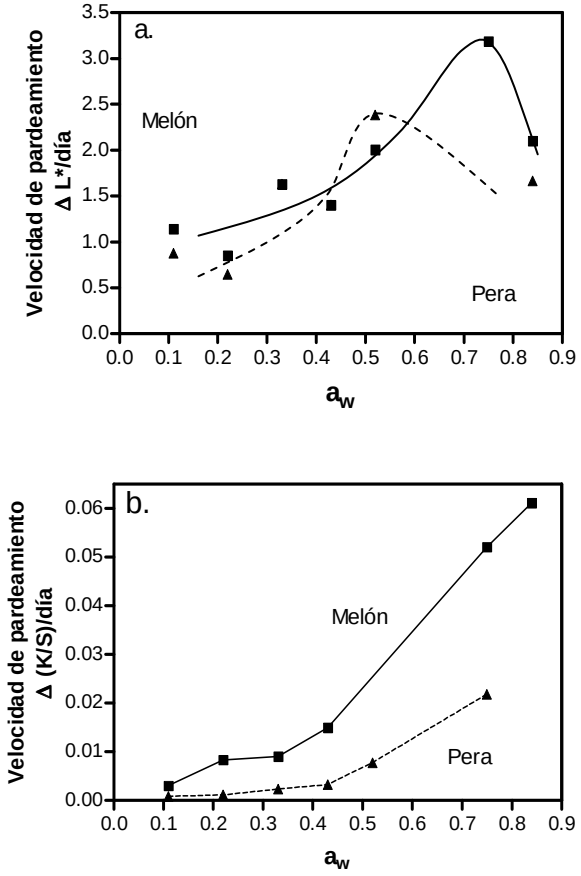


Figura 5. Velocidad de pardeamiento a 45ºC de melón (■) y pera (▲) en discos (a) y en polvo (b) en función de la actividad de agua.

CONCLUSIONES

La variable L* fue adecuada para evaluar el oscurecimiento de las muestras en discos, que mantuvieron su opacidad. En cambio, la opacidad de las muestras en polvo disminuyó notoriamente a partir de 22% H.R. y por lo tanto se analizaron empleando la teoría de Kubelka-Munk, mediante mediciones con fondos blanco y negro. Las características de apariencia de frutas deshidratadas dependen fundamentalmente del contenido de agua y del tamaño de partícula de las muestras, afectando la determinación del grado de pardeamiento. Por lo tanto, deben seleccionarse el fondo sobre el cual se mide la muestra y las variables más representativas de los cambios. El sistema de análisis de imágenes resultó apropiado para determinar los cambios de apariencia durante el almacenamiento de frutas deshidratadas. Es un método sencillo, rápido, económico y no destructivo de la muestra que podría tener gran aplicación en la industria de alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acevedo NC, Schebor C, Buera MP. 2006. Water solids interactions, matrix structural properties and the rate of non – enzymatic browning. Journal of Food Engineering, 77: 1108-1115.

Aguilera JM, Briones V. 2005. Computer vision and food quality. Food Australia, 57: 79-87.

Aguilera JM, Stanley D. 1999. Microstructural principles of food processing and engineering. Lancaster: Aspen Publishers. pag. 432.

Buera MP, Resnik S. 1989. Colorimetric measurements in a turbid medium: hydrolyzed concentrated cheese whey. Die Farbe, 35/36: 201-214.

Eichner K, Karel M. 1972. The influence of water content and water activity on the sugar-amino browning reaction in model systems under various conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 20: 218-223.

González RC, Woods RE. 1992. Digital imaging processing. Boston: Addison-Wesley Longman Publishing Co. Inc. pag. 954.

Greenspan L. 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Journal of Research, 8: 89-96.

Jayas D, Paliwal J, Visen N. 2000. Multi-layer neural network for image analysis of agricultural products. Journal of Agricultural Engineering Research, 77: 119-128.

Kubelka P, Munk F. 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. Z. Techn. Physik, 12: 591-601.

Labuza T. 1980. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. Food Technology, 34: 36-41.

Labuza T, Saltmarch M. 1981. Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. Journal of Food Science, 41: 92-96.

Labuza T, Tannenbaum S, Karel M. 1970. Water content and stability of low-moisture and intermediate moisture foods. Food Technology, 24: 543-550.

Labuza T, Warren R, Warmbier J. 1977. The physical aspects with respect to water and non-enzymatic browning. Advances in Experimental Medicine and Biology, 86B: 379-418.

Lana MM, Tijskens LMM, Kooten O. 2006. Modelling RGB colour aspects and translucency of fresh-cut tomatoes. Postharvest Biology and Technology, 40: 15-25.

Little A. 1964. Color measurements of translucent food samples. Journal of Food Science, 29: 782-789.

Little A, Brinner L. 1981. Optical properties of instant tea and coffee solutions. Journal of Food Science, 46: 519-525.

Lozano R. 1978. El color y su medición. Buenos Aires: Editorial América Lee.pag. 640.

Mackinney G, Little A, Brinner L. 1966. Visual appearance of foods. Food Technology, 20: 60-68.

Papadakis S, Abdul-Malek S, Kandem R, Yam K. 2000. A versatile and inexpensive technique for measuring colour of foods. Food Technology, 54: 48-51.

Talens P, Martínez-Navarrete P, Fito N, Chiralt A. 2002. Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. Innovative Food Science and Emerging Technologies 3: 191-199.

Warmbier H, Schnickels R, Labuza T. 1976. Effect of glycerol on nonenzymatic browning in a solid intermediate moisture model food system. Journal of Food Sciences, 41: 528-531.

Efecto del contenido de agua sobre parámetros térmicos y cinéticos de gelatinización de harinas de amaranto

Effect of water content on thermodinamic and kinetic parameters during gelanitization of amaranto flours

Alianelli LM, Caffa MV, Tolaba MP

Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, (1428) Buenos Aires, Argentina.
mtolaba@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

La gelatinización es un fenómeno característico asociado al calentamiento de sistemas amiláceos en presencia de agua. La reacción de gelatinización se ve influenciada por numerosos factores entre los que se pueden mencionar la cantidad de agua presente en el sistema, la velocidad de calentamiento y las características de cristalinidad del almidón (relación amilosa/amilopectina). En los ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la harina de amaranto, se observó un incremento significativo en los valores de entalpía al aumentar la proporción de agua, encontrándose que el grado de conversión disminuye casi un 40% al reducir el nivel de agua desde 75 hasta 50%. Además, se detectó un corrimiento de la temperatura de pico (T_p) hacia valores menores al incrementar el contenido de agua del sistema en el rango estudiado. Los parámetros cinéticos obtenidos en base al modelo de Borchardt & Daniels no se vieron afectados por la relación agua – harina, sin embargo, mostraron una diferencia significativa según se evaluaran antes o después de la temperatura de pico. Se encontró que en la región de sub-gelatinización ($T<T_p$) los valores promedio de Z_0 y E_a resultaron ser 1,04 x 10^{51} s^{-1} y 330 KJ/mol respectivamente, mientras que en la región posterior al pico endotérmico ($T>T_p$) los valores promedio fueron 1,48 x 10^{25} s^{-1} para Z_0 y 159 KJ/mol para E_a.

ABSTRACT

Gelatinization is a characteristic phenomenon related to the heating of amylaceous systems in presence of water. The gelatinization reaction is affected by several factors including the water amount within the system, the heating rate and the starch's crystalline structure (amylose/amylopectin ratio). In the differential scanning calorimetric (DSC) tests of the amaranth flour, a significant increase of the enthalpy was observed when the water amount rose, finding out that the conversion degree diminishes almost a 40% by reducing the water amount from 75 to 50%. A shift of the peak temperature (T_p) to lower values was observed when the water content increased within the studied range.

The kinetics parameters were obtained using the Borchardt & Daniels model. Although these parameters were not affected by the water:flour ratio, they were significantly different depending on the region of the peak used to evaluate them: before or after the peak temperature. It was found that for the region of sub-gelatinization ($T<T_p$) the average values of Z_0 and E_a were 1,04 x 10^{51} s^{-1} and 330 KJ/mol respectively, while in the region were temperatures were higher than T_p the average values were 1,48 x 10^{25} s^{-1} for Z_0 and 159 KJ/mol for E_a.

PALABRAS CLAVE: *harina, amaranto, gelatinización, cinética, Borchardt & Daniels.*

KEYWORDS: *flour, amaranth, gelatinization, kinetics, Borchardt & Daniels.*

INTRODUCCIÓN

El calentamiento de harinas en presencia de agua está asociado a los fenómenos de gelatinización y fusión del almidón. La importancia del tema radica en las características texturales y estructurales que adquiere el producto al ser sometido a operaciones de hidrotratamiento que son de amplio uso en la industria de los alimentos (Wang *et al.* 1989).

El amaranto es un pseudocereal que se cultiva en la región andina de América del sur y también en la India, contiene 50-70% de almidón según la variedad. Este grano se destaca por sus propiedades nutricionales derivadas principalmente del excelente balance de aminoácidos que presentan sus proteínas (Pszczola 2003). Cabe señalar que las proteínas de amaranto carecen de la alergenicidad propia de las proteínas de los cereales clásicos, por lo cual la harina de amaranto se presenta como un atractivo ingrediente en la dieta para individuos con intolerancia como los celíacos (Hernández–Bermejo y León 1994, Pszczola 1998). Otras características destacables que han despertado el interés por este grano son la naturaleza cerosa o "waxy" de la harina, debido a los bajos niveles de amilosa, y la suave textura dada por el pequeño tamaño del gránulo de almidón comprendido entre 1 y 3 μm (Lee *et al.* 1999).

El conocimiento de la cinética de gelatinización es fundamental para el diseño y la optimización de operaciones de la industria de alimentos involucradas en procesos de panificación, cocción de pastas, extrusión de mezclas en base a cereales, gelificación ó espesamiento de salsas y cremas (Billiaderis *et al.* 1980, Pravisani *et al.* 1985). El proceso de gelatinización depende de diferentes factores entre los cuales podemos mencionar los siguientes: tiempo, temperatura, contenido de humedad, composición y granulometría de la harina, condiciones de preparación y almacenamiento de la harina. La evolución de la gelatinización ha sido investigada mediante diferentes métodos que permiten seguir los cambios asociados a la misma. Entre las técnicas disponibles encontramos: pérdida de birrefringencia, viscosidad, difracción de rayos X, digestibilidad enzimática. Sin embargo el método más utilizado en la última década es la calorimetría diferencial de barrido, DSC (Ojeda *et al.* 2000, Calzetta Resio y Suárez 2001, Fukuoka *et al.* 2002). Esta técnica permite estudiar la gelatinización en un amplio rango de contenido de agua y de temperaturas, aún por encima de 100 ºC, brindando una medida precisa tanto de las temperaturas de gelatinización como de la entalpía de gelatinización a partir del área del pico asociado a la transición endotérmica. Los datos de calorimetría dinámica DSC han sido la base para la aplicación de distintos modelos cinéticos entre los que se destacan las ecuaciones propuestas por Ozawa (1970) y Borchardt & Daniels (1957). La ecuación de Ozawa se basa en la influencia de la velocidad de calentamiento sobre el desplazamiento de la temperatura de pico mientras que en el modelo de Borchardt y Daniels la estimación de los parámetros cinéticos se realiza en base a la evolución del grado de gelatinización durante el calentamiento dinámico. Ambos modelos han sido aplicados con éxito para estimar la cinética de gelatinización en harina de arroz (Ojeda *et al.* 2000) y en almidones de diferentes granos ó tubérculos (Pravisani *et al.* 1985, Calzetta Resio y Suárez 2001).

En base a lo mencionado puede considerarse que en la bibliografía existen numerosos trabajos sobre gelatinización en sistemas amiláceos tanto de harinas como de almidones de cereales clásicos, principalmente en condiciones de exceso de agua. Sin embargo no se encuentran datos cinéticos acerca de harina de amaranto y son escasos los trabajos que tratan la gelatinización del almidón aislado a partir de este cereal (Bhattacharya *et al.* 1995, Calzetta Resio y Suárez 2001, Bhandari y Singhal 2002, Pal *et al.* 2002, Tapia Blacido 2006, Bhosale y Singhal 2007).

Por lo tanto los objetivos del trabajo fueron: a) determinar las temperaturas y entalpía de gelatinización en sistemas de harina de amaranto con diferentes contenidos de agua a partir de ensayos de gelatinización "in-situ" por calentamiento dinámico en un calorímetro diferencial DSC, b) obtener los parámetros cinéticos de gelatinización en base al termograma-DSC mediante el modelo de Borchardt & Daniels determinando el efecto del contenido de agua sobre los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se emplearon granos de amaranto pertenecientes a la variedad *Amaranthus Cruentus* cosechados en lotes experimentales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa. Los granos con 10,5 % de contenido de humedad (AOAC 943.01) y 6,6% de amilosa se tamizaron para eliminar material extraño y se almacenaron en bolsas herméticas a baja temperatura (-18ºC) hasta su empleo. En la **Tabla 1** se muestra la composición centesimal del grano determinada en base a métodos oficiales (AACC 1995, AOAC 1995). El contenido de almidón se determinó en base al método AACC 76-11, el contenido proteico mediante el método Kjeldahl (método AOAC 976.05), el contenido lipídico por Sohxlet (método AOAC 920.39) y las cenizas por calcinación a 550ºC hasta peso constante (método AOAC 923.03).

Tabla 1. Composición porcentual de la muestra de amaranto empleada

Componente	*g/100g grano seco*
Proteina	16,8 ± 0,31
Lípidos	7,7 ± 0,22
Almidón	73,0 ± 0,25
Ceniza	3,1 ± 0,05

Ensayos calorimétricos

Las muestras de harina para los ensayos calorimétricos se prepararon con granos de amaranto previamente estabilizados a temperatura ambiente los cuales fueron procesados en un molinillo de laboratorio (25 g) marca Decalab. Cabe señalar que dado el breve tiempo de molienda (< 1 minuto) no se registró ninguna alteración de las muestras por calentamiento. La harina obtenida se tamizó empleándose un vibrador marca Zonytec en modo intermitente y se seleccionó la fracción retenida entre los tamices de 177 y 74 micras para realizar los ensayos calorimétricos. Las suspensiones acuosas de harina se prepararon "in situ" con agua destilada en las cápsulas de aluminio (40 µl) del calorímetro. La masa de harina fue de 3-4 mg aproximadamente y las proporciones empleadas de agua: harina fueron 1:1, 2:1 y 3:1. Las suspensiones se estabilizaron durante 24 hs a temperatura ambiente antes de realizar las corridas en el calorímetro con el objeto de uniformar los perfiles de humedad en la muestra. Los ensayos se realizaron en un calorímetro diferencial Mettler-Toledo modelo DSC 822 (Schwerzenbach, Suiza) donde las muestras se calentaron desde 30 hasta 110 °C con una velocidad de calentamiento constante de 15 °C/min. Se utilizó como referencia una cápsula vacía.

Modelo Cinético

Borchardt y Daniels (1957) propusieron la siguiente ecuación para simular la cinética de gelatinización:

$$d\alpha / dt = k (1 - \alpha)^n \qquad (1)$$

siendo α [$\alpha = \Delta H / \Delta H_{TOTAL}$] la fracción gelatinizada, n el orden de reacción y k la constante de velocidad que se relaciona con la energía de activación (E_a) y el factor pre-exponencial (Z_0) según la relación de Arrheniu:

$$k = Z_0 \, e^{-Ea / RT} \qquad (2)$$

Adoptando una cinética de primer orden para la gelatinización (n=1) y linealizando la ecuación (1) se obtiene la siguiente expresión que permite calcular los parámetros cinéticos (Z_0 y E_a) mediante regresión a partir de la evolución de la fracción gelatinizada (α) durante el calentamiento dinámico en el calorímetro diferencial

$$\ln [d\alpha / dt] = \ln Z_0 - (E_a/R) * (1/ T) + \ln (1 - \alpha) \qquad (3)$$

A partir del registro de flujo de calor "versus" temperatura que brinda el termograma es posible obtener las variables de la ecuación (3).

En la **Figura 1** puede apreciarse el pico endotérmico del termograma, la evolución sigmoidea de la fracción gelatinizada (α) en función de la temperatura de la muestra y la variación gaussiana de la velocidad de gelatinización ($d\alpha/dt$) durante el calentamiento.

Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado informándose los valores promedio y la desviación estándar correspondiente. Se realizó un ANOVA y los resultados se evaluaron por medio del test de comparaciones múltiples de Duncan. Para los cálculos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics® (Statistical graphics Corporation, USA).

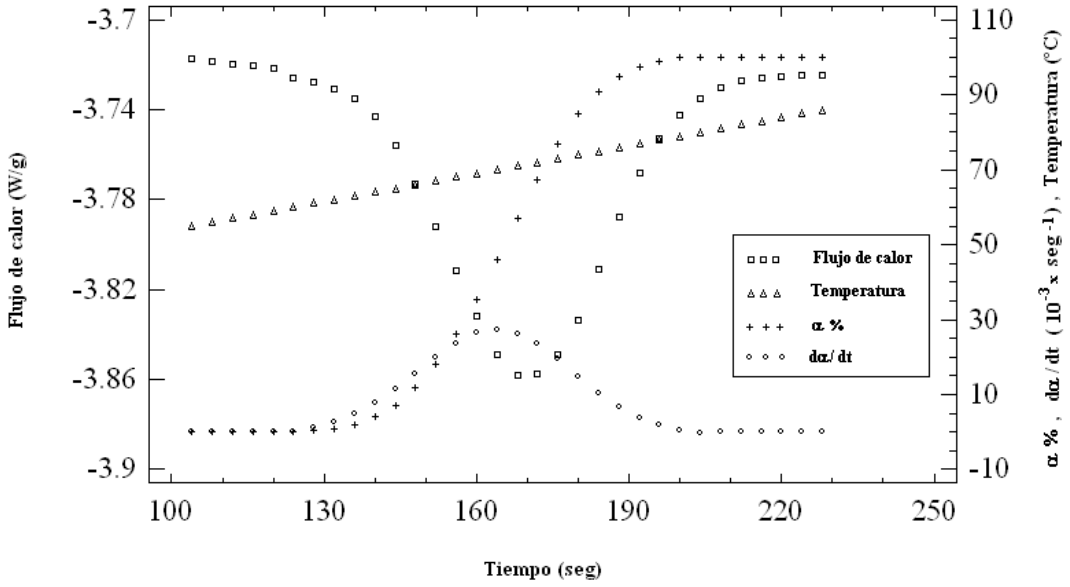


Figura 1. Relación entre los datos del termograma (relación agua: harina = 3:1) y las variables de la ecuación 3 (flujo de calor, dα/dt , α y T).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros térmicos

Los termogramas experimentales de las suspensiones acuosas de harina de amaranto se muestran en la **Figura 2** para las diferentes relaciones agua: harina. Puede observarse que el perfil del pico resultó afectado por la proporción de agua, siendo más definido y agudo al aumentar el contenido de la misma. Aunque con menor definición pudo también apreciarse la gelatinización en el caso de la menor proporción de agua usada. En la **Figura 2** puede apreciarse un corrimiento de los termogramas hacia menores temperaturas al aumentar la proporción de agua. Puede verse que la temperatura de pico se desplazó desde 75,8 ºC hasta 71,5 ºC al elevar la proporción de agua desde 1:1 a 3:1. Cabe señalar que proporciones de agua mayores a 3:1 no afectaron el termograma, en consecuencia puede afirmarse que la gelatinización se desarrolla sin limitaciones para la máxima relación agua:harina usada (3:1); es decir que en estas condiciones la conversión del almidón es completa (harina 100 % gelatinizada).

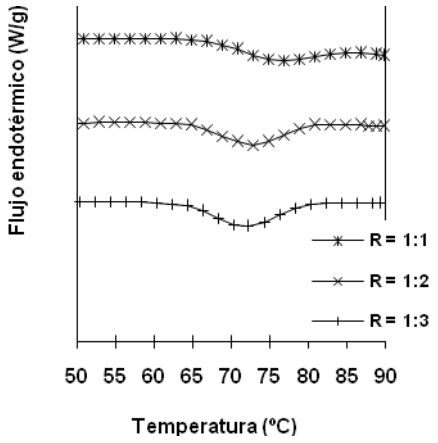


Figura 2. Termogramas - DSC de suspensiones acuosas de harina de amaranto a 15°C/min con diferentes relaciones agua:harina.

Los valores de los parámetros térmicos obtenidos de los termogramas se dan en la **Tabla 2**. Puede verse que la entalpía de gelatinización varió entre 3,3 y 5,8 J/g al aumentar la proporción de agua, es decir que el grado de conversión de harina no gelatinizada a harina gelatinizada disminuye aproximadamente un 40% al reducir el nivel de agua desde 75 hasta 50%.

Tabla 2. Propiedades térmicas de las muestras obtenidas por DSC

Relación Agua : harina	T_o (°C)	T_p (°C)	T_e (°C)	ΔH (J/g seco)
1 : 1	68,2 ± 0,2	75,8 ± 0,5	84,3 ± 0,4	3,3 ± 0,7
2 : 1	64,8 ± 0,5	72,8 ± 0,3	79,6 ± 0,4	4,7 ± 0,5
3 : 1	63,8 ± 0,4	71,5 ± 0,3	78,9 ± 0,2	5,8 ± 0,8

Un efecto similar de la concentración de agua sobre los valores de la entalpía fue observado por Spigno y De Faveri (2003) en almidón de arroz aislado por diferentes métodos. Para un rango equivalente de concentración de agua estos autores encontraron entalpías de gelatinización comprendidas entre 4 y 9 J/g. Probablemente la concordancia en el orden de magnitud sea debido a que el almidón de arroz comparte con el de amaranto el carácter microgranular y al hecho de haber usado en este trabajo una harina de baja granulometría (177- 74 μm) enriquecida en la fracción amilácea. En un trabajo reciente Villareal *et al.* (2009) encontraron un desplazamiento de la temperatura de pico (entre 75º y 78ºC) en harina de amaranto (amilosa 3,3%) al disminuir de 70 a 50% el contenido de agua. Los autores mencionados informaron un valor de entalpía de gelatinización en harina de amaranto de 2,5 J/g en el rango de concentraciones mencionado. Las diferencias con los resultados encontrados en este trabajo podrían atribuirse a distintos factores entre los cuales podemos mencionar el contenido de amilosa del grano, la granulometría de la harina y la velocidad de calentamiento.

Cuando se compara para el grano de amaranto la gelatinización de harina con la de almidón las diferencias son aún mayores. Tapia Blacido (2006) y Calzetta Resio (2007) obtuvieron valores de entalpía de 12.2 y 12.6 J/g respectivamente para la gelatinización de almidón de amaranto aislado. La menor capacidad de conversión que exhibe la harina en este trabajo (5,8 J/g en exceso de agua) refleja limitaciones en la gelatinización probablemente originadas a causa de la proporción significativa de proteínas y lípidos en la harina de amaranto y a las interacciones entre el almidón y los mencionados componentes de esta última.

Parámetros cinéticos

La evolución de la fracción gelatinizada y de la velocidad de gelatinización durante el calentamiento para cada una de las concentraciones de agua se calcularon a partir de los termogramas correspondientes. En la **Figura 1** puede apreciarse que para la mayor concentración de agua (75%) la gelatinización es prácticamente completa (α~100%) a una temperatura de 78ºC, que la máxima velocidad de reacción ocurre cuando la fracción gelatinizada es aproximadamente 45% y que la velocidad de gelatinización se incrementa paulatinamente hasta alcanzar un máximo a la temperatura de pico (71,5ºC) para luego decrecer abruptamente. Esta brusca variación de la velocidad de gelatinización en el pico se traduce en el cambio de las constantes cinéticas (E_a y Z_0) por encima y debajo de la temperatura de pico (Ojeda 1998, Pravisani *et al.* 1985). En base a estas observaciones la aplicación de la ecuación (3) se realizó fraccionando los datos en dos regiones: sub-gelatinización y gelatinización respecto de la temperatura de pico. En la **Figura 3** se visualizan las regresiones obtenidas mediante la ecuación (3) para cada una de las concentraciones de agua. Es evidente el desplazamiento hacia mayores temperaturas del rango de gelatinización al reducir el contenido de agua y la marcada disminución de la pendiente al pasar de la región de sub-gelatinización a la de gelatinización.

Los valores de E_a y Z_0 resultantes de la regresión se muestran en la **Tabla 3**. Puede apreciarse que el ajuste resultó satisfactorio ($r^2 > 0,86$) y que los parámetros resultaron independientes del nivel de agua en cada región estudiada. En la zona de sub-gelatinización los valores promedio de Z_0 y E_a resultaron $1,04 \times 10^{51}$ s^{-1} y 330 KJ/mol respectivamente, mientras que en la región de gelatinización resultó E_a = 159 KJ/mol y $Z_0 = 1,48 \times 10^{25}$ s^{-1}. Cabe señalar que los ajustes satisfactorios obtenidos mediante la ecuación (3) avalan la simplificación adoptada al considerar un orden de reacción unitario para simular la gelatinización.

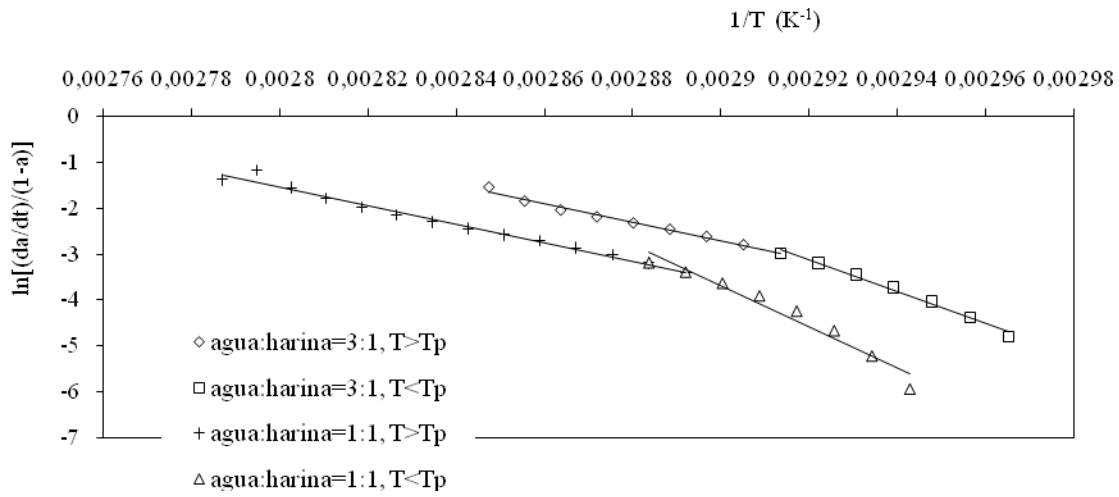


Figura 3. Regresión obtenida mediante la ecuación (3) en función del contenido de agua y la región respecto de la temperatura de pico.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para gelatinización de harina de amaranto en función de la concentración de agua.

Relación agua : harina	Región	ln Z_0		Z_0 (s^{-1})	E_a (kJ/mol)		r^2
1 : 1		110	± 22,6[a]	7,08 x 10^{47}	326	± 64,7[a]	0,9547
2 : 1	$T < T_p$	108	± 13,4[a]	1,16 x 10^{47}	318	± 38,1[a]	0,9740
3 : 1		119	± 18,3[a]	3,11 x 10^{51}	346	± 51,6[a]	0,9601
1 : 1		59	± 8,8[b]	4,27 x 10^{25}	180	± 25,9[b]	0,9959
2 : 1	$T > T_p$	43	± 32,9[b]	3,83 x 10^{18}	130	± 95,2[b]	0,8624
3 : 1		56	± 7,6[b]	1,65 x 10^{24}	168	± 22,0[b]	0,9967

Letras iguales corresponden al mismo grupo para un nivel de confianza del 95%.

No se encontraron en la bibliografía estudios de cinética de gelatinización en harina de amaranto, sin embargo para almidón de amaranto Calzetta Resio y Suarez (2001) han informado una energía de activación de 157 KJ/mol. Cabe señalar que estos autores aplicaron también el modelo de Bortchardt & Daniels, sin embargo analizaron los datos comprendidos entre 20 y 95% de fracción gelatinizada sin diferenciar las regiones de gelatinización y sub-gelatinización como se realizó en este trabajo.
La **Figura 4** muestra los valores de la constante de velocidad (k) en función de la temperatura obtenidos en base a los parámetros cinéticos E_a y Z_0 (**Tabla 3**) y a la ecuación de Arrhenius (ecuación 2). Se puede apreciar claramente que existe una temperatura de quiebre coincidente con la temperatura de pico endotérmico.

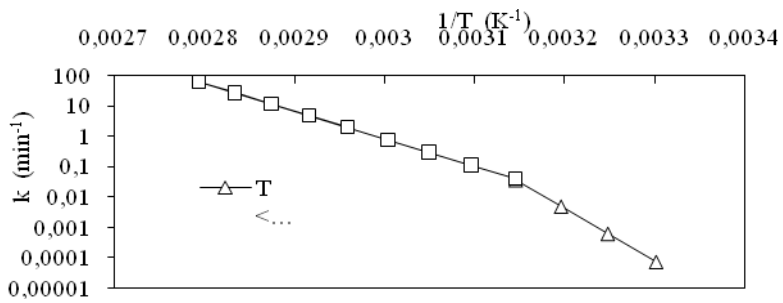


Figura 4. Valores predichos de la constante de velocidad de gelatinización obtenidos mediante la ecuación (2) en función de la temperatura.

Las diferencias entre los parámetros cinéticos correspondientes a las regiones de sub-gelatinización y gelatinización podrían atribuirse a un cambio en el mecanismo de la reacción (Kokini *et al.* 1992). Mientras que temperaturas de sub-gelatinización provocarían sólo desorden en la región amorfa del polímero semicristalino, temperaturas mayores afectarían la estabilidad de la región cristalina favoreciendo su fusión.

CONCLUSIONES

Los parámetros térmicos de la gelatinización de harina de amaranto en suspensión acuosa, obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido, resultaron afectados por la proporción de agua en el sistema (entre 50 y 75% de agua). Al incrementar el nivel de agua se obtuvo un mayor grado de gelatinización (mayor entalpía) y la transición térmica se desplazó hacia menores temperaturas (menores T_o, T_p y T_e).

Se utilizó con éxito el modelo de Borchardt & Daniels para reacción de primer orden para simular la cinética de gelatinización de harina de amaranto. El método basado en la evolución de la fracción gelatinizada durante el calentamiento dinámico de suspensiones acuosas de harina permitió observar una variación abrupta de la velocidad de gelatinización alrededor de la temperatura de pico. En consecuencia se analizaron separadamente las regiones de sub-gelatinización y gelatinización para la obtención de las constantes cinéticas correspondientes. Dentro del rango de concentraciones de agua estudiado, los parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius no resultaron afectados por la proporción de agua de la suspensión. Sin embargo, la energía de activación de la gelatinización se redujo significativamente (52 %) por encima de la temperatura de pico, incrementándose desde 330 a 159 KJ/mol. Este hecho evidencia un cambio en el mecanismo de reacción que está relacionado con la desnaturalización y fusión de la región cristalina del biopolímero (almidón) inducida por temperaturas mayores a la de pico endotérmico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT, UBA) Argentina, a la Arrocera Argentina por habernos facilitado las muestras de arroz y a las Dras. Pilar Buera y Florencia Mazzobre por facilitarnos el uso del calorímetro diferencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Official Methods of Analysis - 16th ed. Washington, DC: AOAC.

American Association of Cereal Chemists (AACC). 1995. Approved Methods of the AACC - 9th ed. Washington, DC: AACC.

Bhandari P, Singhal R. 2002. Effect of succinylation on the corn and amaranth starch pastes. Carbohydrate Polymers, 48: 233–240.

Bhattacharyya D, Singhal R, Kulkarni PR. 1995. Physicochemical properties of carboxymethyl starch prepared from corn and waxy amaranth starch. Carbohydrate Polymers, 27: 167–169.

Bhosale R, Singhal R. 2006. Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. Carbohydrate Polymers, 66: 521–527.

Biliaderis CG, Maurice TJ, Vose JR. 1980. Starch gelatinization phenomena studied by differential scanning calorimetry. Journal of Food Science, 45: 1660–1680.

Borchardt HJ, Daniels F. 1957. The application of differential thermal analysis to the study of reaction kinetics. Journal of the American Chemistry Society, 79: 41-46.

Calzetta Resio A. 2007. Molienda húmeda de granos de amaranto (*a. cruentus*), estudio del efecto de las condiciones de proceso sobre la obtención y calidad de subproductos y propiedades de la fracción amilácea. Tesis de la Universidad de Buenos Aires

Calzetta Resio A, Suarez C. 2001. Gelatinization kinetics of amaranth starch. International Journal of Food Science and Technology, 36: 441–448.

Fukuoka M, Ohta K, Watanabe H. 2002. Determination of the terminal extent of starch gelatinization in a limited water system by DSC. Journal of Food Engineering, 53: 39–42.

Hernández-Bermejo JE, León J. 1994. Neglected crops- 1492 from a different perspective. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en colaboración con el Jardín Botánico de Córdoba (España).

Kokini JL, Lai LS, Chedid LL. 1992. Effects of starch structure on starch rheological properties. Food Technology, 46: 124-139.

Lee JH, Kim SR, Song JY, Shin MS. 1999. Comparison of physicochemical properties of amaranth starch with other waxy cereal starches. Korean Journal of Food Science Technology, 37: 614–618.

Ojeda CA. 1998. Estudio de la cinética de gelatinización y de las variables operativas en el parbolizado de arroz. Tesis de la Universidad de Buenos Aires

Ojeda CA, Tolaba MP, Suarez C. 2000. Modeling starch gelatinization kinetics of milled rice flour. Cereal Chemistry, 77(2): 145–147.

Ozawa T. 1970. Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis. Journal of Thermal Analysis, 2:301.

Pal J, Singhal RS, Kulkarni PR. 2002. Physicochemical properties of hydroxypropyl derivatives of corn and amaranth starch. Carbohydrate Polymers, 48: 49–53.

Pravisani CI, Califano AN, Calvelo A. 1985. Kinetics of starch gelatinization in potato. Journal of Food Science, 50: 657–660.

Pszczola DE. 2003. New ingredient developments are going with the grain. Food Technology, 57(2): 46, 48, 50-61.

Pszczola DE. 1998. Specialty grains: what's beyond the horizon?. Food Technology, 52(9): 94-98, 100-102.

Spigno G, De Faveri DM. 2004. Gelatinization kinetics of rice starch studied by non-isothermal calorimetric technique: influence of extraction method, water concentration and heating rate. Journal of Food Engineering, 62: 337-344.

Tapia Blacido D. 2006. Filmes a base de derivados do amaranto para uso en alimentos. Tese da Universidade Estadual de Campinas.

Villareal ME, Lescano NE, Iturriaga LB. 2009. Comportamiento físico y térmico de harinas y almidones de *Amaranthus cruentus*. Actas III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina 2009. Vol. II: 209.

Wang SS, Chiang W, Yeh A, Zhao B, Kim I. 1989. Kinetics of phase transition of waxy corn starch at extrusion temperatures and moisture contents. Journal of Food Science, 54: 1298–1301.

Caracterización de dispersiones acuosas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas por ruptura celular a altas presiones

Characterization of aqueous dispersions of *Saccharomyces cerevisiae* obtained by high-pressure treatments

Bosisio NA, Fernandez VE, Martínez LM, Palazolo GG, Wagner JR

Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Bernal, Argentina
gpalazolo@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue la caracterización microestructural, de la dispersibilidad proteica y el comportamiento de flujo de dispersiones acuosas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas por homogeneización a alta presión, analizando el efecto del pH y del número de recirculaciones por el dispositivo. Para reducir el contenido de ácidos nucleicos (ARN), la levadura panadera prensada se trató con NaOH 0,1 N a 50°C durante 30 y 60 minutos. Luego, la dispersión se trató térmicamente a 80°C para la inactivación enzimática, se enfrió a 25° C y se pasó a través de un homogeneizador de alta presión (1500 y 150 bar, primera y segunda válvula, respectivamente), recirculándose 1, 2 y 3 veces. El índice de dispersibilidad proteico (IDP %) de las dispersiones se evaluó a partir de la relación porcentual entre el contenido de proteína en el sobrenadante después de centrifugar a 15300*g* respecto al de la dispersión inicial. El diámetro promedio de partícula ($D_{3,2}$) se determinó utilizando un analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer y el comportamiento de flujo, empleando un viscosímetro Brookfield modelo DV-III+. Después del tratamiento alcalino, el contenido de ARN de las dispersiones iniciales se redujo significativamente (62 y 72 % a 30 y 60 minutos, respectivamente). El tratamiento a alta presión provocó la ruptura celular, evaluada por microscopía óptica, el IDP se incrementó en función del número de circulaciones y el contenido de ARN no varió significativamente después de la ruptura. Estos resultados se atribuyeron al incremento en el contenido de proteínas dispersables de pared (mananoproteínas) y citosólicas. En medio alcalino, los valores de $D_{3,2}$ para la dispersión inicial, fueron superiores a los de las tratadas a alta presión en todo el rango de velocidades de agitación debido a la formación de agregados estables. Después de la ruptura celular, los valores de $D_{3,2}$ y de índice de consistencia (K) se incrementaron en función del número de circulaciones y especialmente al disminuir el pH, debido a la precipitación de proteínas citosólicas. Los agregados formados por precipitación se disocian con facilidad al incrementar la velocidad de agitación en el analizador de tamaño de partícula, lo que se traduce en un comportamiento pseudoplástico más pronunciado, el cual fue especialmente evidente a pH 4,0. En conclusión, el tratamiento alcalino y la ruptura celular permitieron obtener dispersiones con reducción significativa en el contenido de ARN y con mayor cantidad de proteína dispersable de reconocida capacidad emulsificante. El número de recirculaciones, junto el pH, permitiría el control de la agregación proteica y del comportamiento de flujo por lo que las dispersiones acuosas de levadura tratadas a altas presiones tienen potenciales aplicación como agente emulsificante y estabilizante en la formulación de emulsiones alimentarias.

ABSTRACT

The present article focuses on the microstructure, protein dispersibility and flow behavior of aqueous dispersions from yeast *Saccharomyces cerevisiae* obtained by high-pressure treatments. The effect of pH and recycling was analyzed. The pressed baker's yeast was treated in alkaline medium (NaOH 0.1 N) at 50°C for 30 and 60 minutes in order to reduce the nuclei acid content (RNA). Then, the aqueous dispersions were thermally treated at 80° C, cooled at 25° C and subsequently passed through twin-valve high-pressure homogenizer (1500 and 150 bar, first and second valve, respectively, 1-3 passes). Protein dispersibility index (PDI %) was determined after centrifugation (15300*g*) of initial and treated dispersions and expressed in g protein per 100 g of total protein. Sauter mean diameter ($D_{3,2}$) was obtained from particle size distribution (Malvern Mastersizer) and flow behavior was evaluated using a Brookfield DV-III+ viscosimeter. The RNA content was significantly reduced (62 and 72 % at 30

and 60 min, respectively) by effect of alkaline treatment. After high pressure treatment, the rupture of cell yeast was confirmed by optical microscopy. The aqueous dispersions exhibited an increase of PDI % when number of passes increased, whereas the RNA content was not showed significantly differences. This result is in accord with the increase of content of cytoplasm and cell wall proteins (mannoproteins) in supernatants after centrifugation step. In alkaline medium, $D_{3,2}$ values of initial dispersion were higher than those treated at high pressure in whole range of stirring pump speed. After cell rupture, $D_{3,2}$ and consistency index (K) increased with passes number, especially at pH 4.0, due to precipitation of cytoplasm proteins. Protein aggregates formed by precipitation are dissociated easily by increasing the stirring pump speed on the particle size analyzer, resulting in a more pronounced pseudoplastic behavior, which was particularly evident at pH 4.0. In conclusion, the alkaline treatment and rupture cell yielded aqueous dispersions with significant reduction in RNA content and greater amount of soluble and dispersible protein with high emulsifying capacity. The protein aggregation and hence, the flow behavior can be controlled by passes number and pH. Therefore, the yeast aqueous dispersions obtained by high-pressure treatments have a potential application as emulsifying and stabilizing agents in food emulsions.

PALABRAS CLAVE: *dispersiones acuosas, levadura, ruptura celular*.

KEYWORDS: *aqueous dispersions, cell rupture, yeast.*

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas y dentro de este grupo la especie *Saccharomyces cerevisiae* es una de las de mayor valor industrial (Soriano Santos y Guerrero Legarreta 2008). La utilización de las levaduras en la industria alimentaria se ha restringido a aplicaciones tradicionales como la capacidad de generar dióxido de carbono y etanol por fermentación, la cual es importante para la elaboración de cerveza, vino, bebidas destiladas y para la industria panadera (Otero *et al*. 2000). La biomasa obtenida como subproducto industrial es una fuente rica en proteínas y polisacáridos de alto peso molecular (β-glucanos y mananos de pared celular), por lo que desde el punto de vista tecnofuncional tienen potencial aplicación como agentes emulsificantes, espumantes y estabilizantes. Sin embargo, la biomasa de levadura exhibe una pobre funcionalidad, dado que las células enteras son poco hidratables, dan dispersiones acuosas de baja viscosidad, no forman geles ni exhiben propiedades emulsificantes ni espumantes (Barriga *et al.* 1999, Otero *et al.* 2000). Además, la biomasa tiene un elevado contenido de ácidos nucleicos (principalmente ácidos ribonucleicos, ARN), una baja digestibilidad proteica por la presencia de la pared celular y componentes que dan "off-flavors". Por lo tanto, para el empleo de la levadura en la formulación de alimentos, se debe incrementar la digestibilidad proteica y reducir el contenido de ARN en forma química o enzimática (Wagner y Otero Rambla 2008). Se ha demostrado que la reducción de ARN en medio alcalino mejora al mismo tiempo las características sensoriales ya que permite la eliminación de componentes que contribuyen con aromas y sabores indeseables. En medio alcalino, las uniones 2,5 fosfodiéster entre los restos adyacentes de nucleótidos se escinden y forman un diéster cíclico (Otero y Cabello 1980, Wagner y Otero Rambla 2008). Por otro lado, la ruptura celular por medios mecánicos y no mecánicos es una de las formas más eficientes de incrementar la digestibilidad, al mismo tiempo que permite liberar las proteínas y otros componentes importantes del interior de la célula (Otero *et al*. 1996). En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue la caracterización microestructural, de la dispersibilidad proteica y del comportamiento de flujo de dispersiones acuosas de levadura obtenidas por homogeneización a alta presión, analizando el efecto del pH y del número de recirculaciones por el dispositivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La levadura prensada panadera (Calsa S.A., Argentina) se adquirió en un comercio local. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Reducción del contenido de ácidos nucleicos

La levadura prensada se disgregó finamente y se dispersó en NaOH 0,1 N (relación de masa 1:4) bajo agitación magnética, luego se incubó a 50° C durante 30 y 60 minutos (baño termostático Vicking Modelo Masson II, Buenos Aires, Argentina). La dispersión resultante se centrifugó a 3840×*g* (centrífuga Beckman Coulter Avanti J2-MC, rotor JA-14, Beckman Coulter, Fullerton, Estados Unidos) durante 15 minutos. El sobrenadante se desechó y el pellet se reconstituyó con agua destilada (relación de masa 1:3). El porcentaje de ARN en las dispersiones tratadas en medio alcalino y sin tratamiento se determinó por el método espectrofotométrico de Rut (1973), previa extracción con $HClO_4$ 0,5 M. Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

Inactivación enzimática y ruptura celular

En un trabajo previo se observó que en un análisis de calorimetría diferencial de barrido, una dispersión concentrada de células enteras de levadura *S. cerevisiae* exhibió dos endotermas con valores de temperaturas de pico (T_p) de 66 y 74° C (Sceni *et al.* 2009). Por consiguiente, antes de la ruptura celular se realizó un tratamiento térmico de 80° C (por encima de ambas T_p) para asegurar la inactivación enzimática; luego, la dispersión tratada térmicamente se enfrió rápidamente a 25° C y se pasó a través de un homogeneizador a válvula de alta presión (Panda 2K, GEA Niro Soavi, Parma, Italia) (1500 y 150 bar, primera y segunda válvula respectivamente), circulando 1, 2 y 3 veces por el dispositivo. El pH de las dispersiones luego de la ruptura fue de 11,0 ± 0,5. Con la finalidad de evaluar el efecto del pH sobre la dispersibilidad proteica, microestructura y comportamiento de flujo, se agregó ácido cítrico sólido hasta alcanzar valores finales de pH de 6,5 y 4,0.

Dispersibilidad proteica

El índice de dispersibilidad proteico (IDP %) se calculó a partir de la relación porcentual entre el contenido de proteína en el sobrenadante después de centrifugar a 15300*g* (centrífuga Beckman Coulter Avanti J2-MC, rotor JA-14, Beckman Coulter, Fullerton, Estados Unidos) respecto al de la dispersión inicial. El porcentaje de proteína bruta se calculó por el método de Kjeldahl (N×6,25, Cunniff 1997) y fue corregido por el contenido de ácidos nucleicos a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ proteína (corregido)} = \% \ (N_T - N_{ARN}) \times 6{,}25$$

N_T es el porcentaje de nitrógeno total y N_{ARN} es el porcentaje de nitrógeno proveniente de ARN, el cual se calculó a partir del porcentaje de ARN utilizando un factor de conversión de 5,7 (Sceni *et al. 2009*). Las medidas se realizaron por triplicado.

Distribución de tamaño de partícula

Se llevó a cabo por medidas de dispersión de luz (λ = 683 nm y 455 nm) en un analizador Malvern Mastersizer 2000E, Worcestershire, Reino Unido). Las dispersiones acuosas se agitaron suavemente por inversión, se tomaron alícuotas y se diluyeron en 600 ml de agua. Las mediciones se realizaron a velocidades crecientes de agitación en la unidad de dispersión (Hydro 2000 MU, Worcestershire, Reino Unido) (600 a 2500 rpm). Las determinaciones de tamaño de partícula se obtuvieron a partir de los patrones de dispersión de luz utilizando índices de refracción 1,52 y 1,33 para la fase dispersa y el agua, respectivamente y un coeficiente de absorción de 0,1. El diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$) se obtuvo a partir de las correspondientes distribuciones de tamaño de partícula. Este diámetro es aparente ya que su valor depende de la velocidad de agitación en la unidad de dispersión.

Microscopía óptica de contraste de fase

Las microfotografías se obtuvieron en un microscopio óptico de contraste de fase, con una cámara digital adaptada (Canon Power Shot A570 IS, Canon Inc., Malasia). Las dispersiones se diluyeron previamente con agua destilada en proporción volumétrica 1:1 y el aumento fue de 400×.

Comportamiento de flujo

Las curvas de fluidez se obtuvieron utilizando un viscosímetro Brookfield RVDV-III+ (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Estados Unidos), con geometría de cilindros concéntricos y aguja SC4-21. El rango de velocidades de deformación por corte fue de 0 a 232,5 s^{-1}. Las mediciones se analizaron con el software Rheocalc V2.1 y las curvas de flujo se analizaron con la ecuación de la Ley de la Potencia:

$$\tau = K \times D^n$$

τ es el esfuerzo de corte y D es la velocidad de deformación por corte. Para obtener sus parámetros, se graficó el logaritmo de esfuerzo de corte (log τ) en función del logaritmo de la velocidad de deformación por corte (log D) y se realizó un ajuste por análisis de regresión lineal. El índice de comportamiento de flujo (n) se obtuvo a partir del valor de la pendiente de la recta de ajuste, en tanto que el índice de consistencia (K) se obtuvo luego de aplicar el antilogaritmo al valor de la intersección entre la recta de ajuste y el eje de las ordenadas.

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se analizaron por análisis de la variancia (ANOVA) de una variable. Las diferencias entre medias, con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0,05$), se evaluaron con el Test de Fisher utilizando el programa Statgraphics Plus v. 5.1 para Windows (Statistical Graphics Corporation, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según Wagner y Otero Rambla (2008), la reducción del ARN no es efectiva si las temperaturas de tratamiento se mantienen relativamente bajas, aún a valores de pH altos. Por lo tanto, en el presente trabajo, el tratamiento de reducción de ARN sobre la dispersión inicial se evaluó a 50° C utilizando NaOH 0,1 N. Después del tratamiento alcalino, el contenido de ARN de las dispersiones iniciales (6,3 ± 0,5 % p/p, en base seca) disminuyó significativamente, con porcentajes de reducción de 61,9 ± 14,7 y 72,4 ± 10,0 % a 30 y 60 minutos de incubación, respectivamente, lográndose la mayor reducción en los primeros 30 minutos. En *S. cerevisiae*, el rango óptimo de temperatura para la degradación de ARN por activación de ribonucleasas es de 50-52° C. Las ribonucleasas son enzimas temperatura-pH dependientes y actúan de manera óptima en condiciones levemente ácidas (Otero *et al*. 1981). Por consiguiente, es esperable que la degradación transcurra principalmente por vía química, aunque no es posible descartar la contribución de las nucleasas intracelulares debido a la temperatura empleada (50º C). Por otro lado, el contenido de ARN en las dispersiones no presentó variaciones significativas durante de la ruptura celular, independientemente del número de circulaciones por el homogeneizador (**Tabla 1**).

Tabla 1. Índice de dispersibilidad proteico (IDP %) y porcentaje de ARN (% p/p, en base seca) de dispersiones acuosas de levadura *S. cerevisiae* sometidas a ruptura celular a alta presión. Antes del proceso de ruptura, las dispersiones sometieron a un tratamiento alcalino previo (30 minutos, 50º C) para reducir el contenido de ARN.

Dispersión acuosa	IDP (%)	ARN (% p/p, base seca)
1º circulación	$38,3 \pm 2,9^{a}$	$2,4 \pm 1,0^{d}$
2º circulación	$49,8 \pm 6,8^{b}$	$2,5 \pm 1,1^{d}$
3º circulación	$57,7 \pm 9,1^{b}$	$2,4 \pm 0,9^{d}$
3º circulación, pH 6,5	$3,9 \pm 5,3^{c}$	$2,1 \pm 0,8^{d}$

Los valores de IDP % y ARN % se expresan como promedio ± desviación estándar. En cada columna, los valores seguidas por el mismo superíndice no son significativamente diferentes ($p<0,05$).

El tratamiento a alta presión provocó la ruptura celular, evaluada por microscopía óptica de contraste de fase, donde se observó la presencia de células rotas y fragmentos de pared celular especialmente después de la segunda y tercera circulación (**Figura 1 a-d**). Independientemente del número de circulaciones por el homogeneizador, después de centrifugar las dispersiones se obtuvieron sobrenadantes turbios. Por consiguiente, es más conveniente referirse a dispersibilidad proteica en vez de solubilidad aunque en los sobrenadantes hay tanto proteína soluble como proteína dispersa en forma de pequeñas partículas. En este último caso, es probable que la proteína dispersa esté formando complejo con polisacáridos. El índice de dispersibilidad proteico (IDP %) de la dispersión inicial, antes de la ruptura celular fue ~ 0 atribuible al encapsulamiento de las proteínas por efecto de la pared y la membrana celular en las células enteras. Al centrifugar esta dispersión se observó un sobrenadante límpido. Después de la ruptura celular el IDP % evidenció una tendencia creciente en función del número de circulaciones, mientras que el porcentaje de ARN no exhibió variaciones significativas ($p<0,05$, **Tabla 1**). Este resultado está de acuerdo con un mayor contenido de proteínas de pared celular dispersables en medio alcalino (mananoproteínas) y proteínas citosólicas a medida que se incrementa el número de pases por el homogeneizador. Las mananoproteínas provenientes de la pared celular tienen una elevada actividad superficial y reconocida capacidad emulsificante (Barriga *et al*.

1999, Sceni *et al*. 2009) Cuando el pH disminuyó desde 11,0 hasta 6,5 por adición de ácido cítrico, el IDP % disminuyó marcadamente, de 57,7 % a menos de 4 % ($p<0,05$, **Tabla 1**).

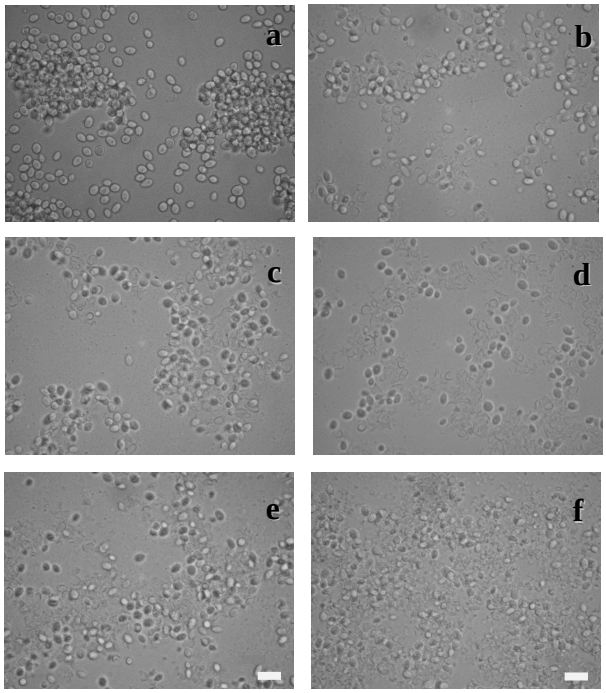


Figura 1. Micrografías ópticas (400×) de dispersiones de levadura *S. cerevisiae*: a, Inicial; después de la ruptura, b: 1° circulación, c: 2° circulación; d: 3° circulación; e: 3° circulación a pH 6,5; f: 3° circulación a pH 4,0. Las barras indican 10 μm.

Por otra parte, las dispersiones acuosas se caracterizaron por medidas de difracción láser, utilizando el analizador de tamaño de partícula Malvern Mastersizer, que permite obtener las distribuciones de tamaño de partícula (DTP) a partir de los patrones de dispersión de luz en base a la Teoría de Mie. Este método brinda resultados complementarios a los obtenidos en la determinación de IDP %, ya que se analizan las DTP de la totalidad de partículas en dispersión antes y después de la ruptura celular. En cambio, en las determinaciones de IDP %, conjuntamente con la proteína soluble, sólo se evalúa el porcentaje de nitrógeno proveniente de las partículas dispersas más finas en el sobrenadante después de una centrifugación a alta velocidad. Las DTP se determinaron en condiciones de alta dilución (> 1/1000) y agitación, para asegurar la homogeneidad del sistema e impedir la sedimentación de las partículas de la muestra en el recipiente que las contiene. El diámetro promedio de Sauter ($D_{3,2}$, también llamado diámetro volumen-superficie) se obtuvo a partir de las DTP medidas a distintas velocidades de agitación, por lo que es un diámetro de partícula aparente. En medio alcalino, en la dispersión inicial, $D_{3,2}$ fue superior al de las dispersiones tratadas a alta presión en todo el rango de velocidades de agitación. Esto se atribuye probablemente a la presencia de agregados celulares observados por microscopía óptica, los cuales son estables debido a que $D_{3,2}$ se mantiene constante en función de la velocidad de agitación en la unidad de dispersión (**Figuras 1 a** y **2**). Después de la ruptura celular, $D_{3,2}$ se incrementó en función del número de circulaciones, efecto más evidente a bajas velocidades de agitación (600 rpm). La disminución de pH por adición de ácido cítrico produjo un significativo incremento de $D_{3,2}$ especialmente a pH 4,0, por efecto de la precipitación de proteínas citosólicas. Los agregados formados por precipitación, que pueden apreciarse especialmente en la **Figura 1f**, fueron menos estables que los formados en la dispersión inicial, ya que $D_{3,2}$ disminuyó casi linealmente con el incremento de la velocidad de agitación. Este mismo comportamiento se observó para la dispersión a pH 6,5 (**Figuras 1e** y **2**).

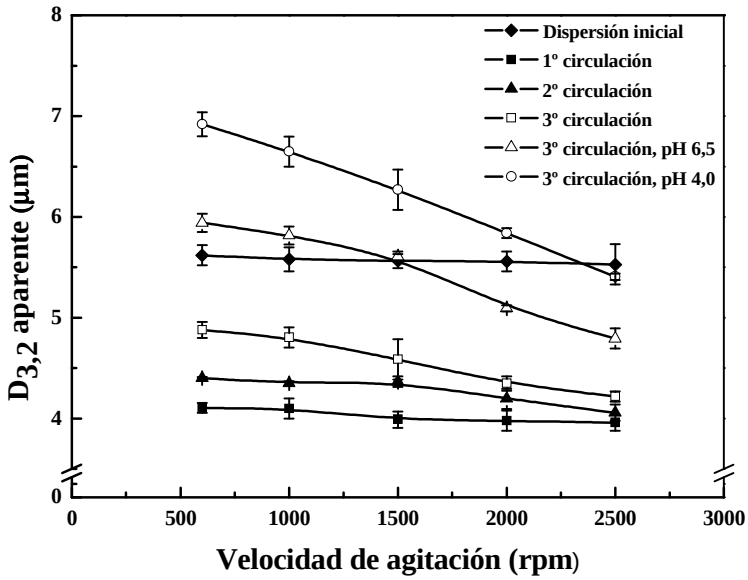


Figura 2. Efecto de la velocidad de agitación (rpm, en la unidad de dispersión) sobre el diámetro promedio de Sauter aparente ($D_{3,2}$) de dispersiones acuosas de levadura *S. cerevisiae*. Los valores obtenidos a cada velocidad de agitación son el promedio de al menos dos determinaciones independientes.

En la **Figura 3** se observan las curvas de flujo de las dispersiones alcalinas de levadura circuladas por el homogeneizador 1, 2 y 3 veces junto a las de 3 veces a dos valores adicionales de pH: 6,5 y 4,0. En todos los casos, estas dispersiones presentaron un comportamiento no newtoniano de carácter pseudoplástico, dado que los valores de índice de comportamiento de flujo (n) estuvieron comprendidos en el rango entre 0 y 1 (**Tabla 2**). Este comportamiento pseudoplástico se atribuye a una disminución de la viscosidad aparente a medida que se incrementa la velocidad de deformación ("*shear thinning behavior*"). Según la tendencia mostrada por las curvas de fluidez, se puede afirmar que los parámetros que gobiernan a las mismas indican un incremento del índice de consistencia, K, con el número de circulaciones y por otro lado, a menor pH, se observa un mayor valor de K. El índice de comportamiento de flujo (n) muestra una tendencia opuesta respecto a K, lo cual indica que el incremento en el número de circulaciones por el homogeneizador de alta presión y la disminución de pH genera dispersiones de mayor pseudoplasticidad (**Tabla 2**).

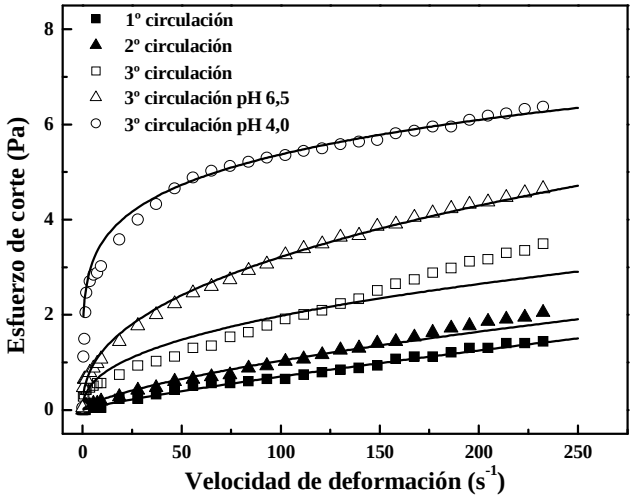


Figura 3. Curvas de flujo de dispersiones acuosas de levadura *S. Cerevisiae* después de la ruptura celular. Los puntos experimentales fueron modelados por la ecuación de la ley de la Potencia.

El factor principal que influye en el comportamiento viscosimétrico de las dispersiones proteicas es el diámetro aparente de las moléculas o partículas dispersas. La viscosidad también se incrementa exponencialmente con la concentración proteica, a causa de las interacciones que se establecen entre

las moléculas de proteína (Cheftel *et al*. 1989). En nuestro caso, el contenido de proteína en las dispersiones es relativamente elevado (proteína corregida = 4,27 % p/p, N×6,25); al disminuir el pH, la interacciones proteína-proteína en la dispersión acuosa se incrementan, lo que se traduce en un aumento de K (**Tabla 2**). Sceni *et al*. (2009), al realizar un fraccionamiento de un homogenato de levadura *S. cerevisiae*, encontraron que una parte importante de las proteínas citosólicas precipitan a pH 4,5. Los agregados formados por precipitación se disocian con facilidad al incrementar la velocidad de agitación en el analizador de tamaño de partícula, lo que se traduce en un comportamiento pseudoplástico más pronunciado para la dispersión a pH 4,0 (**Figuras 2** y **3**, **Tabla 2**).

Tabla 2. Índices de consistencia (K) y de comportamiento de flujo (n) de dispersiones acuosas de levadura *S. cerevisiae*. Los valores de K y n se obtuvieron mediante la aplicación de la ley de la Potencia a los datos experimentales.

Dispersión acuosa	K (Pa.s^n)	N
1º circulación	0,015	0,83
2º circulación	0,047	0,67
3º circulación	0,28	0,42
3º circulación, pH 6,5	0,47	0,41
3º circulación, pH 4,0	2,31	0,18

CONCLUSIONES

El tratamiento alcalino y la ruptura celular permitieron obtener dispersiones acuosas de levadura con reducción significativa en el contenido de ARN y mayor cantidad de proteína en dispersión. Las mananoproteínas que provienen de la pared celular y son extraídas en medio alcalino, tienen reconocida actividad superficial y capacidad emulsificante. El número de circulaciones en el homogeneizador a alta presión, conjuntamente con la variación de pH después de la ruptura celular permiten modular la dispersibilidad proteica y el diámetro promedio de las partículas en dispersión; éste último parámetro tiene una relación directa con el comportamiento de flujo que exhiben las dispersiones. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que las dispersiones de levadura obtenidas por ruptura celular a altas presiones en medio alcalino tienen aplicación potencial no sólo como agentes emulsificantes, debido a la presencia de proteínas con elevada actividad superficial (mananoproteínas) sino también como agentes estabilizantes y espesantes en la formulación de emulsiones alimentarias ácidas, como emulsiones tipo crema y aderezos, en las cuales se agregan acidulantes para incrementar la vida útil.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICTO-UNQ 2006 34673: Ingredientes con propiedades funcionales de fuentes no convencionales para la industria alimentaria) y a la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D: Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario) por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cunniff P. 1997. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. Sixteenth edition, third revision. Gaithersburg: AOAC International.

Barriga JAT, Cooper DG, Idziak ES, Cameron DR. 1999. Components of bioemulsifier from *S. cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 25: 96-102.

Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. 1989. Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas. Zaragoza: Editorial Acribia.

Otero MA, Bueno GE, González, AC. 1981. Influence of growth rate on RNA degradation by intracelular Rnase, Biotechnology Letters, 3: 537-541.

Otero MA, Cabello AJ. 1980. SCP low in nucleic acid by alkaline treatment. Biotechnology letters, 2:379-382.

Otero MA, Vasallo MC, Verdecia O, Fernández M, Betancourt D. 1996. A process for the complete fractionation of baker's yeast. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 67:67-71.

Otero MA, Wagner JR, Vasallo MC, García L, Añón MC. 2000. Thermal behavior and hydration properties of yeast protein from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. Food Chemistry, 69: 161–165.

Rut M. 1973. Determination of nucleic acids in yeast and yeast-related products. Kvasny Prumysl, 19:131-133.

Sceni P, Palazolo GG, Vasallo MC, Puppo MC, Otero MA, Wagner JR. 2009. Thermal and surface behavior of yeast protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae*. Lebensmittel, Wissenschaft und Technologie, 42:1098-1106.

Soriano Santos J, Guerrero Legarreta I. 2008. La levadura como complemento alimentario para humanos. En: Wagner JR, Otero Rambla MA, Guerrero Legarreta I, editores. Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos. Bernal: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Pág. 149-162.

Wagner JR, Otero Rambla MA. Proteínas y aminoácidos de levadura. En: En: Wagner JR, Otero Rambla MA, Guerrero Legarreta I, editores. Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos. Bernal: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. Pág. 163-179.

Estudio del equilibrio y cinética de la absorción de agua del puré deshidratado de mandioca

Study on equilibrium and kinetics of water absorption in dried mandioca purée

Brousse M* (1), Nieto A (2), Linares R (1), Paredes A (1), Valdez E (1), Vergara L (1)

(1) Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones
(2) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires
marcelabrousse@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

El puré deshidratado de mandioca es un producto obtenido a partir de la raíz de mandioca (Manihot esculenta), mediante un proceso tecnológico sobre las raíces limpias y peladas. Este proceso fue desarrollado con la finalidad de su uso directo después de la reconstitución o como producto intermedio para la obtención de pastas (especialidades para celíacos), snacks, mezclas secas para alimentos, etc. El producto es de reciente desarrollo, por lo que no se dispone de información respecto a las propiedades físicas, fisicoquímicas y funcionales. El presente trabajo consistió en la determinación del Índice de Absorción de Agua y la Cinética de Absorción de Agua. El Índice de Absorción de Agua se incrementa con el aumento de la temperatura. La cinética de absorción de agua ajusta adecuadamente con las ecuaciones de Peleg y de Pilosof. La velocidad de absorción de agua es mayor en las partículas de menor tamaño.

ABSTRACT

Dehydrated mashed cassava is a product made from the cassava root (Manihot esculenta), through a technological process consists in cooking, pressing and drying the roots clean and peeled. This process was developed with the purpose of direct use after reconstitution, or as an intermediate product for the manufacture of pasta (especially for celiac), snacks, dry mixes for food, etc. The product is new one, so there is no information regarding the physical, chemical and functional properties. The design of technological processes, products or the equipments requires have knowledge about mentioned parameters. The present work consisted in the determination of water absorption index and the water absorption kinetics dehydrated cassava mashed. The water absorption index increases with increasing temperature. The kinetics of water absorption fits well with the equations of Peleg and Pilosof. The rate of water absorption is higher in smaller particles

PALABRAS CLAVES: *Puré de mandioca, cinética absorción de agua, índice de absorción de agua.*

KEYWORDS: *Cassava mashed, kinetic of the water absorption, water absorption index.*

INTRODUCCIÓN

La mandioca (Manihot esculenta) es una planta de la familia de las euforbiáceas, extensamente cultivada y utilizada industrialmente para la obtención de almidón a partir de sus raíces.

El puré deshidratado de mandioca consiste en un producto obtenido a partir de la raíz de mandioca (Manihot esculenta), mediante un proceso tecnológico consistente en la cocción, prensado y deshidratación de las raíces de mandioca limpias y peladas. Este proceso fue desarrollado a escala industrial por el grupo de investigación, con la finalidad de su uso directo después de la reconstitución o como producto intermedio para la obtención de pastas (especialidades para celíacos), snacks, mezclas secas para alimentos, etc. El puré de mandioca deshidratado fue desarrollado como nueva alternativa de producción para la Cooperativa Agrícola e Industrial San Alberto Limitada en la localidad de Puerto Rico (Misiones), y su fabricación se iniciará a partir del año 2009.

El diseño de líneas de producción y de los equipos que las integran se basa en los conceptos de las operaciones unitarias, los cálculos de los mismos, desde los balances de masa y energía hasta las ecuaciones cinéticas, requieren el conocimiento de las propiedades físicas, químicas y funcionales de los productos deshidratados y reconstituidos. En otros trabajos se están estudiando las propiedades de capacidad y conductividad térmica, densidades, comportamiento reológico, etc. En el presente trabajo se busca conocer el comportamiento de hidratación del puré deshidratado, la cantidad máxima de agua que es capaz de absorber y la velocidad con que la misma se incorpora a la masa, con la finalidad de poder estimar en los procesos de hidratación la cantidad de agua absorbida y tiempos requeridos para la hidratación, durante la reconstitución del puré. Los objetivos del presente estudio son conocer: el índice de absorción de agua, los parámetros de la absorción de agua (velocidad de rehidratación del puré y capacidad de absorción) y ajustar los datos experimentales de velocidad de absorción a las ecuaciones de Peleg y Pilosof.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizó para los ensayos puré de mandioca de la variedad Concepción elaborada a escala piloto en la Cooperativa Agrícola e Industrial San Alberto Limitada de la Provincia de Misiones (2008).

Métodos

Determinación del Índice de Absorción de Agua (WAI)

El índice de absorción de agua (WAI) es un parámetro físico que indica la capacidad del producto de retener agua. Sus valores son proporcionales al daño producido en las células por el proceso tecnológico**.** Su determinación se realizó de la siguiente manera: se pesaron en un tubo de centrífuga dos gramos de muestra seca puré de mandioca, se agregó 20 mL de agua al tubo, se agitó vigorosamente. El tubo se colocó en un baño termostático durante treinta minutos repitiendo el procedimiento de agitación a los 10 y 20 minutos, los ensayos se realizaron a 30, 40 y 50ºC, se centrifugó en una centrifuga marca Rolco, modelo 3070, durante 15 min. a 3000 rpm. Se decantó el agua del tubo, dejando el gel en su interior. Se pesó el tubo y el contenido. (Martines-Serna Villagran *et al.* 2006). Las determinaciones se realizaron por triplicado.
El WAI se calcula mediante:

WAI = [(peso del tubo + el gel) – (peso del tubo)] / (peso de la muestra seca) (1)

Los resultados se analizaron estadísticamente a través de un ANOVA SIMPLE mediante software estadístico GraphPad Prism 4.0.

Determinación de la cinética de absorción de agua

El estudio de cinética de absorción de agua nos permite conocer la velocidad de absorción espontánea de agua de materiales alimenticios en polvo. Mediante este ensayo podemos determinar la velocidad de rehidratación del producto, parámetro importante desde el punto de vista tecnológico y además la capacidad máxima de absorción de agua por el material. Los ensayos se llevaron a cabo a las granulometrías siguientes: entre 50 y 100 mesh (identificada como 50 mesh), entre 100 y 150 mesh (identificada como 100 mesh) y que pasa por 150 mesh (identificada como 150 mesh). La cinética de absorción de agua se determinó para los diferentes tamaños de partículas con un equipo propuesto por Torgensen y Toledo (1977), que es una modificación del aparato diseñado por Baumann (1966) consistente en un filtro Büchner de 4 cm de diámetro en el cual se coloca un papel de filtro Whatman. El filtro está conectado mediante una manguera flexible a una pipeta graduada 2 mL, sostenida en posición horizontal y al mismo nivel que el papel de filtro. El sistema se mantiene a una temperatura de 25ºC constante y se llena con agua, evitando la incorporación de burbujas y se coloca el papel de filtro dejando que se embeba en agua. Con un papel absorbente se elimina el exceso de agua sobre el papel hasta lograr enrasar a cero la columna de agua en la pipeta. Para la determinación de la velocidad de absorción de agua en el puré de mandioca deshidratado se tomó una pequeña cantidad exactamente pesada (0,1 g) de muestra de puré en polvo de los diferentes tamaños, se disperso uniformemente sobre el papel de filtro y se registró el volumen de agua tomado por la muestra a diferentes intervalos de tiempos, durante 2 horas. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Determinación de los parámetros cinéticos

Modelo cinético de Peleg (1988). Los resultados obtenidos se modelaron con el modelo empírico de Peleg (1988), que describe la cinética de absorción de agua según la ecuación:

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \tag{2}$$

Donde K_1 y K_2 son parámetros cinéticos que se obtienen a partir de los datos experimentales mediante correlación no lineal con el software estadístico GraphPad Prism 4.0.

La constante K_1 está relacionada con la velocidad de absorción (B_0) en el momento inicial (t = 0):

$$B_0 = \frac{1}{K_1} \tag{3}$$

Cuando el tiempo $t \rightarrow \infty$ la relación de la constante K_2 con la concentración de equilibrio está dada por:

$$C_e = C_0 + \frac{1}{K_2} \tag{4}$$

C_e es el contenido de humedad en el equilibrio (que nos da el máximo de capacidad de absorción de agua) y C_0 es el contenido de humedad inicial de la muestra.

Modelo cinético de Pilosof *et al.* (1985). Los valores se ajustaron al modelo cinético de Pilosof *et al*. (1985), expresado por la siguiente ecuación:

$$q = \frac{Q.t}{B + t} \tag{5}$$

Donde *q* es la cantidad de agua absorbida en el tiempo t, *Q* se refiere a la capacidad de absorción de agua, *B* se refiere al tiempo en que se absorbida la mitad de la capacidad total de absorción (Q/2).

Por diferenciación de la ecuación, respecto del tiempo la velocidad de absorción de agua:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{1}{B.Q}(Q - q)^2 \tag{6}$$

esta ecuación es similar a una ecuación cinética de segundo orden donde la constante es:

$$K = (B.Q)^{-1} \tag{7}$$

Los valores de la constante *Q* y de *B* se obtienen a partir de los datos experimentales mediante correlación no linear con el software estadístico GraphPad Prism 4.0.

Cálculos de errores de los modelos

La bondad del ajuste de los modelos a los datos experimentales se estudia mediante los parámetros RMSE, MBE y Error porcentual dado por las ecuaciones:

$$RMSE_{(raizcuadradadelerrormediocuadratico)} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n} (c_{cal} - c_{\exp})_n^2}{n} \right]^{0.5} \tag{8}$$

$$MBE_{(errordedesviomedio)} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(c_{cal} - c_{\exp})_n}{n} \quad (9)$$

$$Error\% = \frac{\sum_{i=1}^{n}\frac{(c_{cal} - c_{\exp})_n}{c_{\exp n}}}{n} * 100 \quad (10)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Índice de Absorción de Agua (WAI)

La capacidad de retención de agua (WAI) expresa la cantidad de agua que permanece en el producto hidratado luego de la aplicación de una fuerza externa por centrifugación, Raghavendra *et al*. (2004), representando el agua más fuertemente absorbida a la matriz. El índice de absorción de agua se utiliza para medir la capacidad de retención de agua de los productos con almidón después de algún tratamiento, por ejemplo, una cocción, Ruales *et al.* (1993).

Los índices de absorción de agua aumentan con el incremento de la temperatura. La aplicación de un ANOVA concluye que existen diferencias significativas con la temperatura ($P<0,05$) para el rango de temperatura estudiado. Los valores experimentales se presentan graficados en la **Figura 1**. Los valores de WAI para el puré de mandioca varía entre 4,36 a 4,93 kg de agua/ kg de puré seco, en el rango de temperaturas estudiado. Estos valores son menores que los informados por Singh *et al.* (2003) para harinas preparadas con diferentes cultivares de papa (Kufri Badshah, Kufri Jyoti y Pukhraj) cuyos valores son de 5,82, 6,56 y 5,60 kg de agua/kg de harina seca. Las diferencias pueden deberse a las distintas morfologías de los gránulos de almidón de la mandioca y de la papa. (Singh y Singh 2002).

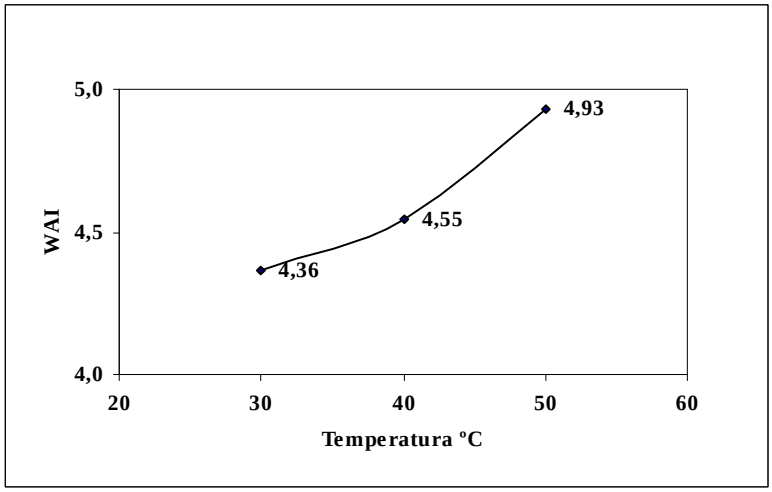


Figura 1. Índice de absorción de agua.

Cinética de absorción de agua

Aplicación del modelo de Peleg (1988) a la cinética de absorción de agua

Los datos cinéticos para la absorción de agua del puré se ajustaron al modelo de Peleg (1988), mediante la ecuación 3.

Los valores de los parámetros cinéticos K_1 y K_2, de la velocidad inicial B_0 (definida por la ecuación 3), de la concentración máxima de la solución C_e (definida por la ecuación 4) y de la bondad del ajuste del modelo se encuentran resumidos en la **Tabla 1**.

La aplicación de un ANOVA muestra que existen diferencias significativas ($P>0,05$) en los valores de la constante K_1 (**Tabla 1**), estos valores disminuyen cuando se aumenta el tamaño de partícula, significa que la velocidad inicial de absorción de agua (B_0), relacionada con la constante K_1 por la ecuación (3), es menor cuanto más pequeño es el tamaño de la partícula.

Para los valores de la constante K_2 un ANOVA muestra que existen diferencias significativas (P>0,05), con la variación de tamaño de partícula, esto significa que el valor de la concentración final de equilibrio C_e de absorción de agua, dado por la ecuación (4) está influenciada significativamente por la granulometría El valor de la concentración de agua absorbida de equilibrio C_e aumenta al aumentar el tamaño de partícula

Tabla 1. Valores de las constantes K_1 y K_2 de la ecuación de Peleg (1988), la velocidad inicial B_0, la concentración en el equilibrio C_e y de la bondad del ajuste del modelo.

Nº de Tamiz	**K_1** (ml. min g^{-1}.)	**K_2** (ml. min g^{-1}.)	**$B_0=1/K_2$** (g ml^{-1} min^{-1})	**C_e** (g.ml^{-1}.)	**r^2**	**Bondad de Ajuste**		
						RMSE	**MBE**	**E%**
150	1,08±0,31	2,46±0,19	0,92	0,476	0,93	0,002	0,006	19,3
100	0,64±0,10	1,73±0,14	1,57	0,646	0,97	0,001	-0,0008	9,3
50	0,47±0,08	1,48±0,154	2,14	0,748	0,91	0,005	0,007	21,3

El ajuste del modelo de Peleg M. (1988) con los valores experimentales de la cinética de absorción de agua en el puré deshidratado de mandioca es bueno, como lo demuestran los valores de r^2, RMSE, MBE y del error porcentual.

Este modelo se ha aplicado con éxito a diversos productos tales como amaranto (Resio *et al*. 2006), manzana (Bilbao-Sainz *et al.* 2005), zanahorias (Planinic *et al*. 2005), garbanzo (Gowen *et al*. 2006), arroz (Yadav y Jindal 2007), y soja (Gowen *et al*. 2007) durante la hidratación.

Aplicación del modelo de Pilosof M. R. (1985) a la cinética de absorción de agua

Los datos cinéticos para la absorción de agua del puré de mandioca se ajustaron al modelo de Pilosof M. R. (1985) mediante la ecuación (5).

Los valores de la constante Q de la ecuación del modelo equivalente a la capacidad de absorción de agua; de la constante B, equivalente a la mitad del tiempo necesario para alcanzar la concentración Q, de los valores de la constante cinética $K= (Q.B)^{-1}$, y la velocidad inicial de extracción $R_0=Q/B$, juntamente con los parámetros de la bondad del ajuste del modelo a los datos experimentales en función del tamaño de partículas del ensayo, se encuentran resumidos en la **Tabla 2** y los valores experimentales con las curvas del modelo se presentan en la **Figura 2**.

Tabla 2: Valores de la constante Q de la ecuación del modelo de Pilosof (1985), la constante B, la constante de velocidad K, la velocidad inicial R_0 y de la bondad del ajuste del modelo.

Nº de Tamiz	**Q** (g ml^{-1})	**B** (min)	**K** (ml g^{-1} ml^{-1})	**R_0** (gml $^{-1}$ min^{-1})	**r^2**	**Bondad de Ajuste**		
						RMSE	**MBE**	**E%**
150	0,46±0,03	0,27±0,08	7,97	1,71	0,94	0,0079	-0,043	15,9
100	0,63±0,02	0,26±0,03	6,09	2,44	0,99	0,0006	-0,001	12,1
50	0,73±0,06	0,24±0,05	5,65	3,05	0,94	0,0004	0,001	7,9

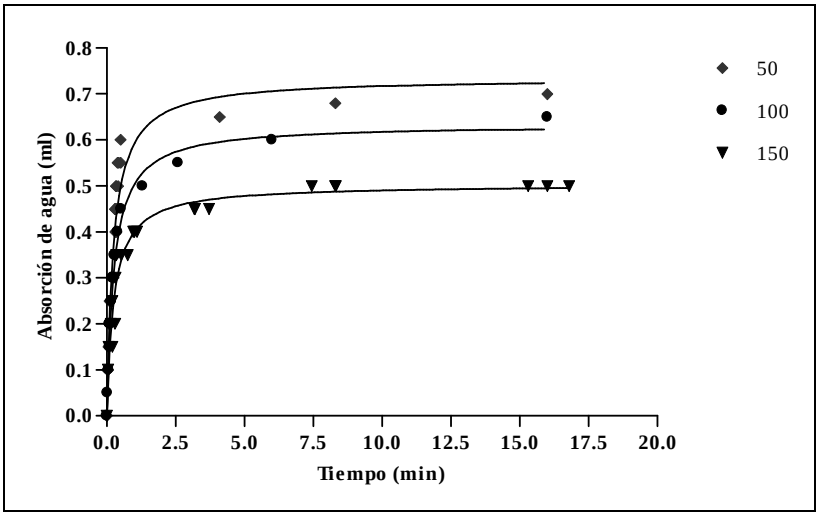


Figura 2. Datos experimentales y modelo de Pilosof (1985) para diferentes tamaños de partículas.

El ajuste del modelo de Pilosof M. R. (1985) a los datos experimentales de la absorción de agua en el puré de mandioca deshidratado es bueno como lo muestran los valores de r^2, RMSE, MBE y el error porcentual.
Un ANOVA sobre los valores de Q para la absorción de agua para el puré de mandioca, concluye que existen diferencias significativas con los tamaños de partículas ($P<0,05$). Estos valores de Q se incrementan con el incremento del tamaño de partícula, dentro del rango estudiado.
Para el parámetro B, un ANOVA muestra que existen diferencias significativas ($P>0,05$) entre los rangos de tamaños de partícula estudiados. Los valores de B disminuyen cuando se incrementa el diámetro de las partículas.
Para la constante cinética de extracción $K = (Q.B)^{-1}$, un ANOVA muestra que existen diferencias significativas ($P<0.05$) con el tamaño de partícula, en el rango ensayado. Se muestra que las partículas de menor tamaño presentan una mayor velocidad de absorción de agua.

CONCLUSIONES

A medida que aumentamos la temperatura, la relación entre la masa de agua retenida por unidad de masa de material seco (WAI), se incrementa. Los valores de WAI nos muestran una importante absorción de agua por parte del puré de mandioca, los valores obtenidos nos muestran que después de la reconstitución, el puré tendrá un peso entre 5,3 y 6 veces el peso del producto original, dado que cada 1 kg de producto seco absorbe las cantidades de 4,36, 4,55 y 4,93 kg. de agua/kg. sólido seco, dentro del rango de temperatura estudiado.
El ajuste de los datos experimentales a los modelos de Pilosof (1985) y Peleg (1988) es bueno como los indican los valores de los errores y los r^2. En general, mediante el análisis basado en estos modelos, la velocidad inicial de absorción de agua es influida significativamente por el tamaño de partícula estudiado, incrementándose cuando esta aumenta. La velocidad de absorción de agua es mayor en las partículas de menor tamaño.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bauman H. 1966. Apparatur nach Baumann zur Bestimmung der flússig-keitsaunahme von pulvrigen Substanzen. Fette, Seifen, Anstrim, 68: 741.

Bilbao-Sainz, C., Andres, A., Fito, P. 2005. Hydration kinetics of dried apples as affected by drying conditions. Journal of Food Engineering, 68:369-376.

Gowen, A., Abu-Ghannam, N., Frias, J., Oliveira, J. 2007. Influence of pre-blanching on the water absorption kinetics of soybeans. Journal of Food Engineering. 78: 965-971.

Gowen, A., Abu-Ghannam, N., Frias, J., Barat, J., Andres, A., Oliveira, J. 2006. Comparative study of quality changes occurring on dehydration and rehydration of cooked chickpeas subjected to combined microwave-convective and convective hot air dehydration. Journal of Food Science. 71:282-289.

Martines-Serna Villagran et al. The Procter & Gamble Company. 2006 Dehydrated potato flakes. U.S. patent 7,081,266 B2

Peleg, M.1988. An empirical – model for the description of moisture sorption curves. Journal of Food Science, 53(4): 1216-1219.

Pilosof A., Bartholomai G. y Boquet R. 1985. Kinetics of water uptake by food powders. J. Food Sci. 50:278-280.

Planinic, D., Velic, S., Bilic, M., Bucic, A. 2005. Modelling of drying and rehydration of carrots using Peleg's model. European Food Research and Technology. 221:446-451.

Raghavendra S., Rastogi N., Raghavarao K., Tharanathan R. 2004. Dietary fibre from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties. Eur Food Res Technol. 218:563-567.

Resio, A., Aguerre, R., Suarez, C. 2006. Hydration kinetics of amaranth grain. Journal of Food Engineering 72: 247-253

Singh, J. and Singh, N. 2002. Studies on the morphological and rheological properties of granular cold water soluble corn and potato starches. Food Hydrocolloids 17: 63-72.

Singh J., Singh N., Sharma T.R., Saxena S.K. 2003. Physicochemical, rheological and cookie making properties of corn and potato flours. Food Chemistry 83: 387–393

Torgensen and Toledo. 1977. Physical properties of protein preparations related to their functional characteristics in comminuted meat systems. J. Food Sci. 42: 1614-1618.

Yadav, B., Jindal, V. 2007. Water uptake and solid loss Turing cooking of milled rice in relation to its physicochemical properties. Journal of Food Engineering. 80: 46-54.

Evaluación sensorial de expandidos de maíz-soja fortificados con hemoglobina durante el almacenamiento a 3 temperaturas diferentes.

Sensorial evaluation of maize-soya extends fortified with haemoglobin, changes induced by storage at three different temperatures

Caballero MS(1), Costa SC(1), Bonaldo A(1), Drago SR(2), González R(1), Sabbag NG(1)

(1)Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química - UNL - Santa Fe (Argentina). (2) CONICET – Argentina. e-mail: nsabbag@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

La formulación de alimentos de interés social se orienta fundamentalmente, a satisfacer las necesidades de sectores carenciados, mediante la elaboración de productos de alta densidad calórica, alto contenidos de proteínas de buena calidad y de micronutrientes, utilizando una tecnología de bajo costo. En ese contexto se elaboraron expandidos de mezclas maíz: soja (88:12) con el agregado de hemoglobina, como fuente de hierro, y EDTA como promotor de la absorción del hierro, y se evaluó el deterioro sensorial sufrido durante de almacenamiento a tres temperaturas diferentes.

Entre los parámetros indicadores de la calidad sensorial de este tipo de productos se destacan color, sabor (mediante la aparición del defecto rancidez) y crocanticidad, siendo estos determinantes de la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores.

El objetivo del trabajo fue estudiar la estabilidad sensorial de expandidos maíz: soja (MS), maíz: soja + 0,5% Hemoglobina (MS+Hb) y maíz: soja + 0,5% Hemoglobina+EDTA (MS+Hb+EDTA) durante 50 días de almacenamiento a 12,5ºC, 30ºC y 45ºC.

De la evaluación del color se obtuvo que la muestra MS a 45ºC tuvo pérdida de color, lo cual se debería a la oxidación de los carotenos presentes en el maíz. En cambio, las muestras MS+Hb y MS+Hb+EDTA conservaron su color a 12,5ºC, pero a 30ºC y 45ºC presentaron descenso del color, lo que podría atribuirse a la apertura y ruptura del anillo porfirínico de la hemoglobina. El ANOVA indicó que el efecto de la temperatura fue el mismo para 30ºC y 45ºC y que el agregado de EDTA no produjo cambios en el color ($p>0,05$).

En la evaluación de la crocanticidad se obtuvo que MS, MS+Hb y MS+Hb+EDTA, conservadas a 12,5ºC y 30ºC, presentaron pérdida de la crocanticidad pero las muestras almacenadas a 45ºC tuvieron aumento en dicha característica. El ANOVA indicó que el efecto de la pérdida de la crocanticidad a 12,5ºC y 30ºC fue el mismo pero distinto a 45ºC ($p<0,05$) y el agregado de EDTA no produjo diferencias significativas en este parámetro sensorial ($p>0,05$).

La evaluación del sabor dio como resultado que las muestras MS almacenadas a 12,5ºC y 30ºC no desarrollaron rancidez, mientras que la muestra a 45ºC presentó gusto rancio. Las MS+Hb y MS+Hb+EDTA a 12,5ºC tampoco desarrollaron rancidez en el período de conservación indicado, pero sí las muestras a 30ºC y 45ºC. Del ANOVA se obtuvo que el efecto de la temperatura fue estadísticamente diferente para las tres muestras ensayadas siendo el efecto mayor a 45ºC ($p<0,05$), y que el agregado de EDTA no produjo ningún efecto en el desarrollo de rancidez de las muestras ($p>0,05$).

De este trabajo se puede concluir que estos expandidos formulados, y envasados en condiciones que aseguren un cierre hermético, se podrían conservar perfectamente a 12ºC sin que sufran deterioro de sus características sensoriales.

ABSTRACT

The use of legume proteins to improved nutritional value of snack foods has been recommended. Extruded samples were obtained from maize: soybean (88:12), mixture, fortified with hemoglobin concentrate, as Fe source, and EDTA as Fe absorption promoter and sensorial quality was evaluated, analyzing the loss of some attributes, during storage, at three different temperature.

Among the attributes which determine sensorial quality of “snack” type of product, color, flavor (by means of perception of rancidness) and crocanticity, are the most important and determinant of acceptability.
The objective this work was to evaluate the sensorial stability of three different extruded of samples: 1) mixtures maize: soybeans (MS); 2) MS + 0.5% hemoglobin (MS+Hb), and 3) MS + 0.5 % hemoglobin + EDTA (MS+Hb+EDTA). The evaluation was done during a storage period of 50 days and at three different temperatures (12.5ºC, 30ºC y 45ºC).
Colour evaluation showed that the colour intensity of the sample MS at 45ºC decreased, which could be attributed to the oxidation of the carotenoid pigments of maize. While samples MS+Hb and MS+Hb+EDTA preserved their colour at 12.5ºC, but at 30ºC and 45ºC a loss of colour was observed. This effect might be caused by the opening and break of the hemoglobin porfirin ring. The ANOVA showed that no significant differences were between samples maintained at 30ºC and at 45ºC and that the addition of EDTA did not produce changes in the color ($p > 0.05$).
The evaluation of crocanticity showed that MS, MS+Hb y MS+Hb+EDTA, maintained at 12.5ºC and 30ºC presented a loss of crocanticity, while an increased of this attribute was observed for samples maintained at 45ºC. The observed decrease at 12.5ºC and 30ºC, can be attributed to an increase in moisture content during storage and the reverse effect for the sample at 45ºC.
The ANOVA showed that no significant differences were between samples maintained at 12.5ºC and 30ºC and that the addition of EDTA did not produce changes in crocanticity ($p > 0.05$).
Finally, the evaluations of the flavor, showed that the samples MS maintained at 12.5ºC and 30ºC did not develop rancidness, but the sample to 45ºC did it. On the other hand, MS+Hb and MS+Hb+EDTA at 12.5ºC did not develop rancidness, while those samples maintained at 30ºC and 45ºC developed the undesirable rancid flavor. The ANOVA showed that the effect of the temperature was statistically significant for the three samples ($p < 0.05$), and again the addition of EDTA did not produce significant effect ($p > 0.05$).
We can conclude that in order to maintain sensorial quality, at least for 50 days, the extruded mixture fortified with hemoglobin and with added of EDTA should be storage at temperature not higher than to 12.5ºC.

PALABRAS CLAVE: *sensorial, expandidos, almacenamiento.*

KEYWORDS: *sensorial, expanded, storage.*

INTRODUCCIÓN

El término "desnutrición o malnutrición calórico - proteica" se refiere a la deficiencia que presentan las personas, y sobretodo los niños, que consumen una cantidad insuficiente de alimentos y que no alcanzan a satisfacer sus necesidades de energía y proteínas. La malnutrición calórica - proteica se presenta con mayor frecuencia y gravedad en los países que tienen elevados índices de pobreza y de inseguridad alimentaria, siendo los grupos más vulnerables a este tipo de deficiencia los niños lactantes y preescolares, y las mujeres embarazadas y en período de lactancia. (FAO 2000). Otra problemática social de gran importancia es la anemia por falta de hierro. Esta es la carencia nutricional más frecuente y afecta a un 34 % de la población mundial siendo un problema que se encuentra, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Boccio *et al.* 2004).
El hierro es un micronutriente que juega un papel fundamental en muchos procesos metabólicos incluyendo el transporte de oxígeno, el metabolismo oxidativo, el crecimiento celular y particularmente en la etapa de maduración cerebral del recién nacido (Lynch 1997). Además se encuentra en el organismo formando parte de numerosas biomoléculas con diferentes funciones bioquímicas y fisiológicas. Es por eso que su deficiencia produce diferentes trastornos funcionales. Muchas de las manifestaciones clínicas son consecuencia de la anemia, sin embargo otras se deben a la disminución de hierro en los distintos tejidos o bien ser una combinación de ambos procesos.
A pesar de que este elemento es uno de los más abundantes, su deficiencia representa un problema nutricional muy importante. Esto se debe a que la mayor parte del hierro en los alimentos se encuentra en formas poco absorbibles y en consecuencia de baja biodisponibilidad para el organismo. Los principales factores que determinan una adecuada incorporación del hierro al organismo son la cantidad de hierro total ingerido con la dieta, la proporción de hierro hemínico y no hemínico de la

misma, la presencia de promotores e inhibidores de la absorción de hierro no hemínico contenido en el alimento y el estado nutricional de la persona para este elemento (Boccio *et a.l* 2004). El hierro está presente en los alimentos en dos formas, una de ellas es la forma hemínica y la otra no hemínica. En los tejidos animales se encuentra el hierro hemínico (en hemoglobina y mioglobina) y la forma no hemínica formando parte de enzimas y depósitos (la ferritina y hemosiderina), pero también puede estar ligado a membranas y a compuestos de bajo peso molecular. Además, se puede encontrar ligado a proteínas en la leche y huevos. Los vegetales también contienen la forma de hierro no hemínico, acomplejado a componentes estructurales o de almacenamiento como los fitatos. La absorción del hierro hemínico es mucho más efectiva que la del hierro no hemínico (Lynch 1997).

La importancia del consumo de los cereales se debe a que no sólo se los considera una fuente de energía, sino que además suministran proteínas, aunque tienen una concentración relativamente baja de las mismas y su calidad se halla limitada por la deficiencia de algunos aminoácidos esenciales, sobre todo en lisina (FAO 1993).

Estudios realizados han propuesto el agregado de proteínas de soja al maíz puede ser una estrategia alternativa mejorando la calidad de las proteínas del maíz usando una mezcla maíz: soja 88:12, utilizando harina de soja entera, descascarada y con tratamiento térmico de inactivación de lipoxigenasa para desarrollar productos expandidos y sopas cremas mejorados nutricionalmente y con buenas características sensoriales (Pérez *et al.* 2008).

Además los cereales son los alimentos que más se utilizan como vehículo para la fortificación y sobre todo con hierro (Wolfgor *et al.* 1996).

Por lo tanto, una posible alternativa para tratar de solucionar las problemáticas nutricionales, es la elaboración de alimentos de interés social, destinados a programas alimentarios, en los cuales se deben considerar dos aspectos básicos. Por un lado valorizar el aporte nutricional, especialmente en el contenido y calidad proteica, como así también la biodisponibilidad de los nutrientes. Por otro lado, utilizar una tecnología apropiada para asegurar el bajo costo de los mismos, siendo la cocción por extrusión de mezclas a base de cereales la tecnología recomendada. La calidad proteica se puede mejorar utilizando fuentes de proteínas disponibles y de bajo costo. Los alimentos de interés social deben asegurar también un adecuado aporte de nutrientes esenciales, de manera de lograr un estado nutricional satisfactorio (Drago *et al.* 2007).

Ahora bien, dado que la aceptabilidad de un alimento depende no solo del aspecto nutricional, sino también del sensoriales, en primer lugar se debe establecer cuales son los atributos de calidad sensorial que definen la aceptación por parte de los consumidores. A partir de esta información, resulta interesante evaluar como y cuanto se modifican estas características por efecto del almacenamiento. Para éste producto en estudio, entre los parámetros indicadores de la calidad sensorial se destacan color, sabor y crocanticidad, siendo estos los más condicionantes de la aceptabilidad.

Bajo este contexto, se elaboran expandidos de mezclas de maíz: soja (88:12) fortificados con hemoglobina, como fuente de hierro, y de promotores de la absorción de dicho micronutriente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la estabilidad sensorial de expandidos conservados a 12,5ºC, 30ºC y 45ºC durante 50 días de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los expandidos y proceso de extrusión

Para la obtención de los expandidos, se fijó la proporción 88: 12 de la mezcla sémola de maíz: sémola de soja entera inactivada. Se seleccionó un nivel de reemplazo de hemoglobina de 0,5%. Esta elección del nivel de hemoglobina se basó en ensayos previos realizados en el ITA en los cuales se evaluaron tanto la operatividad del extrusor como las características sensoriales de los productos.

Además, como promotores de la absorción de hierro se evaluó la adición Na_2EDTA en relación molar aproximada Fe: EDTA (1:1). a 100g de mezcla en base seca.

Las muestras preparadas y sus códigos fueron las siguientes:

1- H. de maíz 88 % + H. de soja entera 12 % (Muestra control) (MS)

2- H. de maíz 87,5 % + H. de soja entera 12 % + 0, 5 % hemoglobina (MS+Hb)

3- H. de maíz 87,5 % + H. de soja entera 12 % + 0, 5 % hemoglobina + EDTA (MS+Hb+EDTA)

La extrusión de las mezclas a base de maíz se llevó a cabo en un extrusor Brabender 20 DN (Alemania) con tornillo de relación de compresión 4:1. Se utilizó un diámetro de boquilla de 3,5 mm por 20 mm de longitud y se fijó la velocidad de rotación del tornillo en 150 rpm y la temperatura del

extrusor en 160ºC (tanto en la zona del cilindro como en la zona de la boquilla). La temperatura del tratamiento se controló mediante calefactores en la zona de boquilla y en la zona anterior a la misma.

Almacenamiento de los expandidos

Las 3 muestras elaboradas (MS, MS+Hb y MS+Hb+EDTA), fueron secadas en estufas hasta 6% de humedad y almacenadas en bolsas de polipropileno con 80 g cada una y colocadas en cámaras con temperatura controlada (12,5ºC, 30ºC y 45ºC), por un período máximo de 50 días.

Evaluación sensorial

Para el estudio de la estabilidad sensorial de los expandidos en el tiempo, las muestras se analizaron a tiempo 0 (t0), a los 5 días y luego cada 10 días, hasta completar el almacenamiento.

Se seleccionaron los atributos color, crocanticidad y sabor (mediante la aparición del defecto rancidez) por considerar que son estos los mejores para determinar el grado de deterioro sensorial de los productos en estudio.

Un panel de 8 evaluadores entrenados analizó las muestras conservadas a las 3 temperaturas de ensayo, en el siguiente orden: 1º la muestra (MS), 2º la muestra (MS+Hb) y por último, la muestra (MS+Hb+EDTA). Se aplicó análisis descriptivo utilizando escalas no estructuradas de 10 cm ancladas en los extremos (1=casi nada, 9=mucho), las que fueron consensuadas por los integrantes del panel. Además, se establecieron los valores límites aceptables para cada atributo evaluado, siendo de 6 para color, 5 para crocanticidad y 2 para rancidez.

Análisis estadísticos

Con los valores medios obtenidos para cada atributo y para cada día de evaluación, se confeccionaron los gráficos de variación del atributo en función de la temperatura y el tiempo de conservación. Para establecer diferencias entre muestras, para atributo evaluado, se realizó test de ANOVA con un nivel de confianza del 95 %. Como soporte estadístico se utilizaron los programas Microsoft Office Excel 2003 y Statgraphics plus 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación del color

La evolución de dicho atributo para la mezcla maíz: soja (MS) durante el período de almacenamiento y a las tres temperaturas evaluadas, se puede observar en la **Figura 1**. De allí se obtiene que el color de la muestra conservada a 12,5ºC permaneció prácticamente sin modificaciones. La muestra conservada a 30ºC tuvo una evolución del color igual a la muestra anterior hasta los 20 días de conservación. A partir de allí, se observa una leve reducción de la intensidad del color que luego se mantuvo sin cambios hasta los 50 días de almacenamiento.

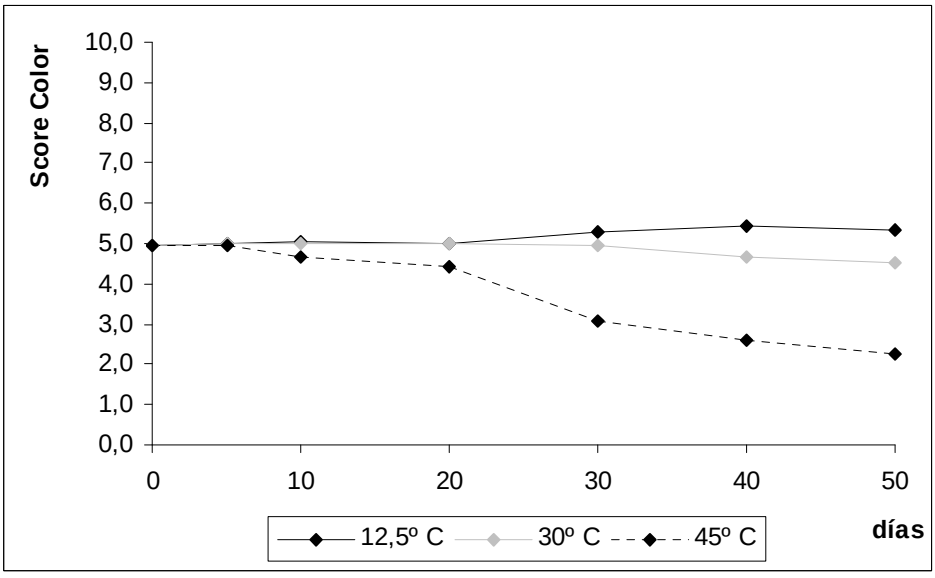


Figura 1. Evolución del color de las muestras MS: expandidos maíz: soja (88:12) en función del tiempo a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

En cambio, la muestra conservada a 45ºC presentó un comportamiento distinto. Hasta los 10 días, la intensidad fue semejante a la muestra de 30ºC, y a los 20 días la diferencia fue estadísticamente significativa ($p<0,0156$). A los 30 días, dicha propiedad descendió bruscamente y a partir de allí tuvo un descenso gradual hasta los 50 días. Las 3 muestras fueron estadísticamente diferente a los 40 días de almacenamiento ($p<0,0000$).
La temperatura produjo un efecto significativo en el comportamiento del color, ya que las 3 muestras fueron estadísticamente diferentes al final de la conservación. Por lo tanto, se podría concluir que los expandidos conservados a 12,5ºC mantuvieron su color mientras que los almacenados a 30ºC y 45ºC perdieron intensidad con el transcurso del tiempo, siendo mayor el efecto a 45ºC.
Esta pérdida de color se debería a la oxidación de los carotenos presentes en el maíz.
Por otro lado, la muestra MS+Hb a 12,5ºC prácticamente mantuvo el color durante el período de almacenamiento (**Figura 2**). En cambio, los expandidos a 30ºC y 45ºC presentaron una disminución gradual del color, comportándose a partir de los 30 días y hasta el final del almacenamiento de forma similar, es decir, la temperatura produjo el mismo efecto en las muestras almacenadas a 30ºC y 45ºC. Cabe destacar que el agregado de hemoglobina duplicó la intensidad del color respecto a la muestra control (MS), ya que ésta fue calificada al inicio con un valor de aproximadamente de 4 y en la muestra con hemoglobina, de 8.

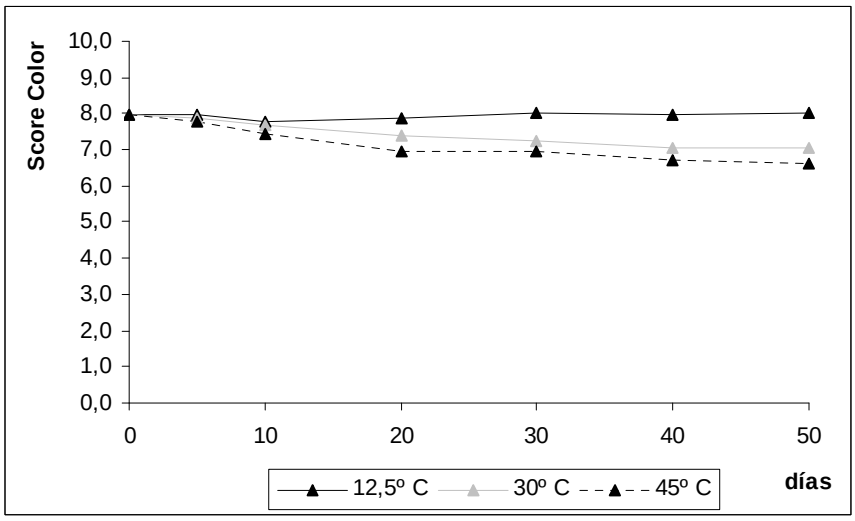


Figura 2. Evolución del color en función del tiempo de la muestra MS+Hb: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

El agregado de hemoglobina a la mezcla maíz: soja provocó un cambio de color, de amarillo a marrón, por lo que la hemoglobina enmascararía el color dado por los carotenos. Con el transcurso del tiempo, estas muestras también se decoloraron aunque el mayor efecto estaría asociado a la apertura y ruptura del anillo porfirínico de la hemoglobina.
De la misma forma, las muestras MS+Hb+EDTA tuvieron un comportamiento similar a MS+Hb. Esto se puede observar en la **Figura 3**. La muestra conservada a 12,5ºC prácticamente mantuvo el color durante los 50 días de almacenamiento. En cambio, las muestras de 30ºC y 45ºC presentaron un descenso gradual, desde el inicio hasta el final de la conservación. La pérdida del color de las muestras con hemoglobina a lo largo del tiempo de almacenamiento, se incrementó con el aumento de la temperatura, y dicho efecto fue el mismo a 30ºC y 45ºC. Además, el agregado de EDTA no afectó significativamente el color de las muestras con agregado de hemoglobina a los 50 días de almacenamiento.

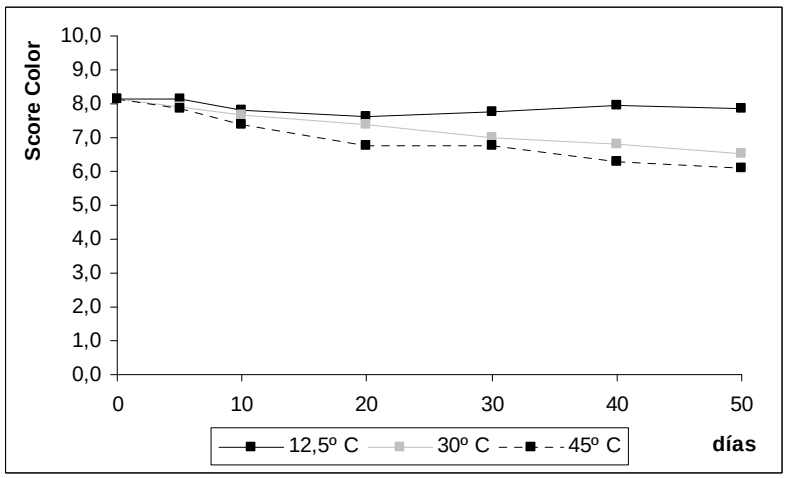


Figura 3. Evolución del color en función del tiempo de la muestra MS+Hb+EDTA: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina + EDTA, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

Evaluación de la crocanticidad

En las **Figuras 4**, **5** y **6** se pueden observar los comportamientos de las muestras MS, MS+Hb Y MS+Hb+EDTA, respectivamente, a las 3 temperaturas de conservación.

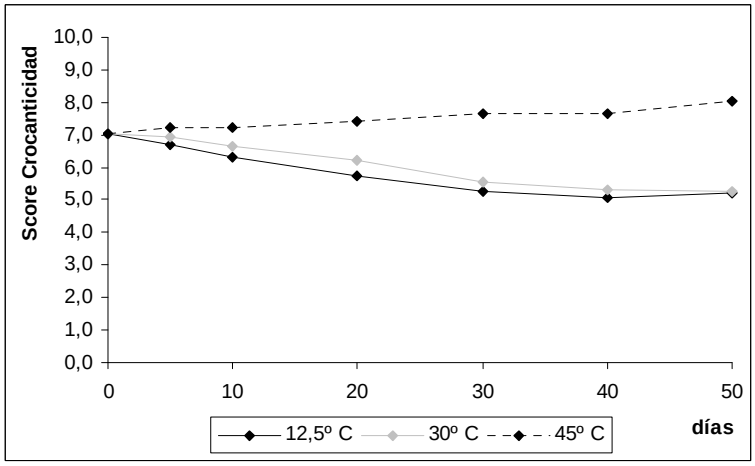


Figura 4. Evolución de la crocanticidad de las muestras MS: expandidos maíz: soja (88:12) en función del tiempo a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

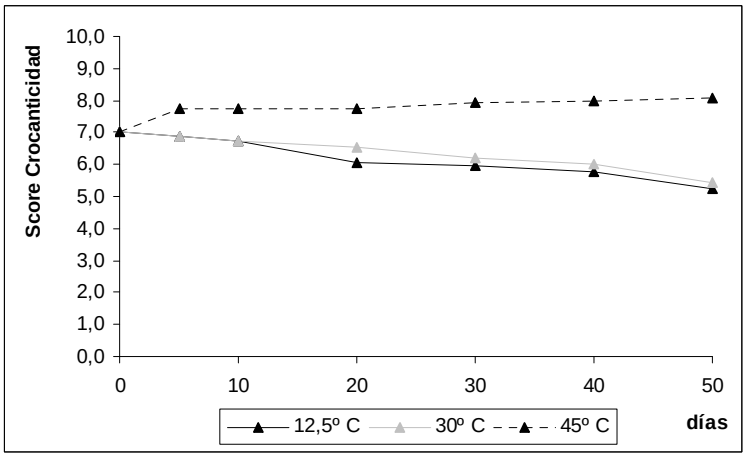


Figura5. Evolución de la crocanticidad en función del tiempo de la muestra MS+Hb: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

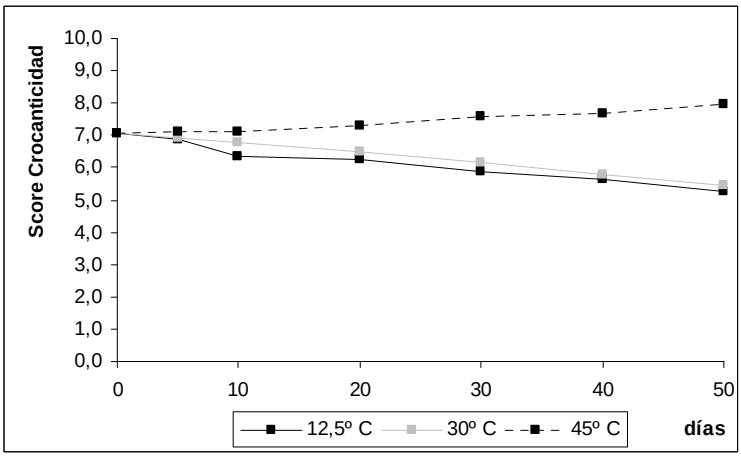


Figura 6. Evolución de la crocanticidad en función del tiempo de la muestra MS+Hb+EDTA: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina + EDTA, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

Las muestras MS almacenadas a 12,5ºC y 30ºC presentaron un comportamiento similar, disminuyendo gradualmente la intensidad de la crocanticidad hasta el final de la conservación y ambas no presentaron diferencias significativas a los 50 días. El valor de crocanticiadad al final del período se encontró dentro del límite aceptable. En cambio, la muestra almacenada a 45ºC tuvo un comportamiento totalmente diferente. Presentó un incremento de la crocanticidad hasta el final de la conservación que fue estadísticamente diferente a partir los 10 días ($p<0,0019$) respecto a las otras muestras conservadas a 12,5ºC y 30ºC.

De la misma manera, los expandidos MS+Hb tuvieron un comportamiento similar a MS. Las muestras conservadas a 12,5ºC y 30ºC presentaron una evolución de la crocanticidad muy parecida. Ambas disminuyeron la intensidad de dicho atributo en el período de conservación, siendo al final del almacenamiento todavía aceptable por parte de los panelistas, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($p>0,3397$).

En cambio, la muestra almacenada a 45ºC presentó un aumento gradual de la intensidad de la crocanticidad durante la conservación. A partir de los 5 días, esta muestra fue diferente respecto a las otras dos muestras ($p<0,0170$) y la diferencia se mantuvo hasta el final del almacenamiento.

Por último, los expandidos MS+Hb+EDTA siguieron el mismo patrón de comportamiento que las muestras MS+Hb. Las MS+Hb+EDTA a 12,5ºC y 30ºC tuvieron una disminución de la crocanticidad pero no superaron el límite no aceptable. Estas mezclas fueron estadísticamente iguales terminado el período de conservación ($p>0,5378$). En cambio, la muestra conservada a 45ºC tuvo un aumento constante de la intensidad de la crocanticidad a lo largo de los 50 días.

El ANOVA indicó que el agregado de EDTA no produjo diferencias significativas en la crocanticidad entre las muestras con o sin agregado del promotor ($p>0,8169$).

La pérdida o el aumento de la crocanticidad se podrían explicar por el pasaje de humedad entre las muestras y el ambiente hasta alcanzar el equilibrio.

Evaluación de la rancidez

El comportamiento de la rancidez para la mezcla maíz: soja durante el período de almacenamiento a las 3 temperaturas se observa en la **Figura 7**. En ella se observa que la muestra a 12,5ºC no desarrolló sabor rancio durante el período de conservación, ya que mantuvo valores menores a 1 desde el comienzo hasta el final. El expandido a 30ºC mantuvo un comportamiento semejante a la de 12,5ºC. También se podría concluir que esta muestra no desarrolló rancidez durante su conservación.

En cambio, la muestra almacenada a 45ºC presentó un aumento gradual de rancidez hasta los 30 días y a partir de allí, comenzó un incremento brusco hasta el final del almacenamiento.

El ANOVA indicó que el efecto de la temperatura fue el mismo para 12,5ºC y 30ºC y distinto para 45ºC a partir de los 20 días de conservación ($p<0,0011$).

Cabe destacar que a los 30 días, el desarrollo de rancidez superó el umbral promedio de detección del panel de 2 y se podría considerar que el expandido ya no fue aceptable sensorialmente.

Por otro lado, en la **Figura 8**, se puede observar la evolución de la rancidez de las muestras MS+Hb durante el almacenamiento. La muestra conservada a 12,5ºC no presentó desarrollo de rancidez en el

transcurso del almacenamiento, ya que dichos valores se mantuvieron prácticamente constantes y menores a 1.

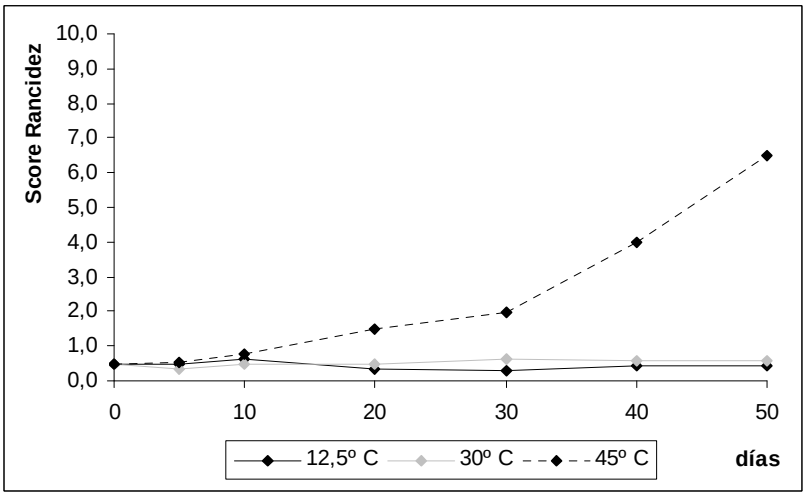


Figura 7. Evolución de la rancidez de las muestras MS: expandidos maíz: soja (88:12) en función del tiempo a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

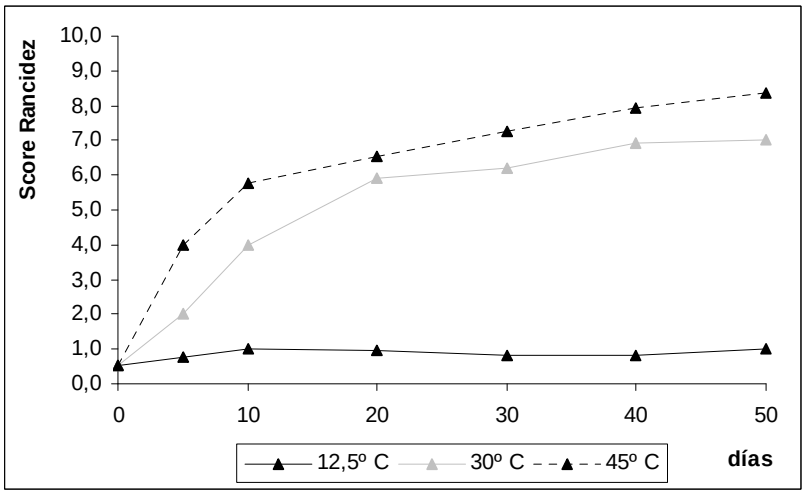


Figura 8. Evolución de la rancidez en función del tiempo de la muestra MS+Hb: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

La muestra conservada a 30ºC, ya a los 5 días tuvo un brusco incremento de rancidez que se extendió hasta los 20 días y luego aumentó levemente hacia el final del período de conservación. De forma similar, el expandido a 45ºC también desarrolló sabor rancio pero su intensidad fue mayor respecto al de 30ºC.

Por lo tanto, se podría concluir que la temperatura aceleró el desarrollo de rancidez, ya que las muestras conservadas a 30ºC y 45ºC a los 10 días ya presentaron una intensidad de sabor rancio igual o superior a 2 y por lo tanto, ya no serían aceptables sensorialmente, siendo el efecto mayor a 45ºC. El ANOVA mostró que la temperatura produjo efectos estadísticamente distintos sobre la rancidez ($p<0,0000$) a partir de los 5 días de almacenamiento, siendo mayor el desarrollo a los 45ºC.

Y por último, el comportamiento de la rancidez para las muestras MS+Hb+EDTA se puede observar en la **Figura 9**. Estos expandidos tuvieron una evolución similar a las mezclas MS+Hb. La muestra conservada a 12,5ºC no presentó desarrollo de rancidez en el período de almacenamiento, ya que el valor inicial prácticamente se mantuvo constante y menor a 1 durante los 50 días.

En cambio, la muestra conservada a 30ºC tuvo un rápido incremento hasta los 20 días y a partir de allí, un aumento leve hasta el final. El ANOVA indicó que ya a los 5 días de almacenamiento las 3 muestras fueron estadísticamente diferentes ($p<0,0001$). A los 10 días se alcanzó el valor del umbral

de percepción del panel, a diferencia de la muestra MS+Hb que lo alcanzó a los 5 días de almacenamiento. El expandido conservado a 45ºC mantuvo una evolución parecida al almacenado a 30ºC, pero la intensidad del sabor rancio fue mayor una vez finalizado el período de almacenamiento estudiado ($p<0,0000$).

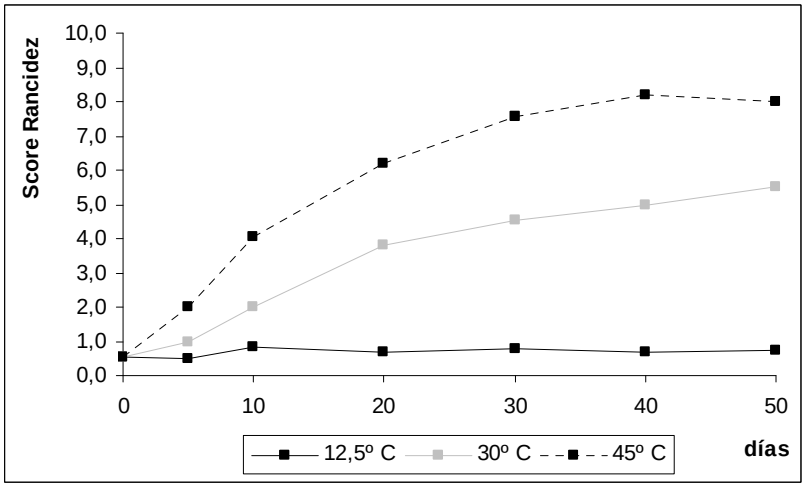


Figura 9. Evolución de la rancidez en función del tiempo de la muestra MS+Hb+EDTA: expandidos maíz: soja + 0,5 % de hemoglobina + EDTA, a las 3 temperaturas de conservación (12,5ºC, 30ºC y 45ºC).

Comparando los expandidos MS+Hb con MS+Hb+EDTA conservados a 45ºC, éste último ya a los 5 días alcanzó el umbral promedio de percepción, en cambio la MS+Hb lo hizo con anterioridad. El ANOVA a los 5 días, indicó que existieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras sin y con agregado de EDTA ($p<0,0132$) pero a partir de los 10 días y hasta el final de la conservación, estos expandidos no fueron estadísticamente diferentes ($p>0,0567$ y $p>0,5410$ respectivamente), es decir, que el agregado de EDTA no produjo efectos sobre el desarrollo de rancidez.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que los expandidos fortificados con hemoglobina y conservados a 12,5ºC, prácticamente no sufrieron deterioro en sus características sensoriales durante su almacenamiento. En estas muestras la pérdida del color y el desarrollo de sabor rancio no fueron significativos. En cuanto a la crocanticidad, a pesar de que hubo una pérdida en dicho atributo, el mismo se encontró en el rango de aceptabilidad. Otro aspecto importante a destacar, es que el EDTA no produjo ningún efecto significativo en las características evaluadas. Por lo tanto, estos productos pueden ser conservados a una temperatura de 12,5ºC y en ambientes cuya humedad relativa no difiera demasiado con la correspondiente a la de equilibrio con el producto, sin que sus atributos sensoriales, más importantes para su aceptabilidad, se deterioren en un período menor a 50 días de almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

-Mg Roberto Torres e Ing. Mario De Greff del Grupo de Extrusión del Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) – Facultad de ingeniería Química (UNL) por su colaboración en la elaboración de los expandidos.
-Panel de evaluación sensorial del Instituto de Tecnología de los Alimentos (ITA) – Facultad de ingeniería Química (UNL).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Boccio J, Concepción Páez M, Zubillaga, M *et al*. 2004. Causas y consecuencias de la deficiencia de hierro sobre la salud humana. ALAN, 54(2): 165-173.

Drago SR, González RJ, Chel-Guerrero L *et al*. 2007. Evaluación de la Disponibilidad de Minerales en Harinas de Frijol y en Mezclas de Maíz/Frijol Extrudidas. Inf. Tecnol, 18(1): 41-46.

FAO 1993. El maíz en la nutrición humana. Depósito de documentos de la FAO. www.fao.org. [Consulta: 20 de Junio 2007].

FAO 2000. Problemas de alimentación y nutrición: Mejorando la nutrición a través de huertas y granjas familiares. Manual de capacitación para trabajadores en campo de América Latina y el Caribe. Depósito de documentos de la FAO. www.fao.org. [Consulta: 27 de Junio 2007].

Lynch SR. 1997. Interaction of iron with other nutrients. Nutrition Reviews. 55(4): 102 – 109.

Pérez A, González R, Drago SR, Carrara C, De Greef DM, Torres RL. 2008. Extrusion cooking of a maize-soybean mixture: Factors affecting expanded product characteristics and flour dispersion viscosity. Journal of Food Engineering, 87: 333–340.

Wolfgor R, Rodríguez V, Pellegrino N, Valencia M. 1996. Evaluación de cereales fortificados como aportadores de hierro. Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición. 7(2): 33 – 37.

Adsorption kinetics and film rheology of hydroxypropylmetylcellulose at the air-water and oil-water interfaces.

Cinética de adsorción y reología de los films de hidroxipropilmetilcelulosa en la interface aire-agua y aceite-agua.

Camino N A(1), Pérez O E(1), Carrera Sanchez C(2), Rodriguez Patino J M(2) and Pilosof AMR (1)

(1) CONICET / Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria, Intendente Guiraldes s/n (1428), Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
(2) Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, c/ Prof. García González, Universidad de Sevilla, 41012 - Seville, Spain.
nacamino@di.fcen.uba.ar

ABSTRACT

The adsorption of macromolecules at interfaces is of great interest for various industrial applications. The possibility of controlling the properties of colloidal dispersions by the use of adsorbing biopolymers requires detailed knowledge of the biopolymer structure and adsorption characteristics.
The objective of the present work was to determine the kinetics of adsorption and the film rheology of two hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), called E4M and E50LV, at the air- water (A/W) and oil-water (O/W) interfaces for 10^{-2} % wt and 1% wt bulk concentration.
The adsorption of HPMC showed a behaviour similar to that described for proteins: (i) the diffusion from the bulk onto the interface, (ii) adsorption (penetration) and interfacial unfolding and (iii) aggregation (rearrangement) within the interfacial layer, multilayer formation and even interfacial gelation.
At the A/W interface the two HPMCs exhibited different behaviour than at the O/W interface. The adsorption rate (K_{ads}) of HPMCs at the O/W interface increased with bulk concentration whereas K_{ads} at the A/W interface decreased with bulk concentration. The effect of air phase on the structure adopted by the polysaccharide at the interface was different.
The penetration, unfolding and rearrangement of these polysaccharides at both interfaces control the rate of adsorption. The rate of rearrangement at the A/W interface resulted slightly lower than at the O/W interface. A greater unfolding of the HPMCs would occur at the O/W interface due to solvation by the oil of the hydrophobic side chain. At O/W interface both HPMCs films increased the solid character (Ed) with time but slower than at the A/W interface. However, the final Ed values were similar.
For systems containing $1\cdot 10^{-2}$% wt bulk concentration, a more viscoelastic character was observed for the films formed at the A/W interface. At 1% wt bulk concentration, both HPMCs showed more viscoelastic behaviour than at $1\cdot 10^{-2}$% wt bulk concentration at both interfaces.
The knowledge of surface behaviour of HPMCs at the A/W and O/W interface, can be useful when studying emulsion and foam formation and stability.

RESUMEN

La adsorción de macromoléculas en interfases presenta gran interés para varias aplicaciones industriales. La adsorción de biopolímeros permite controlar las propiedades de dispersiones coloidales pero se requiere un conocimiento detallado de la estructura y características de adsorción del biopolímero utilizado.
El objetivo del presente trabajo consistió en determinar la cinética de adsorción y la reología de las capas interfaciales de dos hidroxipropilmetilcelulosas (HPMC), denominadas E4M y E50LV, en la interface aire-agua (A/W) y aceite- agua (O/W) para dos concentraciones en el seno de la solución, 10^{-2} % p/p y 1%p/p.
La adsorción de HPMC mostró un comportamiento similar al descripto para proteínas: (i) difusión desde el seno hacia la interfase, (ii) adsorción (penetración) y desplegamento interfacial y (iii)

agregación (reacomodamiento) en la capa interfacial, formación de multicapas y eventualmente gelificacion interfacial.
En la interface A/W las dos HPMC presentaron un comportamiento diferente que el correspondiente a la interface O/W. La velocidad de adsorción (K_{ads})de las HPMCs en la interface O/W aumento con el incremento en la concentración del seno de la solución, mientras que en la interface A/W la K_{ads} disminuyo con el aumento de la concentración. Luego, el efecto que produce la fase aire o aceite en la estructura adoptada por el polisacárido es distinta en cada caso.
La penetración, desplegamiento y reacomodamiento de estos polisacáridos en ambas interfaces controla la velocidad de adsorción. La velocidad de reacomodamiento en la interface A/W resultó levemente menor que en la interface O/W. Un mayor desplegamiento de estas HPMCs es esperado en la interface O/W debido al efecto de solvatación que ofrecen los triglicéridos para las cadenas hidrofobicas del polisacárido.
En la interface O/W las capas de ambas HPMCs incrementaron su carácter solido (Ed) con el tiempo pero en menor medida en la interface A/W. sin embargo, los valores finales de Ed fueron similares.
Para los sistemas de concentración $1\cdot 10^{-2}$% p/p, las capas formadas en la interface A/W presentaron un cracter mas viscoelastico. Para 1% p/p y ambas interfaces, ambas capas de HPMCs resultaron mas viscoelásticas que las capas formadas a $1\cdot 10^{-2}$% p/p.
El conocimiento del comportamiento interfacial de las HPMCs en la interface A/W y O/W, resultan de gran utilidad para el estudio de la formación y estabilidad de emulsiones y espumas alimentarias.

KEYWORDS: *hydroxypropylmethylcellulose, adsorption, air-water interface, oil-water interface.*

PALABRAS CLAVE: *hidroxipropilmetilcelulosa, adsorción, interfase aire-agua, interface aceite-agua.*

INTRODUCTION

The composition and structure of adsorbed layer surrounding oil droplets in emulsions and air bubbles in foams are fundamental to the stability and behaviour of dispersed systems during their processing.
The adsorption of macromolecules at the A/W and O/W interface is different from the adsorption of low molecular weight surfactants. The formation of stabilizing interfacial layers requires, firstly, the diffusion of the polymer from the bulk to the interface and, secondly, its adsorption at the interface (Wollenweber et al 2000). Macromolecules adsorbed at the interface appear as train, loops and tails. (Perez et al 2008, Nahringbauer 1995,Graham and Philips 1979) which influence the surface properties of a macromolecule. A change in the conformation of the adsorbed macromolecule can cause a drastic effect both on the fraction of segments directly in contact with the surface (i.e., on the surface tension) and on the thickness of the adsorbed macromolecules layer (Nahringbauer 1995). As an example, it could be mentioned that the properties of the interfacial layers, especially the ratio of train/loop and tail segments, and the elasticity of the layer, determine the emulsion stability, particularly the coalesce stability of the oil droplet (Wollenweber et al 2000).
Williams and Prins (1996) compared the dilatational behaviour of two milk protein, β-lactoglobulin and β-casein, at both interfaces and they established a surprising similarity between the two types of interfaces for both proteins. This suggested that the interfacial structures of the molecules at the O/W and A/W interfaces can be similar. Wüstneck et al (1999) studying β- lactoglobulin adsorption layers at the A/W and O/W interfaces (sunflower or tetradecane oil) found that the concentration required for interfacial saturation was minimal at the interface with sunflower oil. Interfacial dilatational elasticity and interfacial viscosity were largest at the air interface and smallest at the sunflower interface. The similarities and differences of the systems investigated were attributed to the adsorption behaviour and the solvatation of different apolar and polar parts of the protein molecules in the neighbouring phase.
More recently, Rotureau et al (2004) studied the adsorption of a polysaccharide, an amphiphilic derivative of dextran, at the A/W and O/W interfaces. They concluded that the kinetics of polymer adsorption at the dodecane-water interface is similar to that at the air-water interface.
An interesting group of tensioactive polysaccharides are the cellulose derivatives which have a strong tendency to accumulate at the air-water and the oil-water interface (Nahringbauer 1995). Although, only four of them are used in the food area for their surface activity: methylcellulose (MC),

carboxymethylcellulose (CMC), hydroxypropylcellulose (HPC) and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). Even, methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose appear to be more surface- active than milk proteins (Mezdour et al 2007, Arboleya and Wilde 200, Perez et al 2007).
The surface characteristic of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) have been widely studied (Nahringbauer 1995, Avranas and Tasopoulos 2000, Arboleya and Wilde 2005, Perez et al 2008), but much less investigations have been focused on the behavior of HPMC at the oil- water interface. Morover, only a few papers focus on the comparison of the adsorption properties of particular compounds at the A/W and O/W interfaces (Williams and Prins 1996, Wüstneck et al 1999).
Thus, the objective of this research was to study the equilibrium and dynamic surface characteristics of HPMCs at the O/W interface and compare them with the behaviour at the A/W interface. This work is part of an integral study undertaken to characterize the behaviour of HPMC at the O/W and A/W interfaces.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Methocell E50LV and E4M (food grade) from the Dow Chemical Company were kindly supplied by Colorcon Argentina and used without purification. **Table 1** shows some characteristic properties, such as methyl and hydroxypropyl content, methyl/hydroxypropyl ratio, molar substitution, the degree of substitution, the viscosity (20ºC) of 2 %wt solutions, and molecular weight. The moisture content of HPMC powders was 1.6 %.

Table 1. Properties of E4M and E50LV.

HPMC	E4M	E50LV
% methyl	28.0	29.1
% hydroxypropyl	10.2	9.2
Methyl/ hydroxypropyl ratio	2.3	3.2
Methyl substitution (DS)	1.90	1.90
Hydroxypropyl substitution (MS)	0.23	0.23
Total substitution (DS + MS)	2.13	2.13
Viscosity (cp), 2% wt solution, 20°C	4965	41
Molecular weight	90000	18000

HPMC solutions at 10^{-2} and 1 %wt, were prepared at 90ºC by dispersing the powder in a commercial buffer solution called Trizma $(CH_2OH)_3CNH_2$/$(CH_2OH)_3CNH_3Cl$ (Sigma, >99.5%), and cooled down to room temperature. Milli –Q ultrapure water was used for buffer preparation. The pH and ionic strength (I) were kept constant at 7 and at 0.05M respectively. The solutions were stored at 4ºC for 24 hours to achieve the maximum polysaccharide hydration.
The materials in contact with the solutions were properly cleaned in order to avoid any contamination by any surface-active substance. The absence of surface-active contaminants in the aqueous buffered solutions was checked by surface tension measurements before sample preparation. No aqueous solutions with a surface tension other than that accepted in the literature (72–73 mN/m at 20ºC) were used.
Commercial sunflower oil was used as the oil phase in this research.
In order to check differences in the interfacial behaviour of HPMCs that could be attributed to the heterogeneous composition of commercial oil, some adsorption measurements were performed using purified oil (Florisil 60-100 mesh Aldrich®) Sunflower oil contains triglycerides and both, saturated and unsaturated fatty acid. The alkyl chain lengths of these fatty acids vary between 14 and 22. Therefore, from surface science point of view, sunflower oil is a complex mixture (Wüstneck et al 1999).

Kinetic parameters

Time-dependent surface pressure and surface viscoelastic parameters of adsorbed HPMC films at the A/W and O/W interface were determined by an automatic drop tensiometer (IT Concept, France) as described elsewhere (Rodríguez Niño and Rodríguez Patino 2002).

From the adsorption dynamics measurements, the adsorption kinetics parameters can be obtained. The main features of the kinetics of adsorption of HPMC include (i) the diffusion of the protein from the bulk onto the interface, (ii) adsorption (penetration) and interfacial unfolding, and (iii) aggregation (rearrangement) within the interfacial layer, multilayer formation and even interfacial gelation (MacRitchie 1990, Perez et al 2006, Perez et al 2008, Wollenweber et al 2000, Nahringbauer 1995).
During the first step, at relatively low surface pressures when diffusion is the rate-determining step, a modified form of the Ward and Tordai equation can be used to correlate the change in surface pressure with time (Ward and Tordai 1946):

$$\pi = 2C_0 KT(D_{diff}\theta / 3.14)^{1/2} \qquad (1)$$

where C_o is the concentration in the aqueous phase, K the Boltzmann constant, T the absolute temperature, D_{diff} the diffusion coefficient, and θ the adsorption time. If the diffusion at the interface controls the adsorption process, a plot of π against $\theta^{1/2}$ will then be linear (MacRitchie 1990, de Feijter and Benjamins 1987, Xu and Damodaran 1994, Pérez et al 2008) and the slope of this plot will be the diffusion rate (k_{diff}).
To analyze the rate of adsorption (penetration) and rearrangement of adsorbed biopolymer the following semiempirical first-order equation, proposed by Graham and Phillips (1979), has been used:

$$\ln\left(\frac{\pi_{180} - \pi_\theta}{\pi_{180} - \pi_0}\right) = -k_i \cdot \theta \qquad (2)$$

where π_{180}, π_0, and π_θ are the surface pressures at 180 min of adsorption time, at time $\theta = 0$, and at any time, θ, respectively, and k_i is the first-order rate constant.

Surface dilatational properties

The surface viscoelastic parameters (surface dilatational modulus, E, and its elastic, E_d, and viscous, E_v, components, were measured as a function of time, θ, at 15 % deformation amplitude (ΔA/A) and 100 mHz of angular frequency (ω). Previously, the percentage area change had been determined to be in the linear region (data not shown). The method involved a periodic automated-controlled, sinusoidal interfacial compression and expansion performed by decreasing and increasing the drop volume, at the desired amplitude. The surface dilatational modulus derived from the change in surface tension (dilatational stress), σ(equation 3), resulting from a small change in surface area (dilatational strain), A (equation 4), may be described by equation 5 (Lucassen and van den Temple 1972)

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega\theta + \delta) \qquad (3)$$

$$A = A_0 \sin(\omega\theta) \qquad (4)$$

$$E = \frac{d\sigma}{dA/A} = -\frac{d\pi}{d\ln A} \qquad (5)$$

where σ_0 and A_0 are the stress and strain amplitudes, respectively, and δ is the phase angle between stress and strain.
The dilatational modulus is a complex quantity, which is composed of real and imaginary parts:

$$E = (\sigma_0 / A_0)(\cos\delta + i\sin\delta) = E_d + iE_v \qquad (6)$$

The real part of the dilatational modulus or storage component is the dilatational elasticity, $E_d = |E|\cos\delta$. The imaginary part of the dilatational modulus or loss component is the surface

dilatational viscosity $E_v = |E| sen\delta$. The ratio (σ_0 / A_0) is the absolute modulus, $|E|$, a measure of the total unit material dilatational resistance to deformation (elastic + viscous). For a perfectly elastic material, the stress and strain are in phase (δ= 0) and the imaginary term is zero. In the case of a perfectly viscous material δ = 90º and the real part is zero. The loss angle tangent can be defined by equation 7. Thus, if the film is purely elastic, the loss angle tangent is zero.

$$\tan\delta = E_v / E_d \qquad (7)$$

The experiments in the automatic drop tensiometer, were carried out at 20ºC and the temperature of the system was maintained constant within ± 0.1ºC by circulating water from a thermostat. The final concentrations of HPMC in the sub-phase were $1 \cdot 10^{-2}$ % and 1 % wt. The solutions were placed in the syringe and then in the compartment and were allowed to stand for 30 min to reach the desired constant temperature. Then a drop of HPMC solution was delivered to achieve macromolecule adsorption at the A/W or O/W interface. For the O/W interface measurements, the cell was filled with the oil while the syringe break the aqueous HPMCs solutions free into it.
The materials in contact with HPMC solutions were properly cleaned in order to avoid any contamination by any surface-active substance.

RESULTS AND DISCUSSION

Adsorption kinetic of HPMCs at the A/W and O/W interface

To establish the contribution of the oil surface active compounds influencing during HPMCs adsorption at the oil- water interface, measurements with purified sunflower oil were done firstly. As an example, the behaviour of E5LV at 1% wt bulk concentration is shown in **Figure 1**. At times higher than 2000 seconds, no appreciable differences in surface pressure were obtained between purified and not purified oil. However, surface active oil impurities effects cannot be excluded at short times of adsorption (<2000 s), provoking small differences in π values, although they were considered not important for the objective set in the present work. Murray (1997) also claimed that the oil impurities present, do not generated substantial differences when studying the adsorption of BSA at the oil-water interface. Therefore no special precautions were taken to remove these impurities.

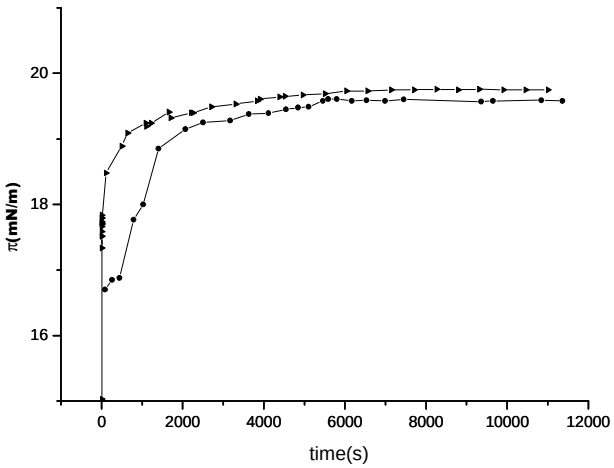


Figure 1. Time-dependent surface pressure for E5LV 1%wt bulk concentration at the oil-water interface with non-purified (►) or purified sunflower oil (●). Temperature 20 ºC, pH 7.0 and I = 0.05M.

As the rate of surface pressure change depends primarily on the rate of adsorption, Ward and Tordai equation (equation 1) was used to describe these changes upon time. If the diffusion of the HPMCs at the A/W and O/W interfaces controls the adsorption process, a plot of $\pi - t^{1/2}$ will then be linear (de Feijter and Benjamins 1987, MacRitchie 1990, Xu and Damodaran 1994) and the slope of this plot will be the diffusion rate constant.

It was found that the diffusion step for these polysaccharides was too fast (π > 10 mN/m), to be detected by the experimental technique used in this work, as deduced from the π-time$^{1/2}$ plots (data not shown). All the bulk concentrations studied showed this tendency.

After an initial diffusion of HPMCs at both interfaces, the rate of HPMCs adsorption is controlled by the penetration and rearrangements of the macromolecules at the interfaces (Rodriguez Niño and Rodriguez Patino 2002, Perez et al 2008). Malmsten and Lindman (1990) working with EHEC found that the adsorbed amount increases immediately after addition of the polymer solution, after which it levels off indicating the interface saturation.

In practice, a plot of equation 2 usually yields two or more linear regions. The initial slope is taken as a first-order rate constant of penetration (unfolding /adsorption), $K_{ads,}$ and the second slope is taken as a first-order rate constant of rearrangement, K_r, occurring among a more or less constant number of adsorbed molecules. Because the interfacial concentration of adsorbed macromolecules is several times higher than that in the bulk phase, the molecular unfolding and rearrangement steps are magnified processes happening at interface, especially for high-molecular-weight macromolecules (Perez et al 2008). **Figure 2** shows the fit of experimental data to this first-order kinetic equation for E4M and E50LV 1%wt at the A/W and O/W interface. The main difference observed between the two interfaces is the appearance of a break in the linear plot at shorter times for the O/W interface. In comparison, at the A/W interface the rearrangement step seems to start after 10000 s, when a high surface pressure is reached for E4M, but for E50LV the rearrangement step was not apparent within the period of the experiment (12000 s). Baeza et al (2004) obtained the same results when studying propylenglycol alginates (PGA) adsorption at the A/W interface: only one first- order rate constant was obtained, related to the polysaccharide penetration at the interface. **Table 2** summarizes the time at which the rearrangement step starts (or time at which ends the adsorption/penetration step) as well as the first-order rate constant of penetration (unfolding /adsorption), K_{ads} . The occurrence of rearrangement of HPMC at lower surface pressures and adsorption times at the O/W interface could be ascribed to a steric constrain due to the presence of triglycerides molecules forming the oil phase. Similarly, the rate constants of adsorption were lower in the presence of the oil phase.

Concerning to the bulk concentration effect, K_{ads} at the O/W interface slightly increased with bulk concentration (**Table 2**). Rodríguez Niño et al (2005) found for milk and soy proteins adsorbed at the O/W interface that the adsorption and penetration is facilitated at higher concentrations. Rodriguez Patino et al (1999) achieved the same trends working with whey protein isolate. However, K_{ads} decreased or resulted equal when HPMC concentration increased at the A/W interface (**Table 2**).

Table 2. Kinetic parameters for E4M and E50LV adsorption at the A/W and O/W interfaces at 20ºC,pH 7 and I = 0.05 M.

HPMC (wt %)	K_{ads} .10^{4} *(s^{-1})(LR)		$t_{end\ ads}$ (s)	
	A/W •	O/W	A/W •	O/W
E4M 10^{-2}	2.90±0.10 (0.98)	1.62 ±0.11(0.97)	10000	7500
E4M 1	2.00±0.05 (0.99)	2.01±0.06(0.99)	9300	8000
E50LV 10^{-2}	2.20±0.06(0.77)	1.09±0.09(0.96)	11000	7000
E50LV 1	2.20±0.05(0.93)	1.25±0.08 (0.97)	>10000	7500

•Perez et al, (2008).
* mean ± SD of at least n = 2.
K_{ads} : Rate constant of penetration/adsorption /unfolding.
(LR): Linear regression coefficient.

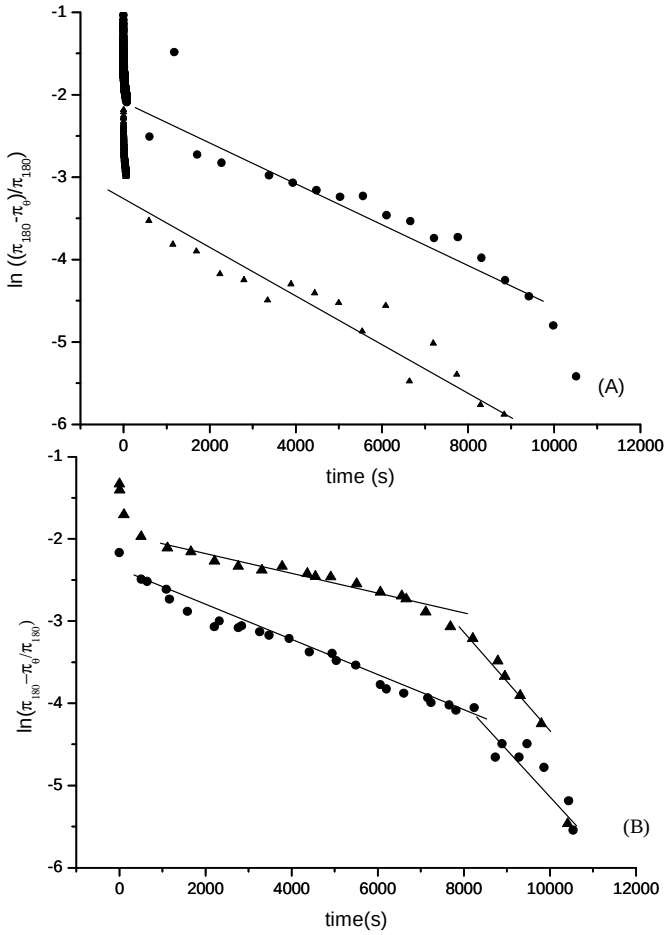


Figure 2. Surface pressure evolution upon adsorption time according to the rate of adsorption and rearrengement at the air-water interface (A) and at the oil-water interface (B) for E4M (●) and E50LV (▲) 1% wt bulk concentration. Temperature 20 ºC, pH 7.0 and I = 0.05M.

Viscoelastic characteristics of HPMCs at the air-water and oil-water interface

Figure 3 shows the time-dependent evolution of surface rheological parameters, such as dilatational elasticity (E_d) and loss angle tangent (tan δ) for E4M and E50LV adsorbed films at the A/W and O/W interface. Concerning to the contribution of the oil surface active compounds, no appreciable differences in the surface rheological parameters of interfacial films were observed when using purified sunflower oil (data not shown).

At the O/W interface both HPMCs presented a continuous increase in Ed value with adsorption time indicating a slow and a more gradual evolution of interfacial structure as compared to the A/W interface (**Figure 3A** and **C**). The slow film structure evolution is also revealed by the evolution of the relative viscoelasticity of films (tan δ) in **Figure 3 B** and **D**, mainly for E50LV.

E_d values at $1 \cdot 10^{-2}$ %wt HPMC (**Figure 3A**) were higher at the A/W interface over all the adsorption time, mainly for E4M. E4M showed the stronger elastic character, with a maximum value of 21 mN/m, which was attained almost immediately, reflecting the rapid adsorption and structuration of E4M at the A/W interface. The closer packing of macromolecules is the consequence of the existence of associations within the adsorbed molecules, as reflected by the significant increment in E_d (Rodriguez Patino et al 1999). E_d were smallest at the O/W interface, as was claimed previously by Wüstneck et al (1999) and Benjamins et al (1996). The conditions to form an interfacial structure of high mechanical stability are best when conformation changes are not restricted, i.e. at the interface with air. The hydrophobic intramolecular interactions between HPMC molecules necessary to form an elastic film would be restricted by solvation of the hydrophobic groups in the oil phase. Williams and Prins (1996), also obtained lower elastic modulus at the oil interface than at the A/W interface when comparing the behaviour of β- lactoglobulin and β-casein.

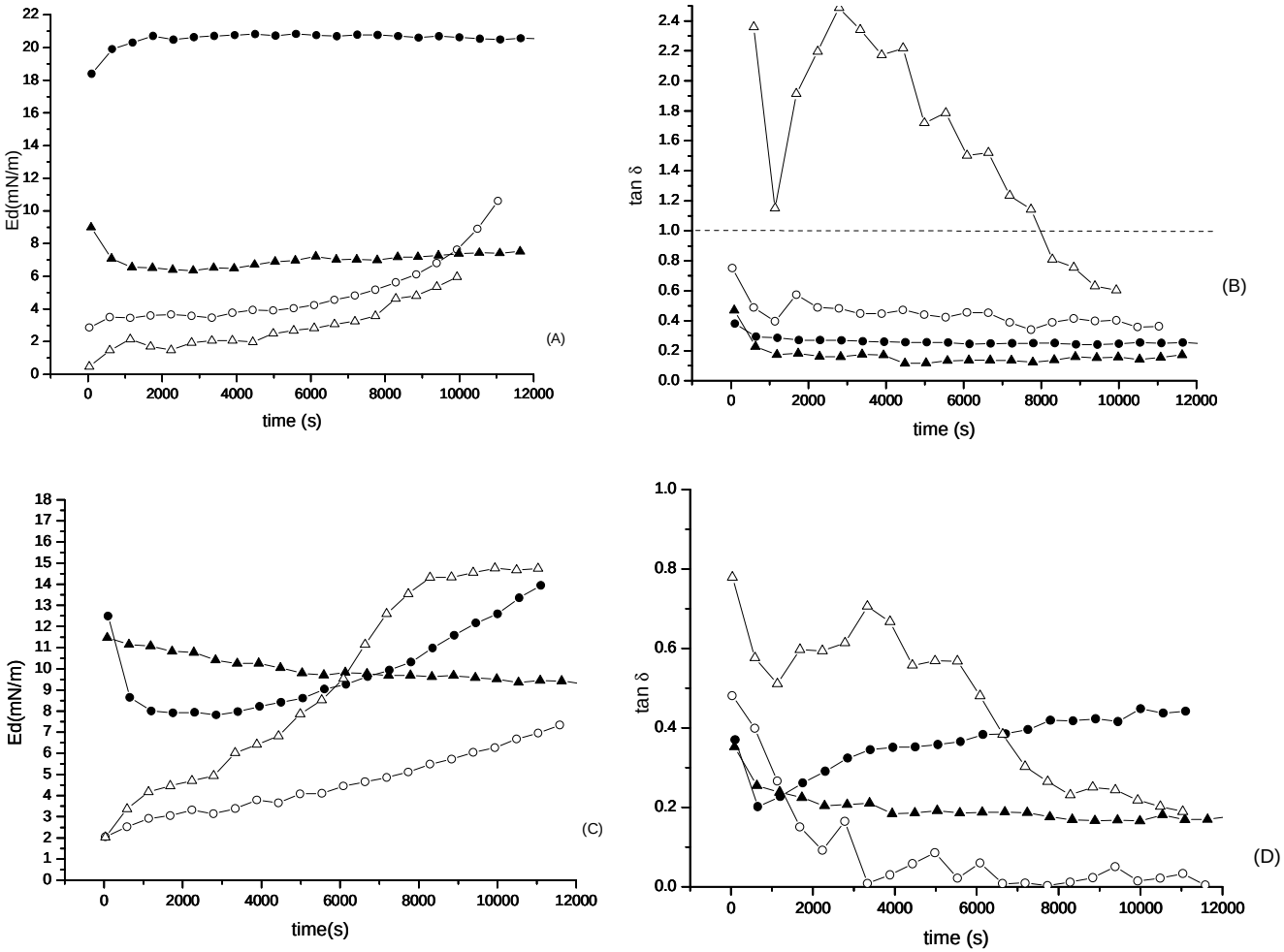


Figure 3. Time-dependent surface dilatational elasticity, E_d, and time-dependent phase angle tangent, tan δ, for E4M (●,○) and E50LV (▲,Δ) adsorbed films at the air-water (full symbols) and oil-water interfaces (empty symbols) for $1 \cdot 10^{-2}$% wt (A and B) and 1%wt (C and D) HPMC bulk concentration. Temperature 20 ºC, pH 7.0 and I = 0.05M

Time dependence of relative viscoelasticity (tan δ for HPMCs films shown in **Figure 3 B** for $1 \cdot 10^{-2}$% wt HPMCs bulk concentration indicate that more viscoelastic films (lower tan δ) are formed at the A/W interface. The almost constant tan δ indicated that E_d and E_v changed in the same magnitude upon time. Tan δ values well below 1, reached upon adsorption, indicated that the films had a gel-like structure, which involved the association of the hydrophobic methyl groups of HPMC (Kita et al 1999), except for E50LV in the presence of the oil phase, where a viscoelastic film was formed only at long term adsorption (8000 s).

Figure 3C shows that at 1% wt bulk concentration, the solid character of films at the O/W interface increased slowly upon time as discussed previously. E4M formed more elastic films at the A/W interface as shown at the lowest concentration, however film viscoelasticity was lower at the A/W interface because of increasing values of the dilatational viscosity due to film collapse and multilayer formation (Perez et al 2008). The elastic character of E50LV films (1 % wt) in the presence of oil increased sharply after 6000 s of adsorption and reached values higher than those observed at the A/W interface (**Figure 3C**). Accordingly, the relative viscoelasticity of the film increased (lower tan δ), reaching the values observed in the presence of air (**Figure 3D**).

CONCLUSION

The interfacial behaviour of HPMC was greatly influenced by the nature of the hydrophobic phase. HPMCs showed a behaviour more similar to proteins (Wüstneck et al 1999) than to other surface active polysaccharide as dextran (Rotureau et al 2004) since only proteins displayed different

behaviour at the A/W and O/W interfaces. The differences in the solvation environmental surrounding the hydrophobic groups of HPMC would cause the observed differences.
the elastic character of films as well as the rate of adsorption/penetration were lower at the O/W interface. However at long term adsorption strong viscoelastic films are formed at lower surface pressures because of participation of triglycerides interacting with HPMC through hydrophobic residues.
Differences were also observed in the performance of each type of HPMC that can be related to molecular properties. In general differences in hydrophobicity and molecular weight (E4M versus E50LV) had more impact at the A/W than at the O/W interface.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CYTED through project 105PI0274. The authors also acknowledge the support from CYCYT through grant AGL2007-60045, Junta de Andalucía through grant PO6-AGR-01535, and Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

REFERENCES

Arboleya JC and Wilde PJ .2005. Competitive adsorption of proteins with methylcellulose and hydroxypropylmethylcellulose. Food Hydrocolloids, 19: 485- 491.

Avranas A and Tasopoulos V. 2002. Aqueous solutions of sodium deoxycholate and hydroxypropylmethylcellulose: Dynamic surface tension measurements. Journal of Colloid and Interface Science, 221: 223 – 229.

Baeza R, Carrera Sánchez C, Pilosof AMR and Rodriguez Patino JM. 2004. Interactions of polysaccharides with β- lactoglobulin spread monolayers at the air- water interface. Food Hydrocolloids, 18: 959 – 966.

de Feijter JA and Benjamins J. 1987. Adsorption kinetics of proteins at the air- water interface. In E. Dickinson (Ed.) Food emulsions and foams.New York: Marcel Dekker. (pp. 123- 153).

Graham DE and Philips MC. 1979. Proteins at liquid interfaces 3. Molecular structures of adsorbed films. Journal of Colloid and Interface Science, 70: 427- 433.

Kita R, Kaku T, Kubota K and Dobashi T. 1999. Pinning of phase separation of aqueous solution of hydroxypropylmethylcellulose by gelation. Physics Letters A, 259: 302 – 307.

Lucassen J and van den Temple M. 1972. Dynamic measurements of dilatational properties of a liquid interface. Chemical Engineering Science, 27: 1283- 1291.

MacRitchie F. 1990. Chemistry at interfaces. San Diego, CA: Academic Press.

Malmsten M and Lindman B. 1990. Ellipsometry studies of the adsorption of cellulose ethers. Langmuir, 6:357- 364.

Mezdour S, Cuvelier G, Cash MJ and Michon C. 2007. Surface rheological properties of hydroxypropylcellulose at the air- water interface. Food Hydrocolloids, 21: 776- 781.

Murray BS. 1997. Equilibrium and dynamic surface pressure-area measurements on protein films at air- water and oil- water interfaces. Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects,125: 73 – 83.

Nahringbauer I. 1995. Dynamic surface tension of aqueous polymer solutions, I: Ethyl(hydroxyethyl)cellulose (BERMOCOLL cst- 103). Journal of Colloid and Interface Science, 176: 318 – 328.

Perez OE, Carrera Sanchez C, Rodriguez Patino JM and Pilosof AMR. 2006. Thermodynamics and dynamics characteristics of hydroxypropylmethylcellulose adsorbed films at the air water interface. Biomacromolecules, 7: 388-393.

Perez OE, Carrera Sanchez C, Rodriguez Patino, J M and Pilosof AMR. 2007 Adsorption dynamics and surface activity at equilibrium of whey proteins and hydroxypropyl- methyl- cellulose mixtures at the air- water interface. Food Hydrocolloids, 21: 794- 803.

Perez OE, Carrera Sanchez C, Pilosof AMR and Rodriguez Patino JM. 2008. Dynamics of adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at the air- water interface. Food Hydrocolloids, 22: 387 – 402.

Rodríguez Niño MR and Rodríguez Patino JM. 2002. Effect of the aqueous phase composition on the adsorption of bovine serum albumin to the air- water interface. Industrial & Engineering Chemistry Research, 41: 1489 – 1495.

Rodríguez Niño MR, Carrera C, Pizonez V and Rodriguez Patino JM. 2005. Milk and soy protein films at the air- water interface. Food Hydrocolloids, 19: 417- 428.

Rodriguez Patino JM, Rodriguez Niño MR and Carrera Sanchez C. 1999. Adsorption of whey protein isolate at the oil- water interface as a function of processing conditions: A rheokinetic study. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 47: 2241- 2248.

Rotureau E, Leonard M, Dellacherie E and Durand A. 2004. Amphiphilic derivates of dextran: Adsorption at air/ water and oil/water interfaces. Journal of Colloid and Interface Science, 279: 68 – 77

Ward AFH and Tordai L. 1946. Time dependence of boundary tensions of solutions I. Journal of Chemical Physics, 14: 353- 361.

Williams A and Prins A. 1996. Comparison of the dilatational behaviour of adsorbed milk proteins at the air- water and oil- water interfaces. Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects, 114: 267 – 275.

Wollenweber C, Makievski A.V, Miller R and Daniels R. 2000. Adsorption of hydroxypropylmethylcellulose at liquid/ liquid interface and the effect on emulsion stability. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 172: 91-101.

Wüstneck R, Moser B and Muschiolik G. 1999. Interfacial dilatational behaviour of adsorbed β-lactoglobulin layers at the different fluid interfaces. Colloids and Surface B: Biointerfaces, 15: 263-273.

Xu S. and Damodaran S. 1994 . Kinetics of adsorption of protein at the air- water interface from a binary mixture, Lagmuir, 10: 472- 480.

Caracterización y funcionalidad de una fracción rica en fibra de semillas de chía (*Salvia hispanica* L.)

Characterization and functional properties of a fraction of chía (*Salvia hispanica* L.) seeds rich in fibres

Capitani M [1, 2], Nolasco SM [2], Tomás M[1]

[1]Universidad Nacional de La Plata – CONOCET. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. 47 y 116 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina.
[2]Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Avda del Valle 5737. B7400JWI. Olavarría. Buenos Aires. Argentina.
marianelacapitani411@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue obtener una fracción con alto contenido en fibra dietética a partir de la harina desgrasada de chía cultivada en Argentina y evaluar algunas de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Para ello, semillas de chía procedentes de la provincia de Salta (Argentina) fueron trituradas en un molino de cuchillas de laboratorio y posteriormente desgrasadas mediante un equipo Soxhlet, (*n*-hexano a reflujo, 8 h). La harina residual fue homogeneizada habiéndose obtenido la fracción fibrosa mediante su tamizado a través de una malla 100 A.S.T.M. y agitación durante 20 min. La fracción retenida por el tamiz se consideró rica en fibra (FRF). Los resultados obtenidos se expresan en base seca con excepción de la humedad. La FRF exhibió un contenido de humedad de 9,37 ± 0,03%, 32,84 ± 0,34% de fibra cruda, 6,65 ± 0,04% de cenizas y 0,21 ± 0,04% de grasa. Con respecto al contenido de fibra detergente neutra (FDN), el mismo fue de un 65%, constituida por un 28,2% de celulosa, 31,3% de hemicelulosa y un 5,5% de lignina. A su vez, la misma presentó un 35,5% de fibra detergente ácida (FDA). La FRF presentó un contenido de fibra dietética total (FDT) de 50,2%, compuesta en su mayoría por fibra dietética insoluble (FDI) 45,2%, y un 4,9% de fibra dietética soluble (FDS), con una alta capacidad de absorción (10,52 ± 0,43 g/g) y de retención de agua (9,16 ± 0,29 g/g) y una menor capacidad de retención de aceite (2,06 ± 0,03 g/g) y de adsorción de agua (0,51 ± 0,05 g/g). Su capacidad de absorción de moléculas orgánicas fue de 1,73 ± 0,05 g/g. Los valores correspondientes a las propiedades evaluadas, principalmente la capacidad de absorción y retención de agua y de aceite , convierten a esta fracción en un ingrediente importante para la elaboración de productos tales como postres, bebidas, gelatinas, panes, galletitas, entre otros alimentos.

ABSTRACT

The aim of this study was to obtain a fraction with high content of dietary fiber from defatted chia flour and evaluate some of their physicochemical and functional properties. Chia seeds from the province of Salta (Argentina) were crushed in a laboratory knife mill and then defatted using a Soxhlet equipment, (n-hexane at reflux, 8 h). The residual meal was homogenized and obtained through a 100 mesh A.S.T.M. and stirring for 20 min. The fraction retained by the sieve was considered rich in fiber (FRF). The results are expressed on a dry basis except moisture. The FRF exhibited a moisture content of 9.37 ± 0.03%, 32.84 ± 0.34% crude fiber, 6.65 ± 0.04% ash and 0.21 ± 0.04% fat. The neutral detergent fiber (NDF) content was 65%, consisting of 28.2% cellulose, 31.3% of hemicellulose and lignin by 5.5%. In turn, it presented a 35.5% acid detergent fiber (ADF). The FRF presented a total dietary fiber content (TDF) of 50.2%, comprised mainly of insoluble dietary fiber (IDF) 45.2% and 4.9% soluble dietary fiber (SDF), with a high absorption capacity (10.52 ± 0.43 g / g) and water retention (9.16 ± 0.29 g / g) and a low oil-holding capacity (2.06 ± 0.03 g / g) and adsorption of water (0.51 ± 0.05 g / g). Absorption capacity of organic molecules was 1.73 ± 0.05 g / g. The values of the properties evaluated, primarily the ability to absorb and retain water and oil, making this fraction to be an important ingredient for the manufacture of products such as desserts, drinks, jellies, breads, cookies, among other foods.

PALABRAS CLAVE: *chía, Salvia hispanica, fibra dietética, propiedades funcionales.*

KEYWORDS: *chía, Salvia hispanica, dietary fiber, functional properties.*

INTRODUCCIÓN

Entre los factores considerados de interés para evaluar la calidad nutricional de un alimento se encuentran el alto contenido en fibra, la proporción de fibra soluble/insoluble y el bajo aporte energético. Se ha demostrado que la fibra obtenida a partir de algunos granos o semillas exhibe ciertas propiedades fisiológicas y funcionales que resultan interesantes y son de potencial aplicación en la industria alimentaría (Vázquez-Ovando *et al.* 2008). La fibra dietética total (FDT) se ha convertido en un componente importante para la dieta diaria. Ingesta de grandes cantidades de FDT tiene efectos beneficiosos para la salud, algunos de los cuales incluyen la reducción de colesterolemia, cambios en las funciones intestinales y actividad antioxidante. Una mayor ingesta de FDT puede realizarse a través de alimentos de origen vegetal naturales y procesados (frutas, cereales, verduras, legumbres) o enriquecidos en fibra (galletas, cereales de desayuno, panes, lácteos, etc), así como a través de suplementos dietéticos o farmacéuticos (tabletas, granulados, cápsulas, etc) (Saura-Calixto y Jiménez-Escrig 2001). La FDT, también presenta propiedades tecnológicas y funcionales tales como retención, absorción y adsorción de agua, retención de aceite y absorción de moléculas orgánicas, lo cual brinda a los alimentos la capacidad de formar geles y mantener la estructura de los mismos (Reyes-Cautillo et al. 2008). La determinación de las propiedades anteriormente mencionadas es de gran utilidad, ya que durante el procesamiento de alimentos se pueden producir modificaciones importantes que deben ser consideradas en función del destino final del producto y su correspondiente comercialización (Zaragoza et al. 2001).

La fibra dietética se puede clasificar según su relación con la estructura de las paredes celulares, su naturaleza química y su solubilidad en agua en: soluble (FDS) e insoluble (FDI). Las fibras solubles en contacto con agua forman un retículo donde ésta queda atrapada, formando soluciones de gran viscosidad. Dentro de este grupo se encuentran las pectinas, gomas, mucílagos y ciertos tipos de hemicelulosas. Las fibras insolubles forman soluciones de baja viscosidad, incluyen celulosa, lignina y algunas fracciones de hemicelulosa (Álvarez y Sánchez 2006).

Dada la capacidad de la fibra soluble de formar geles, esta característica le confiere la propiedad de retardar la evacuación gástrica, lo que hace más eficiente la digestión y absorción de alimentos, generando una mayor sensación de saciedad. Las fibras solubles, son fibras fermentables que pueden ser degradadas microbiológicamente en el colon, generando gases como dióxido de carbono, hidrógeno y metano y ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico), los cuales son absorbidos y utilizados como fuente de energía. Las fibras insolubles, son responsables del incremento del volumen de las heces y ayudan a regular los movimientos intestinales (Theuwissen y Mensink 2008). En cuanto a los efectos fisiológicos, la fibra soluble disminuye el colesterol sérico y ayuda a reducir riesgo de ataques cardíacos y cáncer de colon, mientras que la fibra insoluble previene o alivia problemas de constipación. También, ambos tipos de fibras reducen el riesgo de obesidad, hipertensión arterial, apendicitis, entre otras enfermedades. (Rehinan *et al.* 2004).

La Chía (*Salvia hispanica L.*) es una planta herbácea anual de cultivo estival perteneciente a la familia de las Labiatae. Es nativa del sur de México y norte de Guatemala. La planta produce numerosas semillas pequeñas, mayoritariamente de color oscuro, existiendo otros cultivares con semillas blancas. Las semillas contienen entre un 25 y un 39% de aceite, el cual es rico en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente en ácido linolénico (omega-3) (60%). La harina de chia (residuo posterior de la extracción de aceite) es buena fuente de proteínas (19-23%) y fibra (22 %) (Ayerza y Coates 1999) y fibra dietaria (33,9-39,9%) (Craig y Sons 2004; Reyes-Caudillo *et al.* 2008).

El objetivo del presente trabajo fue obtener una fracción con alto contenido en fibra dietética a partir de la harina desgrasada de chía cultivada en Argentina y evaluar algunas de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Fracción Fibrosa

Se utilizaron semillas de chía procedentes de la provincia de Salta (Argentina), las mismas fueron trituradas en un molino de cuchillas de laboratorio y posteriormente desgrasadas mediante un equipo Soxhlet, (*n*-hexano a reflujo, 8 h). La harina residual fue homogeneizada habiéndose obtenido la fracción fibrosa mediante su tamizado a través de una malla 100 A.S.T.M. y agitación durante 20 min. La fracción retenida por el tamiz se consideró rica en fibra (FRF).

Caracterización fisicoquímica

La FRF fue caracterizada en su composición química en lo que respecta al contenido de humedad (AOCS Ba 2ª-38, 1998), cenizas (Método Oficial AOCS Ba 5ª-49, 1998), aceite (IUPAC 1.122, 1992), proteína bruta (AOAC, 1998; Guiragossian et al, 1997) y fibra cruda (AOCS Ba 6-84, 1998). El contenido de extractos libres de nitrógeno, que comprende a todos los compuestos digestibles entre los que se incluye almidón, azúcares solubles y otros compuestos orgánicos, se calculó por diferencia restando a 100 las cenizas, aceite, proteína bruta y fibra cruda.

El método de Van Soest es empleado para evaluar forrajes y alimentos fibrosos, considerando la célula vegetal y dividiéndola en dos partes: contenido celular (altamente digestible) y pared celular (parcialmente digestible). El método de análisis separa la pared celular del contenido celular y sus componentes: celulosa, hemicelulosa y lignina. La fibra detergente neutra (FDN, la pared celular), fibra detergente ácida (FDA, formada por celulosa y lignica), celulosa, lignina y hemicelulosa fueron cuantificados por esta técnica (Guiragnossian *et al*.1979).

La fibra dietética total (FDT), insoluble (FDI) y soluble (FDS) fueron determinadas por el método ezimático-gavimétrico de AOAC 985.29, 1997, Prosky *et al*.,1998.

Características funcionales

A la FRF se le determinaron las siguientes propiedades funcionales: capacidad de retención de agua (CRA), capacidad de retención de aceite (CRAc.) (Chau *et al.*, 1997), capacidad de absorción de agua (CAA) (AACC 88-04 1984), capacidad de adsorción de agua (CDA) (Chen *et al*. 1984) y capacidad de absorción de moléculas orgánicas (Zambrano *et al.* 2001).

Análisis de datos

Los datos de las distintas propiedades evaluadas se expresan como promedios y su respectivo desvío estándar, calculados empleando el software Microsoft Excel (2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se puede observar la composición proximal de la fracción fibrosa de chia a partir de semillas cultivadas en Argentina (Salta). La fibra cruda brinda una idea de la cantidad de hidratos de carbonos estructurales y sustancias ligadas a éstos. Si bien no los representa con precisión, corresponde aproximadamente al contenido de celulosa. La FRF obtenida presentó un 3,8% y un 7,18% más de fibra cruda y proteína respectivamente, que a los correspondientes para la FRF obtenida por Vázquez-Ovando *et al*. (2008) a partir de semillas originarias de México.

Tabla 1. Composición proximal de la FRF (% b.s).

Componente	FRF de Chia
Humedad	9,37 ± 0,03 (b.h)
Fibra cruda	32,84 ± 0,34
Proteínas *	35,32 ± 0,17
Cenizas	6,65 ± 0,04
Grasas	0,21 ± 0,04
ELN	24,98

*Factor: 6,25; ELN: Extracto libre de nitrógeno.

El contenido de FDN, presentó un valor de 65% (28,2 % de celulosa, 31,3 % de hemicelulosa y 5,5, % de lignina). Mientras que se detectó un contenido de 35,5 % de FDA. A altos valores de FDN menor es la digestibilidad del alimento. Si bien el valor de FDN está en el rango del reportado para cáscara de girasol (65-75%), esta FRF de chía presenta un contenido de FDA inferior al de cáscara de girasol (50-63%), lo cual es indicativo de un mayor contenido de hemicelulosa (Park et al 1997).

El contenido de fibra dietética total (FDT) de la fracción rica en fibra fue de 50,2%, valor inferior al reportado por Vázquez-Ovando *et al*. (2008) para la FRF obtenida a partir de semillas provenientes de México (56,5 %). La fracción mayoritaria de este componente está dada por la fibra dietética insoluble

(FDI) (**Tabla 2**). La relación FDI/FDS es una información de importancia por los efectos nutricionales y fisiológicos en los consumidores. La American Dietetic Association recomienda un consumo de 25-30 gramos de fibra por día, con una proporción de FDI/FDS de 3-1 (Borderías *et al* 2005). La FRF de chía obtenida presentó una relación FDI/DFS de 9,2.

Tabla 2. Contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble de FRF (g/100g) (b.s).

Componente	FRF de Chia
FDT	50,2
FDI	45,2
FDS	4,9

Con relación a las propiedades funcionales evaluadas puede destacarse que la FRF presentó una alta capacidad de absorción (10,52 g/g) y de retención de agua (9,16 g/g) y una menor capacidad de retención de aceite (2,06 g/g) y de adsorción de agua (0,51 g/g) (**Tabla 3**). Cabe señalar que la capacidad de retención de agua depende en gran medida del nivel máximo de incorporación de fibras en relación con la formulación y procesamiento de alimentos ricos en fibra. Además, esta propiedad es importante desde el punto de vista fisiológico y definirá su función específica en el organismo (Chen *et al* 1984, Dreher 1987). La capacidad de absorción tiene influencia en el procesamiento de los alimentos, especialmente en aquellos en los que los mismos serán humectados antes o durante su manipulación. La baja capacidad de retención de aceite, similar a la observada en fibra de cebada (Mongeau y Brassad 1982) y fracción rica en fibra de chía cultivada en México (Vázquez-Ovando *et al*. 2008), sugiere que esta FRF proporcionaría una sensación no grasa, lo cual le confiere potencial principal como ingrediente para productos fritos.

Tabla 3. Propiedades funcionales de la FRF (b.s).

Componente	FRF de Chia
Capacidad de retención de agua (CRA)	9,16 ± 0,29 g/g
Capacidad de retención de aceite (CRAc)	2,06 ± 0,03 g/g
Capacidad de absorción de agua (CAA)	10,52 ± 0,43 g/g
Capacidad de adsorción de agua (CDA)	0,51 ± 0,05 g/g
Capacidad de absorción de moléculas orgánicas (CMO)	1,73 ± 0,05 g/g

Su alta capacidad de absorción de moléculas orgánicas (1,73g/g) fue similar a la reportada para cáscara de trigo y maíz (1,98 y 1,6 g/g, respectivamente, Zambrano *et al* 2001), por lo que su incorporación en comidas proporcionaría beneficios fisiológicos al consumidor. Esta propiedad está relacionada con la fijación de moléculas orgánicas cuando la fibra pasa a través del intestino, quedando atrapadas o unidas a sitios activos de la fibra, colaborando en la eliminación de ácidos biliares, agentes carcinogénicos y mutagénicos, drogas y compuestos tóxicos (Zaragoza *et al.* 2001).

CONCLUSIONES

La FRF de chía obtenida a partir de semillas cosechadas en Argentina es una importante fuente de fibra dietética, compuesta principalmente por fibra dietética insoluble y una baja proporción de fibra dietética soluble. Los valores correspondientes a las propiedades evaluadas, principalmente la capacidad de absorción y retención de agua y de aceite, convierten a esta fracción en un ingrediente importante para la elaboración de productos tales como postres, bebidas, gelatinas, panes, galletitas, entre otros alimentos. La incorporación de esta FRF de chía en alimentos proporcionaría efectos fisiológicos beneficiosos para el consumidor teniendo en cuenta su alta capacidad de absorción de moléculas orgánicas.

AGRADECIMIENTOS

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – CONICET.

- Universidad Nacional del Centro de la provincia de Buenos Aires y Universidad Nacional de La Plata.
-Laboratorio de Nutrición y Evaluación de Calidad de Forrajes. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - Estación Experimental Agropecuaria - Balcarce.
-Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. M.Sc. Ángela Zuleta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACC (1984). Official methods of análisis (12th ed.). St. Paul, MN, USA: American Association of Cereal Chemists.

Álvarez Escudero, E y Sánchez González, P. (2006). La fibra dietética. Nutrición Hospitalaria 21 (Supl. 2), pp. 61-72.

AOAC (1997). In W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis (17th ed.), Washington, D.C., USA, Association of Official Analytical Chemists.

AOCS (1998). Official and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 5th edn., edited by D. Firestone, AOCS Press, Champaign Illinois.

Ayerza, R. y Coates W. 1999. An omega-3 fatty acid enriched chia diet: its influence on egg fatty acid composition, colesterol and oil content. Canadian Journal of Animal Science ,79: 53-58.

Borderías AJ, Sanchez-Alonso I y Pérez-Mateos M. 2005. New applications of fibres in foods:Additions to fishery products. Trends in Food Science and Technology, 16: 458-465.

Chau C, Cheung K y Wong Y. 1997. Functional properties of protein concentrate from three Chinese indigenous legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 2500-2503.

Chen J, Piva M, y Labuza TP. 1984. Evaluation of water binding capacity (WBC) of food fiber sources. Journal of Food Science, 49: 59-63.

Craig R y Sons M. 2004. Application for approval of whole chia (Salvia hispaica L.) seed and groubd whole chia as novel food ingredients. Advisory committee for novel food and proceses. Ireland, Company David Armstrong, 1-29.

Dreher M. 1987. Handbook of Dietary Fiber. Marcel Dekker, Inc. New York.

Guiragossian VY, Van Scoyoc SW y Auxtell JD. 1979. Chemical and Biological Methods for Grain and Forage Sorghum, Departament of Agronomy Internacional Programs in Agricultura, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA.

IUPAC (1992). International Union of Pure and Aplplied Chemistry – Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. 7th edn. Paquot, C. and Hautffene, A., Blackwell Scientfic Publications, Inc., Oxford.

Mongeau R y Brassad M. 1982. Insoluble diatery fiber from breakfast cereals and brans bile salt and water holding capacity in relation to particle size. Journal of Cereal Chemistry, 59: 413-417.

Park CS, Marx G, Moon YS, Wiensenborn D, Ching Chang K y Hofman V. 1997. Alternative Uses of Sunflower, en Sunflower technology and Production, A.A. Scheneiter (ed), American Society of Agronomy, Crop Science of America, Soil Science Society of American Inc. Publishers, 765-807.

Prosky L, Asp N, Schweizer T, Devries S y Furda I. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in food and food products: interlaboratory study. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 71: 1017-1023.

Rehinan Z, Rashid M y Shah WH. 2004. Insoluble dietary fibre components of food legumes as affected by soaking and cooking processes. Journal of Food Chemistry, 85: 245-249.

Reyes-Cautillo E, Tecante A y Valdivia-López MA. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (Salvia hispanica L.) seeds. Journal of Food Chemistry 107: 656-663.

Saura-Calixto F y Jiménez-Escrig A. 2001. Compuestos bioactivos asociados a la fibra dietética. En: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Witting E y Wenzel de Menezes E, Editores. Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Brasil: Livraría LTDA. pag 103-126.

Theuwissen E, Mensink RP. 2008. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. Journal of Physiology & Behavior. Article in press.

Vázquez-Ovando A y col. 2008. Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (Salvia hispanica L.). Journal of Food Science and Technology. Article in press.

Zambrano Zaragoza ML, Meléndez R y Gallardo Y. 2001. Propiedades funcionales y metodología para su evaluación en fibra dietética. En: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Witting E y Wenzel de Menezes E, Editores. Fibra dietética en Iberoamérica: Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Brasil: Livraría LTDA. pag. 195-209.

Propiedades antioxidantes y antirradicalarias de polen apícola y de propóleos de Santiago del Estero

Antioxidant and antiradical properties of pollen and propolis from Santiago del Estero

Chaillou LL (1), Medina AV (1), Nazareno MA (1)(2)

(1) Instituto de Ciencias Químicas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias-Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (S) 1912. CP 4200. Santiago del Estero, Argentina.
(2) INQUINOA-CONICET.
llchaillou@yahoo.com

RESUMEN

Entre los productos apícolas, además de la miel se destacan polen apícola y propóleos por su notable contenido de compuestos bioactivos, entre los que se encuentran los polifenoles. Estos compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y constituyen mezclas complejas que contienen compuestos representativos de diversos grupos estructurales, entre los cuales se destacan los flavonoides. El propóleos es una sustancia resinosa, extremadamente compleja, producida por las abejas de la especie *Apis mellifera* L., valioso por sus propiedades biocidas, anestésicas, antiulcerosas, citostáticas, fitoinhibidoras, anticariogénicas y antioxidantes, atribuidas a los diversos compuestos fenólicos que lo constituyen. El polen es elaborado por las abejas a partir de pólenes que recolectan de diversas flores y que aglutinan con néctar y secreciones salivares. Es valioso por sus propiedades nutricionales debido a su contenido de azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas y polifenoles, principalmente flavonoides. El objetivo principal de este trabajo fue determinar la actividad antirradicalaria y antioxidante de extractos etanólicos de propóleos y de polen de distintas localidades de la provincia de Santiago del Estero, Argentina, y estudiar su relación con el contenido de polifenoles y flavonoides que los constituyen. Se prepararon extractos etanólicos para las distintas muestras de polen y propóleos. Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, y el contenido de flavonoides por la técnica espectrofotométrica del $AlCl_3$ utilizando ácido gálico y quercetina como referencia, respectivamente. Las actividades antirradicalaria y antioxidante se determinaron por la técnica del radical libre 1,1-difenil-2picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) y la técnica de la co-oxidación inducida por lipoxigenasa de soja, del sistema micelar β-caroteno-ácido linoleico, respectivamente. En todos los casos se expresaron los resultados como la actividad equivalente de quercetina (mg/g de muestra). El contenido de polifenoles totales osciló en un rango de 14,0 a 31,5 mg/g para polen y 86,2 a 132,6 mg/g para propóleos y el de flavonoides 1,5 a 2,7 mg/g para polen y 6,3 a 20,2 mg/g para propóleos. Esto se debe a que los componentes principales del propóleos son resinas y bálsamos notablemente ricos en estos compuestos. Por esta razón tanto la actividad antirradicalaria y antioxidante para este producto fue considerablemente superior a la de los extractos polínicos, registrándose actividades antirradicalarias del orden de 66 a 105 equivalentes de quercetina para propóleos frente a 13,2 a 28,4 para polen mientras que el rango de actividades antioxidantes estuvo entre 71 y 326 para propóleos y 0,7 a 20,1 equivalentes de quercetina para polen. Tanto el propóleos como el polen son productos naturales con un gran potencial de utilización en la industria agroalimentaria y de cosméticos. Las muestras analizadas de propóleos y polen presentan actividad antioxidante y antirradicalaria, siendo superior la presentada por propóleos.

ABSTRACT

Among hive products, besides of honey, propolis and bee-pollen are notable for their remarkable content of bioactive compounds as polyphenols. These phenolic compounds are widely spread in vegetal kingdom and constitute complex mixtures containing compounds representing different structural groups, among which are the flavonoids. Propolis is a resinous extremely complex substance produced by bees (*Apis mellifera* L.), valuable for its biocide, anesthetic, antiulcer, cytostatic, phytoinhibitor, antioxidant and anticariogenic properties, attributed to its phenolic compounds. Bee-pollen is collected by bees from various flowers, mixed together with nectar and salivary secretions. It is valuable for their nutritional properties due to their high content of sugars, proteins, lipids, vitamins

and polyphenols, mainly flavonoids. The main objective of this study was to determine antiradical and antioxidant activities of propolis and bee-pollen extracts from different localities of the province of Santiago del Estero, Argentina, and to evaluate the relation with their polyphenol and flavonoid contents. Bee-Pollen and propolis extracts were prepared using ethanol as extraction solvent. Total phenolic compound contents were determined by Folin-Ciocalteu technique using gallic acid as reference. Total flavonoid contents were measured spectrophometrically by the aluminum chloride technique using quercetin as reference. Antiradical activities were analyzed by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) bleaching technique and antioxidant abilities were determined by the technique of β-carotene disappearance inhibition in a micelle cooxidation system containing linoleic acid induced by soybean lipoxygenase. Results obtained were expressed as quercetin equivalent activities in mg/g of sample. Total polyphenol content varied in a range of 14.0 to 31.5 mg/g for bee-pollen and 86.2 to 132.6 mg/g for propolis, while, total flavonoid content range was from 1.5 to 2.7 mg/g for pollen and from 6.3 to 20.2 mg/g for propolis. These high contents found in propolis are due to its main constituents remarkably rich in these compounds, resins and balsams. Consequently, both, antioxidant and antiradical activities of propolis were considerably higher than those of pollen. Antiradical activities varied from 66 to 105 quercetin equivalents for propolis compared to pollen range from 13.2 to 28.4, while antioxidant activities were between 71 and 326 quercetin equivalents for propolis and from 0.7 to 20.1 for pollen. Both bee-pollen and propolis are natural products with great potential use in the food and cosmetic industries.

PALABRAS CLAVE: *actividad antioxidante, flavonoides, polifenoles, polen, propóleos.*

KEYWORDS: *antioxidant activity, flavonoids, polyphenols, pollen, propolis.*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son fitoquímicos que presentan en su estructura uno o más anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo (Melo y Guerra 2002). Constituyen mezclas complejas que contienen compuestos representativos de diversos grupos estructurales, entre los cuales se destaca el amplio grupo de los flavonoides (Benavente-García *et al*. 1997). Se han identificado más de 4000 de estos compuestos en hojas, semillas, cortezas y flores, su función principal es de protección contra radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros (Heim *et al*. 2002), además las antocianinas que pertenecen a este grupo, actúan atrayendo y orientando insectos hacia el néctar, contribuyendo de esta manera a la polinización (Harborne y Williams 2000).

El estudio de las reacciones oxidativas se ha incrementado en los últimos años debido a que la oxidación de los componentes celulares por acción de radicales libres ha sido reconocida como la causa de procesos como el envejecimiento celular y de numerosas enfermedades tales como cáncer, mal de Parkinson, Alzheimer y enfermedades cardiovasculares (Soler-Rivas *et al*. 2000; Fukumoto y Mazza 2000). Numerosos trabajos de investigación han reportado que los flavonoides presentan propiedades medicinales. En virtud de su capacidad de inhibir la oxidación de la fracción de baja densidad del colesterol (LDL) poseen efectos cardioprotectores. Una elevada ingesta de flavonoides reduce la mortalidad por enfermedades coronarias y la incidencia de infartos en hombres de edad avanzada, estos efectos han sido atribuidos a su acción antioxidante (Heim *et al*. 2002). Además, las reacciones de oxidación causan serios problemas en la industria alimentaria debido a que los lípidos presentes en los alimentos son oxidados durante la peroxidación, produciendo cambios totales o parciales en sus propiedades sensoriales y en su valor nutritivo puesto que se pierden vitaminas, ácidos grasos esenciales y proteínas (Larson 1997). Por ello se ha incrementado la atención científica sobre los efectos preventivos y terapéuticos de antioxidantes naturales presentes en bebidas y alimentos (Meltzer y Malterud 1997), especialmente en granos, vegetales, frutas, propóleos y polen debido a sus potenciales aplicaciones en la mejora de la calidad y seguridad de alimentos así como también en la prevención de numerosas enfermedades (Yu *et al*. 2003, Kroyer y Hegedus 2001).

Entre los productos apícolas, además de la miel se destacan polen y propóleos por su notable contenido de polifenoles. El propóleos es una sustancia resinosa, extremadamente compleja, producida por las abejas de la especie *Apis mellifera* L., a partir de resinas gomas y bálsamos de diferentes

fuentes vegetales para cerrar grietas de la colmena, eliminar posibles invasores y con fines desinfectantes (Ghisalberti, E, 1979; Bankova *et al*., 1982; Asís, 1989; Park *et al*., 1998). Es valioso por sus propiedades biocidas, anestésicas, antiulcerosas, citostáticas, fitoinhibidoras, anticariogénicas y antioxidantes, atribuidas a los diversos compuestos fenólicos que lo constituyen (Park *et al*. 1998). El polen apícola es elaborado por las abejas a partir de pólenes que recolectan de diversas flores y que aglutinan con néctar y secreciones salivares. Es valioso por sus propiedades nutricionales debido a su contenido de azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas y polifenoles, principalmente flavonoides, siendo los mismos responsables de sus propiedades antioxidantes (Tomás Lorente *et al*. 1992).
El objetivo principal de este trabajo fue determinar la actividad antirradicalaria y antioxidante de extractos etanólicos de propóleos y de polen apícola de distintas localidades de la provincia de Santiago del Estero, Argentina, y estudiar su relación con el contenido de polifenoles y flavonoides que los constituyen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

Se recolectaron 15 muestras de aproximadamente 100 g de propóleos por raspado, y 15 muestras de polen mediante trampas, de colmenas ubicadas en distintas localidades de la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Las muestras se almacenaron en el laboratorio, refrigeradas, y al abrigo de la luz. Previamente al análisis fueron trituradas y homogeneizadas.

Extracto etanólico de propóleos y de polen

Se extrajeron porciones de 1g de cada muestra con 100 mL de etanol puro, se sonicaron durante 30 minutos con agitación. Posteriormente fueron filtradas con papel Whatman Nº 40 para retener las impurezas. Los extractos (EEP) se conservaron refrigerados en frascos de color ámbar hasta el momento del análisis.

Determinación de Polifenoles y Flavonoides

Los polifenoles totales se determinaron, en los EEP al 0,1 % utilizando el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron como mg/g de compuestos fenólicos expresados como ácido gálico.
Los flavonoides se cuantificaron determinando la absorbancia, a 428 nm, del complejo flavonoides-aluminio, obtenido por reacción del EEP con una solución metanólica de $AlCl_3$ al 2%; quercetina fue utilizada como compuesto de referencia.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Actividad Antirradicalaria (AAR)

Se midió la absorbancia a 517 nm durante 10 min de una solución de 1,1 difenil-2 picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) de concentración: 33,6µg/mL en metanol luego del agregado de 10 µL de EEP. Las determinaciones se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro UNICAM UV-Visible UV2. La actividad antirradicalaria (AAR) se calculó, mediante la ecuación:

$$AAR(\%) = 100\left[1 - \frac{A_m^{\infty}}{A^0}\right] \qquad (1)$$

Donde A^0 es absorbancia al tiempo 0 sin el agregado de muestra y A_m^{∞} es absorbancia de la muestra al tiempo infinito. La absorbancia en estado estacionario se obtuvo mediante el ajuste de los perfiles cinéticos a tiempo infinito. La AAR se expresó como unidades equivalentes de quercetina, utilizándose para ello una curva de calibración. Los resultados corresponden a los miligramos de quercetina que tendrían que estar presentes por gramo de muestra de polen para que el extracto presente la actividad medida.

Determinación de la actividad antioxidante (AAO)

Se prepararon soluciones de β-caroteno y ácido linoleico utilizando Tween 20 y buffer borato de sodio de pH 9. Alícuotas de estas soluciones se mezclaron y se adicionaron 100µL de EEP; a continuación se agregó una alícuota de la solución de lipoxigenasa de soja para inducir la oxidación y se leyó la absorbancia a 460 nm, durante 10 min (Chaillou y Nazareno 2006). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La actividad antioxidante (AAO) se calculó, mediante la ecuación sugerida por Burda y Oleszek (2001):

$$\%\ AOA = 100 \times \left[1 - \frac{(A_m^0 - A_m^t)}{(A_c^0 - A_c^t)} \right] \qquad (2)$$

Donde A_m^0 es la absorbancia de la muestra a 0 min y A_c^0es la absorbancia del control a 0 min; A_c^t y A_m^t son las absorbancias para un tiempo de 10 min del control y de la muestra, respectivamente.
La AAO se expresó como unidades equivalentes de quercetina en mg/g muestra, utilizándose para ello una curva de calibración. Los resultados corresponden a los miligramos de quercetina que tendrían que estar presentes por gramo de muestra de polen o propóleos para que el extracto presente la actividad medida. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa estadístico STATGRAPHICS plus 3.0. Se determinaron media y desviación estándar. Para establecer correlaciones entre los parámetros estudiados se utilizó análisis de regresión lineal, informándose el valor del coeficiente de correlación (R).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan los contenidos de polifenoles y flavonoides de muestras de polen y propóleos recolectados en cinco localidades de la provincia de Santiago del Estero.

Tabla 1. Contenido de polifenoles y flavonoides en muestras de polen y propóleos

Localidad	Polifenoles (mg/g)		Flavonoides (mg/g)	
	Propóleos	Polen	Propóleos	Polen
Colonia Gamara	114,8 ± 3,3	14,0 ± 0,2	9,2 ± 1,3	2,6 ± 0,2
Maco	132,6 ± 6,7	31,5 ± 0,4	20,2 ± 1,1	1,5 ± 0,3
San Pedro	108,0 ± 0,6	20,0 ± 0,2	6,3 ± 0,3	2,0 ± 0,2
Santiago del Estero	86,2 ± 1,6	17,9 ± 0,2	11,1 ± 0,5	1,8 ± 0,1
Yanda	106,8 ± 1,2	15,6 ± 0,1	9,4 ± 0,4	2,7 ± 0,2

(n=15)

El contenido de polifenoles totales de las muestras de propóleos varía entre 86,2 y 132,6 mg/g, siendo inferior al rango reportado por Isla *et al*. (2005) para muestras de Santiago del Estero (182,25 a 237,90 mg/g). El contenido de estos compuestos en polen de diferentes localidades de Santiago del Estero (14,0 a 31,5 mg/g) es superior al encontrado en muestras de diferentes regiones de España (12,4 mg/g) por Serra Bonvehi *et al*. (2001) y al informado para muestras europeas (7,4 a 9,7 mg/g) por Kroyer y Hegedus (2001). El contenido de flavonoides en propóleos varió entre 6,3 y 20,2 mg/g y se encuentra dentro del rango 8 a 18 mg/g informado por Park *et al*. 1997, para los estados del sur de Brasil. En polen, el contenido osciló entre 1,5 a 2,7 mg/g, siendo inferior al rango de 3,5 a 7,8 mg/g determinado en muestras de polen de España por Serra Bonvehi *et al*. (2001). Estas diferencias en los contenidos son atribuidas a las diferentes especies vegetales que las abejas utilizan como fuente para la elaboración de estos subproductos y a las diferencias en los procesos de extracción utilizados en los distintos trabajos.
Si se comparan los contenidos de polifenoles y flavonoides en los productos apícolas analizados, se observa que los de propóleos son notablemente superiores a los presentados por las muestras de polen puesto que sus componentes principales son resinas y bálsamos notablemente ricos en polifenoles, mientras que, azúcares y proteínas son los constituyentes mayoritarios de polen.
En las **Figuras 1** y **2** se muestran en forma comparativa las actividades antirradicalaria y antioxidante determinadas para estos productos apícolas.
Se registraron AAR del orden de 66 a 105 unidades equivalentes de quercetina para propóleos frente a 13,2 a 28,4 para polen, mientras que las AAO estuvieron entre 71 y 326 unidades para propóleos y 0,7

a 20,1 para polen. Las actividades presentadas por muestras de este producto apícola son muy bajas comparadas por las presentadas por muestras de propóleos de la misma localidad. Esto está de acuerdo con sus bajos contenidos de compuestos polifenólicos y flavonoides a los cuales se atribuye su actividad antioxidante.

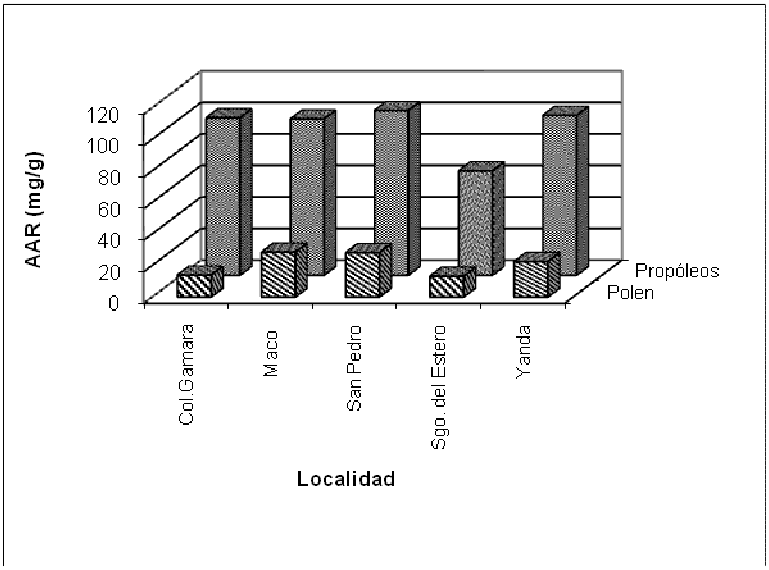


Figura 1. Actividad antirradicalaria de polen y propóleos.

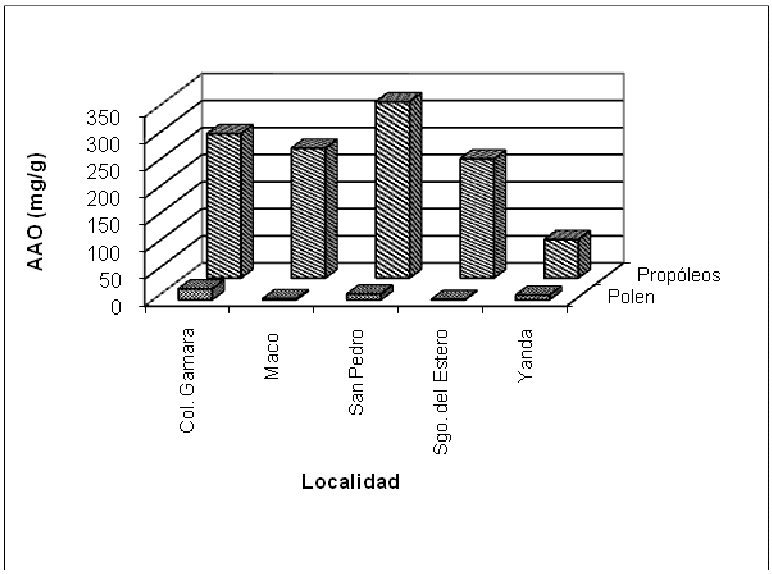


Figura 2. Actividad antioxidante de polen y propóleos.

Se encontró, en las muestras estudiadas, correlación lineal directa entre el contenido de polifenoles y la AAR para muestras de propóleos (R=0,7) y de polen (R=0,6) y entre el contenido de flavonoides y la AAO presentada por muestras de polen (R=0,7), mientras que para propóleos la correlación es muy baja (R=0,4).

CONCLUSIONES

Tanto el propóleos como el polen son productos naturales con un gran potencial de utilización en la industria agroalimentaria y de cosméticos. Las muestras analizadas de propóleos y polen presentan actividad antioxidante y antirradicalaria, siendo notablemente superior la presentada por propóleos debido a su elevado contenido de polifenoles y flavonoides.

Existe correlación lineal directa entre el contenido de polifenoles y la capacidad atrapadora de radicales libres para extractos de ambos productos apícolas. La actividad antioxidante *in vitro* de polen se relaciona directamente con el contenido de flavonoides.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento de CICYT-UNSE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asís M. 1989. Propóleos. En Propóleos: el oro púrpura de las abejas. 1ª ed. La Habana: Editorial CIDA. Pág. 1- 48.

Bankova V., Popov S., Marenkov W. 1982. High perfomance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of Chromatography, 242: 135-143.

Benavente-García O, Castillo J, Marin F, Ortuño A, Del Río J. 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4505-4515.

Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2774-2779

Chaillou LL, Nazareno MA. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8397-8402.

Fukumoto L, Mazza G. 2000. Assesing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 3597-3604.

Ghisalberti E. 1979. Propolis a review. Bee World, 60: 59-84.

Harborne J, Williams C. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Review. Phytochemistry, 55: 481-504.

Heim K, Tagliaferro A, Bobilya D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Reviews: Current topics. Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584.

Isla M, Paredes-Guzman J, Nieva-Moreno M, Koo H., Park Y. 2005. Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 1166-1172.

Kroyer G, Hegedus N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2: 171-174.

Larson R. 1997. Autooxidizable substances: weathering. En Naturally Occurring Antioxidants. 1ª ed. New York: Lewis Publishers. Pág. 1-18.

Melo E, Guerra N. 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 36: 1-11.

Meltzer H, Malterud K. 1997. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? Review. Scandinavian Journal of Nutrition/Näringsforskning, 41: 50-57.

Park Y, Ikegaki M, Abreu J, Alcici N. 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 18: 313-318.

Park Y, Koo M, Ikegaki M., Contado J. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. Arquivos de Biología e Tecnologia, 40: 97-106.

Serra Bonvehi J, Soliva Torrento M, Lorente C. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee collected pollen produced in Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 1848-1853.

Soler-Rivas C, Espín J., Wichers H. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. Phytochemical Analysis, 11: 330-338.

Tomas-Lorente F, Garcia Grau M, Nieto J, Tomas-Barberan F. 1992. Flavonoids from *Cistus Ladanifer* bee pollen. Phytochemistry, 31: 2027-2029.

Yu L, Perret J, Harris M, Wilson J, Haley S. 2003. Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1566-1570.

Caracterización sensorial y fisicoquímica de mieles monoflorales de la Provincia de Santa Fe

Sensorial and physico-chemical characterization of monofloral honey from the Province of Santa Fe

Ciappini MC, Di Vito MV, Gatti MB

Universidad del Centro Educativo Latinoamericano, Pellegrini 1332, Rosario, Argentina,
laboratorio@ucel.edu.ar

RESUMEN

En estudios melisopalinológicos preliminares sobre mieles provenientes de la Provincia de Santa Fe, se reconocieron 59 tipos morfológicos de polen. Entre ellos, las principales especies botánicas resultaron ser *Trifolium* spp., *Mendicago sativa, Eucaliptus* spp. y *Melilotus* spp. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue determinar las características fisicoquímicas y sensoriales de mieles de trébol y eucalipto. Se analizaron 41 muestras monoflorales de estos orígenes, provistas por el Programa Apícola Provincial, correspondientes a las campañas: 2005-2006 y 2006-2007. Los parámetros fisicoquímicos medidos fueron Acidez (AOAC 962.19), Humedad Refractómetrica (AOAC 969.38 B), Cenizas (IRAM 15932), Perfil de Azúcares (AOAC 977.20), Sacarosa Aparente y Azúcares reductores (IRAM 15934) y Color, que fue medido instrumentalmente (IRAM 15941-2) y visualmente. El análisis sensorial fue realizado por un panel de 10 evaluadores seleccionados y entrenados de acuerdo a IRAM 20005-1 y 2:1996. No se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre las propiedades fisicoquímicas de ambas mieles. Estas propiedades pueden considerarse como un índice de calidad más que como un indicador del origen botánico. Mediante un análisis de Componentes Principales y haciendo uso de los atributos sensoriales, se pudieron definir claramente recintos para la mieles de cada origen botánico. En consecuencia, el análisis sensorial es relevante y complementario del análisis polínico para asignarle carácter monofloral a una muestra de miel, tal como lo indica la legislación internacional.

ABSTRACT

In preliminary studies of botanical origin in honeys from Santa Fe Province, 59 morphologic types of pollen were recognized. Among them, the principal botanical species turned out to be *Trifolium* spp., *Medicago sativa, Eucaliptus* spp. and *Melilotus* spp. In consequence, the aim of this work was to determine the physicochemical and sensory characteristics of honeys of clover and eucalyptus. Forty one monofloral samples of these origins were analyzed, provided by the Programa Apícola Provincial, corresponding to the 2005-2006 and 2006-2007 harvests. The physicochemical parameters measured were Acidity (AOAC 962.19), Moisture (AOAC 969.38 B), Ashes (IRAM 15932), Perfil of Sugars (AOAC 977.20), Reducing Sugars and Apparent Sucrose (IRAM 15934), Color was measured instrumentally (IRAM 15941-2) and visually. The sensory analysis was made by a panel of 10 assessors selected and trained according to IRAM 20005-1 y 2:1996. Significant differences were not found ($p <0.05$) between the physicochemical properties of both honeys. These properties can be considered a quality index rather than an indicator of the botanical origin. By means of Principal Components analysis and by using the sensory attributes, enclosures could be sharply defined for the honeys of every botanical origin. Consequently, the sensory analysis is relevant and complementary to the botanical analysis to assign monofloral character to a sample of honey, as the international legislation indicates.

PALABRAS CLAVE: *miel, trébol, eucalipto, sensorial, fisicoquímico.*

KEYWORDS*: honey, clover, eucalyptus, sensory analysis, physicochemical.*

INTRODUCCIÓN

Argentina ocupa uno de los primeros lugares como exportador en el mercado mundial de miel, valorada por sus atributos fisicoquímicos y sensoriales. Para mantener y mejorar esta situación es necesario que la producción apícola cumpla con requerimientos internacionales, no solo garantizando sanidad, sino también características que certifiquen origen botánico y geográfico. Para ello, las estrategias de diferenciación son indispensables: los sellos de calidad, las denominaciones de origen, los protocolos basados en atributos particulares, el origen botánico y geográfico, la caracterización sensorial y la producción de miel orgánica son sólo algunos de los ejemplos en los que Argentina debe trabajar, para mejorar el posicionamiento de la miel en el mundo. El desafío es producir mieles diferenciadas, con el objetivo de darle valor agregado, respondiendo a su tipificación con características constantes y reconocibles. La Norma Europea (European Commission Directiva 110/01 2002) define las mieles como monoflorales cuando éstas proceden totalmente o en su mayor parte del origen botánico citado y poseen las características polínicas, fisicoquímicas y sensoriales correspondientes a su origen. El concepto de calidad de un alimento considera la autenticidad, es decir que el alimento no haya sido adulterado; salubridad, lo que implica que el alimento no contenga sustancias dañinas para la salud, pero también tiene en cuenta la genuinidad e integridad del producto con todas sus características, particularmente aromáticas y sápidas, especialmente para el mercado europeo (Piana *et al*. 2004). Por otro lado, varios estudios regionales presentan información sobre características fisicoquímicas acorde al Código Alimentario Argentino y tienen más el objetivo de enfatizar la calidad que el de identificar el tipo de miel. En consecuencia el contenido polínico y las características sensoriales de las mieles son ensayos complementarios para su caracterización.

La variedad de especies botánicas de la provincia de Santa Fe (Argentina 28° -35° SL; 58° -62° WL) permite obtener en este territorio, mieles con diferentes características. En estudios previos se encontró que la flora melífera predominante en la provincia de Santa Fe corresponde a *Trifolium* spp., *Mendicago sativa, Eucaliptus* spp. y *Melilotus* spp., en coincidencia con lo encontrado por Lusardi *et al*. (2005).

En base a estos antecedentes y con el propósito de tipificar las mieles de trébol y eucaliptus de la provincia de Santa Fe, se determinaron las características fisicoquímicas y sensoriales de éstas mieles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 41 muestras monoflorales de estos orígenes, provistas por el Programa Apícola Provincial, correspondientes a las campañas: 2005-2006 y 2006-2007. El análisis sensorial estuvo a cargo de un panel de 10 evaluadores seleccionados y entrenados de acuerdo a la Norma IRAM 20005-1 y 2:1996. Las muestras se presentaron de acuerdo a lo propuesto por Piana *et al*. (2004). En el análisis se contemplaron tres fases sucesivas: visual, olfativa y gustativa (Persano Oddo *et al*. 1995). Los atributos empleados para la fase visual fueron color, tamaño y cantidad de cristales y fluidez. Para la fase olfativa, floral, frutal, aromático, vegetal, cálido, animal y químico. Para la fase gustativa intensidad de dulzor, acidez, amargor y persistencia,. Las determinaciones fisicoquímicas realizadas fueron acidez (AOAC 962.19), humedad refractómetrica (AOAC 969.38), cenizas (IRAM 15932), perfil de azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa) (AOAC 977.20), sacarosa aparente y azúcares reductores (IRAM 15934) y color pfund (IRAM 15941-2).

La significación estadística de las diferencias de los valores medios para los parámetros fisicoquímicos fueron evaluados mediante Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) con el software OriginPro 8. Se consideraron las diferencias significativas para $p<0.05$. De los métodos de estadística multivariada, se utilizó el de Componentes Principales, que permite el análisis de las relaciones entre variables y similitudes entre individuos. Para su resolución se empleó el software XLSTAT (Niño y Simonetti, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Fisicoquímico

Los valores de acidez tuvieron un promedio de 22.0 meq/Kg ± 4.9 para mieles de trébol y 20.2 meq/Kg ± 5.0 para mieles de eucalipto, observándose valores superiores en las muestras que provenían de la zona norte de la provincia. Se comprobó que todas las muestras se encuentran dentro de especificación, ya que el valor admisible es de 40 meq/kg como máximo. La humedad refractómetrica, se mantuvo

constante alrededor de un 18.0% ± 1.1 para las mieles de ambos orígenes florales. Se observó gran variabilidad en los valores de cenizas, comprendidos entre 0.362 y 0.042 g/100g. Los porcentajes de fructosa fueron 39.25 g/100g ± 7.20 para mieles de trébol y 42.71 g/100g ± 3.00 para mieles de eucalipto, mientras que los porcentajes de glucosa fueron iguales a 29.95 g/100g ± 5.35 y 32.70 g/100g ± 3.32, respectivamente. No se encontró correlación alguna entre el perfil de azúcares y el origen botánico. Los valores de sacarosa aparente fueron de 3.48 g/100g ± 2.08 para mieles de trébol y 3.77 g/100g ± 1.56 para mieles de eucalipto y los de azúcares reductores, 68.33 g/100g ± 4.84 y 75.24 g/100g ± 2.76, respectivamente; encontrándose dentro de especificaciones.
El color fue medido instrumentalmente correspondiendo a las mieles de trébol ámbar extra claro (AEC, 44%), ámbar claro (AC, 29%) y blanco (B, 24%). En cambio, para las mieles de eucalipto se detectaron colores en todo el rango. El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre los valores de acidez promedio para los distintos orígenes florales, lo que indicaría que este parámetro físico-químico es un indicador de calidad, pero no de origen botánico. Al igual que para la humedad, para la acidez no se observaron diferencias significativas entre los valores de humedad promedio para los distintos orígenes florales.

Tabla 1. Análisis fisicoquímico de mieles de trébol y eucaliptus de la provincia de Santa Fe

Miel Determinación	Eucalipto	Trébol
Humedad Refráctométrica (g/100g)	18.24 ± 0.6	18.04 ± 1.1
Acidez (meq/Kg)	21.98 ± 4.9	20.02 ± 5
Cenizas (g/100g)	0.163 ± 0.237	0.042 ± 0.091
Fructosa (g/100g)	42.71 ± 3.00	39.25 g/100g ± 7.20
Glucosa (g/100g)	29.95 ± 5.35	32.70 ± 3.32
Sacarosa aparente (g/100g)	3.77 ± 1.56	3.48 ± 2.08
Azúcares reductores (g/100g)	75.24 ± 2.76	68.33 ± 4.84

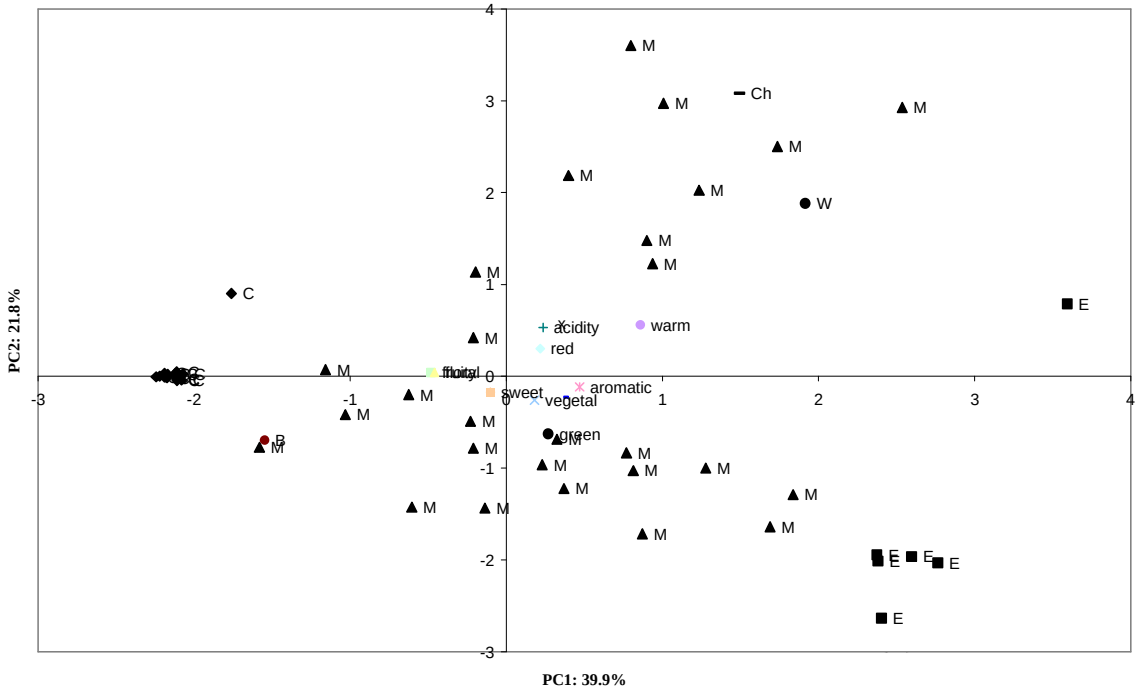
Análisis Sensorial

El desempeño de los miembros del panel fue monitoreado (ANOVA), verificándose que los evaluadores no mostraron diferencias significativas en el uso de las escalas utilizadas para cuantificar los atributos sensoriales, para un nivel del 0.05.
Las mieles de eucalipto cristalizaron en forma homogénea, formando cristales pequeños, que se disolvían fácilmente en la boca. El olor fue moderado y de persistencia débil. El dulzor fue moderado-intenso, careciendo de notas saladas o amargas. El aroma se percibió como vegetal, a pastura; pudiendo aparecer una nota láctica malteada, a pasto seco, con persistencia débil. En mieles de eucalipto que provenían de la isla, se observó un cambio de coloración, apareciendo matices rojizos, el olor presentó notas a madera, a caramelo y débilmente fenólicos y el dulzor fue intenso y persistente, provocando sensación de astringencia; también se apreciaron notas metálicas en algunas de estas muestras. El análisis polínico de las mismas indicó la presencia de pólenes de *Salix (*sauce) y Mirtaceae.
Las mieles de trébol cristalizaron naturalmente formando cristales pequeños y medianos, que se disolvían fácilmente en la boca y le otorgaban una sensación cremosa o débilmente arenosa. El olor se percibió como débil-moderado y poco persistente, con una nota frutal-floral. El dulzor, entre moderado y fuerte, con una persistencia moderada. También se percibieron notas aromáticas, frutales, a veces cítricas, y vegetales.
Una pequeña proporción de mieles de trébol pudo clasificarse como monoflorales de alfalfa (*Medicago sativa*), de acuerdo a la Resolución 274/95 (SAGPyA 1995). Las mismas se caracterizaron por formar cristales pequeños y medianos, color ámbar, olor de intensidad débil a moderada con notas frutales y algunas veces cálidas. El aroma se percibió como frutal, floral, de persistencia moderada; pudiéndose encontrar notas vegetales y aromáticas.

En las mieles monoflorales de trébol fue posible apreciar modificaciones en las características sápido aromáticas de acuerdo al tipo de polen que predominaba: si se trataba de *Melilotus* spp., el olor era muy débil y se percibieron aromas frutales y florales; si en cambio el polen mayoritario era *Medicago sativa*, la intensidad del olor se incrementaba y si bien el aroma era frutal, en la mayoría de los casos aparecía también una nota vegetal.

Para los paneles de expertos dedicados al análisis sensorial de mieles, las características olfato gustativas se consideran como propiedades fundamentales; mientras que las táctiles y visuales, que no dependen exclusivamente del origen del producto, sino que están influenciadas por el proceso, son consideradas secundarias (Piana *et al.* 2004). Sin embargo, todas son evaluadas por el consumidor, a la hora de decidir su intención de compra. A partir de lo expuesto, puede observarse mediante un análisis de componentes principales, como se agrupan las mieles de eucalipto y de trébol en dos grupos bien diferenciados en sus características sensoriales.

Los dos primeros Componentes Principales explicaron el 61.7 % de la varianza total de los datos. El primer componente principal, que explicó el 39,9% de la variabilidad total de los datos, está representado por la fluidez a la derecha y por los atributos tamaño y cantidad de cristales y granulosidad hacia la izquierda. La fluidez es el atributo representado por el vector de mayor longitud, indicando el alto grado de variabilidad en este atributo que exhiben las muestras. El segundo componente principal, no mostró una relación clara con un atributo en particular aunque se observa una tendencia a explicar las variaciones de dulzor, olor y persistencia. El mayor número de menciones cualitativas se refiere a notas olorosas (floral, frutal, vegetal, cereal, aromático, alcohólico) seguidas del flavor que incluyen frutal, floral, a fruta madura y medicinal.



E eucalipto, C Trebol (clover); W sauce; Ch Chañar; M Multifloral

Figura 1. Componentes Principales correspondientes a gusto, aroma y color.

CONCLUSIONES

El análisis sensorial es relevante y complementario del análisis polínico para asignarle carácter monofloral a una muestra de miel, tal como indica la legislación internacional. También permite discrimar al menos estos dos tipos monoflorales, a diferencia de los análisis fisicoquímicos que indican grado de calidad y no diferencian por ese origen. Las modificaciones en los atributos sensoriales aportadas presumiblemente por la presencia de néctares de otro origen floral en las mieles que pueden clasificarse como monoflorales de eucalipto según lo indicó el análisis polínico previamente realizado, estarían reforzando el principio establecido por la normativa europea, respecto

a la necesidad de cumplir con las características polínicas, fisicoquímicas y sensoriales correspondientes a su origen, para definirlas como monoflorales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 969.38 Moisture in Honey, Ch. 44, p. 20.

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 962.19 Acidity in Honey, Ch. 44, p. 40.

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 977.20 Separation of Sugars in Honey, Ch.44, p.25.

European Commission. 2002. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities L 10.

Lusardi M, Prado D, Gattuso S. 2005. Contenido Polínico de las Mieles del Sur de la Provincia de Santa Fe (Argentina) Bol. Soc. Argent. Bot. Vol.40 (1-2): 85-90.

Niño MF, Simonetti E. 2005. El análisis de datos desde una perspectiva integradora, Colección Cuadernos de Cátedra, Posadas: Editorial Universitaria de Misiones.

Norma IRAM 20005-1 1996. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de los Evaluadores. Parte 1: Evaluadores seleccionados. Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 20005-2. 1996. Análisis Sensorial - Guía general para la selección, entrenamiento y monitoreo de evaluadores – Parte 2: Expertos, Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15941-2: 1997. Miel - Determinación del color Pfund. Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15932: 1994. Miel - Determinación de Cenizas. Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15934: 1995. Miel - Determinación de Azúcares. Método de Fehling-Causse-Bonnans. Buenos Aires: Editado por Instituto Argentino de Normalización.

Persano Oddo L, Piana ML, Sabatini AG. 1995. Conoscere il miele. Guida all'analisi sensoriale. Bologna: Ed Avenue Media.

Piana M L, Persano Oddo L, Bentabol L, Bruneau E, Bogdanov S, Guyot Declerck D. 2004. Sensory analysis applied to Honey: state of the art Apidologie. 35: S26-S37.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. 1995. Resolución 274/95. Tipificación por origen botánico (Modificación Res. SAGPyA Nº 1051/94), http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola (12/12/08).

Evaluación de un alimento tipo galleta elaborado con harina de maíz (*Zea mays* L.), plátano (*Musa paradisíaca* L.) y garbanzo (*Cicer arietinum)*

Evaluation of cookies produced with maize (*Zea mays* L.) flour, banana (*Musa paradisiacal* L.) and chickpea (*Cicer arietinum)*

Coa María, Belloso Genette, Cabello María, Colivet Julio.

Universidad de Oriente. Núcleo Monagas. Programa de Tecnología de Alimentos. Venezuela.
e-mail: g_belloso@yahoo.com

RESUMEN

Las galletas por su naturaleza son productos alimenticios cuyo consumo encaja preferentemente en el desayuno, la merienda o en pequeñas colaciones, ya que suponen un aporte de energía modulable en unos momentos determinados del día que así lo exigen. Por lo tanto en esta investigación se plantea la elaboración de un alimento tipo galleta elaborado con harina de maíz, plátano y garbanzo, donde se proponen tres formulaciones: la formulación I con 125g de garbanzo + 375g de harina de maíz y plátano 1:1, la formulación II con 250g de harina de garbanzo + 250g de harina de maíz y plátano 1:1 y la formulación III con 375g de harina de garbanzo + 125g de harina de maíz y plátano 1:1 , dichas formulaciones fueron sometidas a una prueba de aceptabilidad por medio de una escala hedónica de nueve puntos con un panel de sesenta consumidores , a la formulación aceptada se le realizaron los análisis físico-químicos y bromatológicos. Los datos de la evaluación sensorial fueron analizados a través de un ANAVA y donde hubo diferencia significativa se aplico una prueba no paramétrica de Duncan al 5%. Para los datos físico-químicos y proximales, se aplico la estadística descriptiva. Los resultados de la evaluación sensorial indicaron que el alimento tipo galleta de mayor preferencia por el panel fue el de tratamiento I (125g de garbanzo + 375g de harina de maíz y plátano 1:1), en el cual se obtuvieron valores de pH de 5,6 ± 0,1791 , acidez titulable 0,1 ± 0, aw 0,4 ± 0,0217, textura 90, 7 ± 0,3458, humedad 2,7 ± 0,1364 g/100 g de galleta, cenizas 1,4 ± 0,0320 g/100 g de galleta, proteína 8,2 ± 0,0864 g/100 g de galleta, grasa 14,7 ± 0,1866 g/100 g de galleta, fibra1,3 ± 0,0901 g/100 g de galleta y carbohidratos 74,46 ± 0,1968g/100 g de galleta. El alimento tipo galleta seleccionado posee una textura blanda semejante a galletas tipo polvorosas. El valor de pH encontrado en el alimento tipo galleta fue de 5,6; tendiendo a la acidez, tiene un contenido graso y de proteínas elevado. De manera general el alimento tipo galleta seleccionado es un alimento con alto valor nutritivo y es buena fuente de energía.

ABSTRACT

Cookies are great for breakfast and for "in-between" meals because they can add small amounts of energy when the body needs it. This study looks at the development of a cookie type of food with corn, plantain, and chickpea flours. Three formulations were developed. Formulation I with 125 g chickpea + 375 g corn flour and platain 1:1; formulation II with 250 g of chickpea + 250 g of corn flour and platain 1:1; and formulation III with 375 g chickpea + 125 g corn flour and platain 1:1. Cookies made with these formulations were subjected to physicochemical analysis and hedonic sensory analysis. The most accepted cookies were those made with formulation I. Cookies made with this formulation had values of: pH 5.6 ± 0.1791, titratable acidity 0.1 ± 0, water activity 0.4 ± 0.0217, texture 90.7 ± 0.34 g, moisture 2.7 ± 0.1364 g/100 g, ash, 1.4 ± 0.0320 g/100 g, protein, 8.2 ± 0.0864 g/100 g, fat 14.7 ± 0.1866 g/100 g, fiber 1.3 ± 0.0901 g/100 and carbohidrates 74.46 ± 0.1968g/100 g. The cookie had a high level of fat and protein as well as a pH of 5.6. The developed cookie is a good source of energy and of good nutrition.

PALABRAS CLAVE: *galleta, maíz, plátano, garbanzo.*

KEYWORDS: *cookie, maize, banana, chickpea.*

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial en el área alimenticia, es una preocupación constante la búsqueda de fuentes alternas de proteínas que puedan ser accesibles a la mayoría de la población, tanto por su valor económico, como por su producción; para contribuir a solventar la problemática de la desnutrición proteica. En Venezuela está planteada la necesidad de elaborar suplementos proteicos que mezclados con fuentes energéticas apropiadas, resulten en raciones completas, eficientes y económicas.

Una de las recomendaciones más importantes para lograr productos de alto valor nutritivo y bajo costo, es el mejoramiento de alimentos de consumo masivo, que por su origen sean deficitarios tal como ocurre con aquellos a base de cereales y tubérculos (pan, fideos, galletas, tortillas, etc.). Éste mejoramiento se puede obtener mediante la complementación de aminoácidos entre las proteínas de esos alimentos y las de otras fuentes disponibles.

Para muchos países en desarrollo, los cereales y las leguminosas de grano constituyen el elemento esencial del régimen alimentario de las poblaciones, sobre todo de las de ingresos más bajos, generalmente rurales. El bajo contenido de aminoácidos azufrados de la proteína de las leguminosas requiere ser complementada con cereales para mejorar el perfil de la proteína dietaria.

Se define como galleta al producto que resulta del tostado de una masa con harina, grasa comestible y agua, azúcares o no, productores aromáticos diversos, sal y otros productos alimenticios (Larrañaga y Carballo 1999). La norma COVENIN 1483-2001 las define como: el producto obtenido de la mezcla de harinas de trigo y/o de otros cereales, con los otros ingredientes y aditivos contemplados en esta norma, relleno o no, cubierto o no y sometido a proceso de horneo y empacado.

Las galletas son productos muy bien aceptado por la población, tanto infantil como adulta, siendo, consumidas preferentes entre las comidas, pero muchas veces remplazando la comida habitual de media tarde. Sus ingredientes son principalmente harinas, azúcar y materias grasas. Dentro de los ingredientes que son utilizados para la elaboración de las galletas y que juegan un rol de gran importancia desde el punto de vista nutricional, se tiene: cereales, leguminosas y frutas.

La composición química de los cereales, en general es bastante homogénea. El componente más abundante en los cereales es el almidón y, de hecho, junto con las legumbres y las patatas son rica fuente de este polisacárido. Sin embargo, su contenido difiere de un cereal a otro. Los lípidos se encuentran en baja cantidad, alrededor del 2-3%, en cuanto al contenido de agua, hay que tener en cuenta que no superan el 14% ya que, en ese caso contrario, el grano se enmohece. Por otro lado el contenido de vitaminas y especialmente en las del grupo B, que son las más abundantes, difiere entre unos cereales y otros (Astiasarán 2000). Los principales cereales utilizados en la alimentación humana son el trigo (*Triticum vulgare)*, el arroz (*Oryza sativa)*, el centeno *(Sécale cereale)*, la avena *(Avena sativa)* y el maíz *(Zea mays).*

El maíz es el alimento básico en muchas partes del mundo, numerosos investigadores a través de los años, han estudiado el valor nutricional del maíz existiendo al respecto cuantiosas publicaciones (Cyted 2003). Este constituye una excelente fuente de hidratos de carbono; posee 13 % de proteínas y 7 % de grasas, el contenido en aminoácidos esenciales y lisina en el maíz así como en todos los cereales es bajo, por lo que la dieta debe complementarse con alimentos proteicos. El triptófano, aminoácido esencial, el cual puede ser convertido por el cuerpo en la vitamina niacina, está presente sólo en pequeñas cantidades. El maíz contiene niacina pero está unida a la hemicelulosa y no puede ser aprovechada por el cuerpo cuando se consume el maíz (Fox y Cameron 2002).

Las leguminosas son ricas en lisina, pero relativamente pobres en metionina. Poseen un bajo contenido en grasas (con la notable excepción de la soja) la cual es insaturada; están libres de colesterol; un alto contenido de fibra, vitaminas y minerales, poseen oligosacáridos en mayor cantidad con respecto a los cereales, siendo los principales sacarosa, estaquiosa y verbascosa (Belitz y Grosch 1997). El garbanzo es rico en proteínas, almidón y en lípidos (más que las otras legumbres) sobre todo de ácido oleico y linoleico, que son insaturados y carentes de colesterol. Además, es un buen aporte de fibra y calorías. Además los garbanzos son una muy buena fuente de fibra, y en cuanto a las vitaminas y minerales, se destaca el elevado contenido de vitamina B1, calcio, fósforo, hierro, potasio y magnesio (Reyes *et al,* 2002).

El plátano representa la cuarta fuente de energía para países en vía de desarrollo después del maíz, arroz y trigo, y debido a su alta concentración de almidón, Son una fuente barata y de fácil producción de energía, así como de vitaminas A, C y B6. Los plátanos son muy ricos en hidratos de carbono por lo cual constituyen una de las mejores maneras de nutrir de energía vegetal nuestro organismo. La

composición química del plátano se caracteriza por la presencia de almidones y por su escasez en ácidos. Debido a su alta concentración de almidón representan una fuente barata y de fácil producción de energía. Son ricos en taninos, por tanto tienen acción astringente. En cuanto a su contenido en vitaminas es rico en piridoxina, ácido ascórbico y vitamina A (Nava 1997).

De todo lo anteriormente expuesto se deriva que en la presente investigación se plantee la evaluación de un alimento tipo galleta elaborado con de harina de maíz (*Zea mays L.*), plátano (*Musa paradisíaca L.)* y garbanzo (*Cicer arietinum*) con el fin de ofrecer al consumidor un producto de consumo masivo y brindar una alternativa novedosa para el consumo de los mismos, tomando en cuenta que las galletas por su naturaleza, son productos alimenticios cuyo consumo encaja preferentemente en el desayuno, la merienda o en pequeñas colaciones (lo que comúnmente denominamos "picar"), ya que suponen un aporte de energía modulable en unos momentos determinados del día que así lo exigen.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Usos Múltiples de Tecnología de los Alimentos y en el Laboratorio de Nutrición y Forraje ubicados en el Campus Los Guaritos de la Universidad de Oriente Núcleo Monagas; el cual consistió en caracterizar galletas elaboradas con harinas de garbanzo (HA), maíz y plátano verde (HB) (**Figura 1** y **2**); en tres formulaciones diferentes: Tratamiento I: 25% HA: 75% HB; Tratamiento II: 50%HA: 50% HB; Tratamiento III: 75% HA: 25% HB. Se evaluó la aceptación sensorial del producto a través de una escala hedónica de 9 puntos, en donde se realizó análisis físicos-químicos: Determinación de pH por potenciómetria (COVENIN 1315-79), Determinación de Acidez Titulable por titulación volumétrica (COVENIN 1787- 81), Determinación de Actividad de Agua (aw) empleando un equipo Aqualab modelo Degacon, Determinación de textura en el texturómetro marca Llyod 500. Determinación de humedad (COVENIN 1553-80), Determinación de grasa (COVENIN 1785-81), Determinación de Proteínas (COVENIN 1195-80), Determinación de fibra Cruda (COVENIN 1789-81), Determinación de Cenizas (COVENIN 1783- 81) y Determinación de carbohidratos (por diferencia) a la formulación de galleta más aceptada sensorialmente.

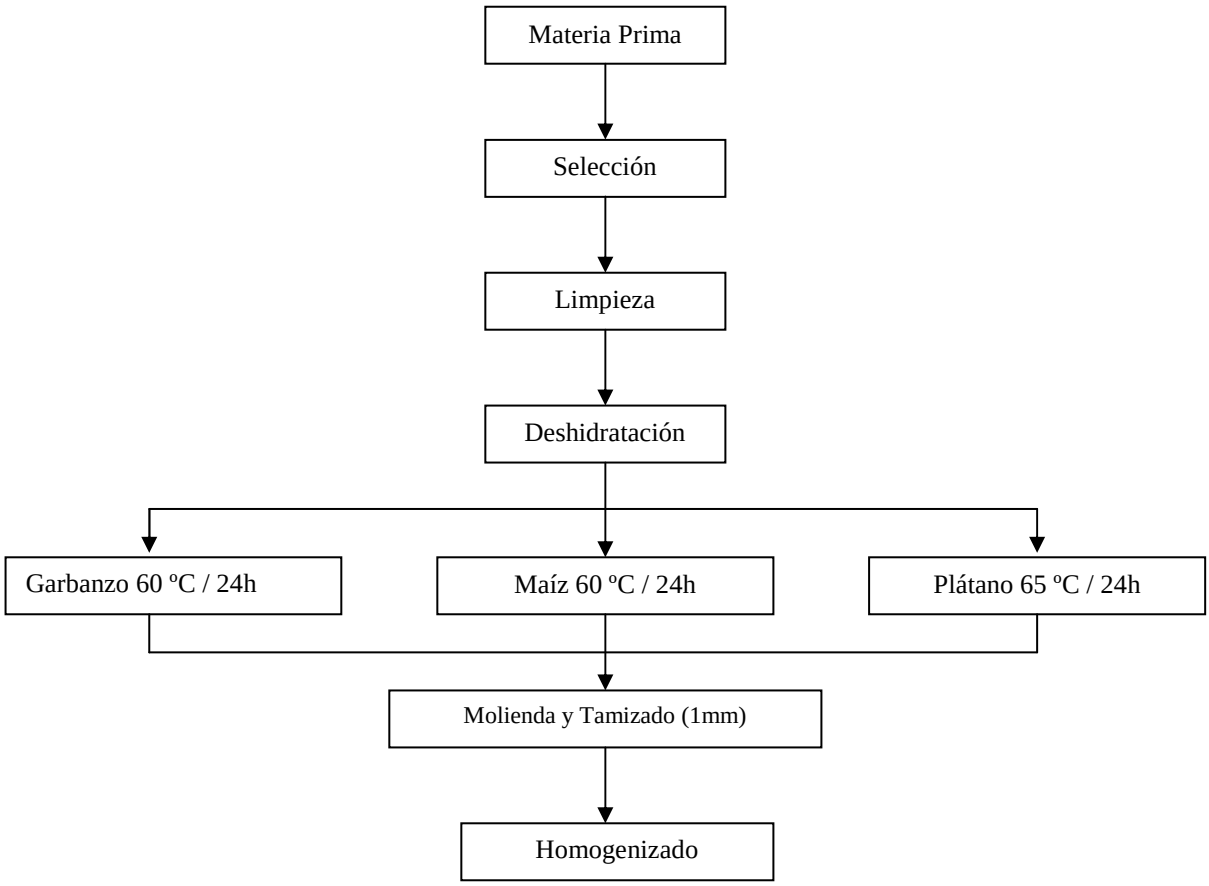
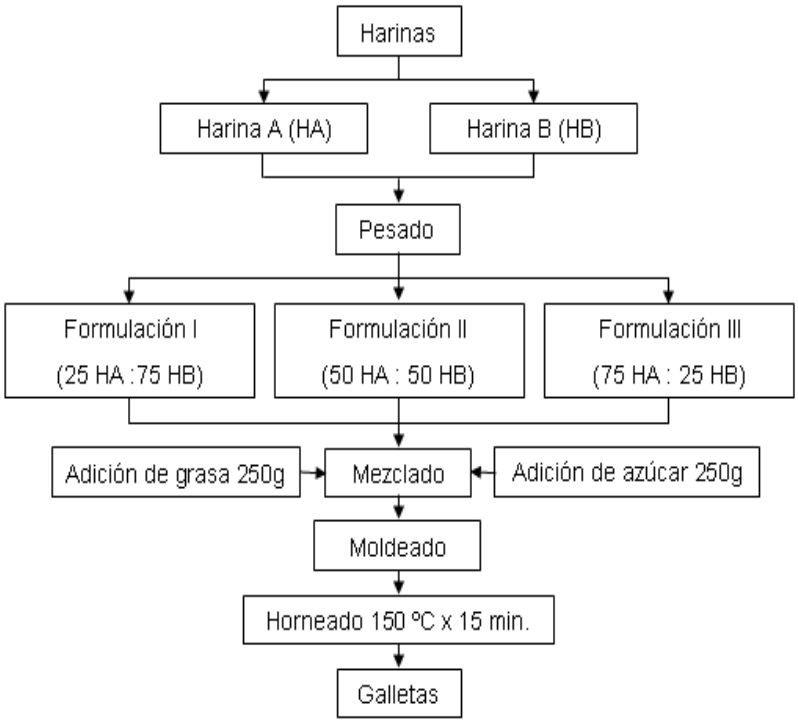


Figura 1. Esquema tecnológico para la obtención de harina para la elaboración de galletas.



Harina A (HA)= harina de garbanzo
Harina B (HB)= harina de maíz y plátano 1:1.

Figura 2. Esquema tecnológico para la obtención de galletas a partir de harina de garbanzo (HA) y harina de maíz-plátano 1:1 (HB)

El análisis estadístico para evaluar la aceptabilidad de las galletas elaboradas a partir de harinas de garbanzo, maíz y plátano verde se realizó a través de un ANAVA no paramétrico de Kruskal Walls al 5 % de probabilidad utilizando un paquete estadístico SAS (2004), y como se encontró diferencias significativa entre los tratamientos se aplicó una prueba de medias no paramétricas de Duncan a un nivel de significancia del 0,05.
Los resultados bromatológicos (proximales y físico-químicos) de la formulación aceptada sensorialmente, se analizaron a través de una estadística descriptiva donde se mostraron los promedios y las desviaciones estándar de la muestra analizada (Steel y Torrie 1992). Esto se realizó utilizando cuatro muestras, con tres repeticiones, de la formulación más aceptada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se muestran los resultados obtenidos de la evaluación sensorial por atributo (color sabor y textura) realizada a las tres formulaciones del alimento tipo galleta elaborado con harina de maíz, plátano, y garbanzo, la cual permitió determinar cual de las formulaciones evaluadas fue la de mayor aceptación entre los panelitas. Los resultados de la prueba no paramétrica de Duncan, indican que el tratamiento de mayor aceptabilidad en cuanto color sabor y textura, fue el número I, que contiene 25% de garbanzo y 75% de plátano y maíz en proporciones iguales (1:1). A esta formulación se le realizaron los análisis proximales, entre ellos: humedad, cenizas, proteína, grasa, fibra, y carbohidratos y los análisis físico-químicos (aw, acidez titulable, pH y textura)**.**
En la **Tabla 2** podemos observar los datos obtenidos de los análisis físico-químicos, dentro de los cuales tenemos el pH y la acidez del alimento con un valor de 5,6 y 0,1 respectivamente, en cuanto al pH cumple con lo establecido por la norma COVENIN(2001), que reporta para galletas dulces un valor de 5.5 como límite mínimo, con respecto al contenido de acidez podemos observar que es un valor aceptable , esto puede deberse al pH próximo a la alcalinidad encontrado en el alimento que de una u otra forma está relacionado con el contenido de acidez, Quaglia (1991), señala que desde el punto de vista químico, el pH y la acidez tienen mucha relación entre si, a medida que el primero aumenta el último disminuye.

Tabla 1. Promedios obtenidos en la prueba no paramétrica de Duncan al 5%, proveniente de la evaluación sensorial por atributos (color, sabor y textura) realizada a las tres formulaciones del alimento tipo galletas elaborado con harina de maíz, plátano y garbanzo.

FORMULACIONES	N	ATRIBUTO		
		COLOR (x)	SABOR (x)	TEXTURA (x)
1	60	6,5117**a**	6,0667**a**	6,3000**a**
2	60	5,0000**b**	4,3500**b**	4,8500**b**
3	60	4,5167**c**	4,5833**c**	4,9833**b**

N: número de observaciones
(X): rango de medias o promedio

Tabla 2. Valores promedio obtenidos para cada uno de los análisis físico-químicos realizados al alimento tipo galleta seleccionado.

Componente	N	Promedio ± ESM
pH	12	5,6 ± 0,1791
Acidez	12	0,1 ± 0
Textura	12	90, 7 ± 0,3458
Aw	12	0,4 ± 0,0217

N: número de observaciones
(X): rango de medias o promedio

Con respecto a la textura del alimento podemos observar un valor de 90,7; lo que nos indica que el producto tiene una consistencia blanda semejante a la de los polvorines, esto puede deberse a la composición de la galleta la cual en su estructura no contiene gluten el cual ayuda a que el producto tenga mayor resistencia (Hoseney 1991).

En la misma **Tabla 2** podemos observar el porcentaje de actividad de agua, el cual es de 0,4, este valor se encuentra por encima de lo establecido por las fichas técnicas de AQUALAB (2007), que reporta para galletas dulces un valor de 0,3, sin embargo por otra parte señala que para una actividad de agua de 0,4 no se produce proliferación microbiana, de esta forma podemos mencionar que el producto elaborado en este trabajo, tomando en cuenta este parámetro (aw), permite un control del crecimiento microbiano, por lo que se puede inferir que correspondería a un alimento inocuo. Según Ponce (2005), cuanto más cercano a cero es el valor de aw menos disponible esta el agua para las bacterias y mayor tiempo durara el alimento sin deteriorarse.

Los resultados obtenidos de los análisis proximales de la formulación seleccionada del alimento tipo galleta elaborado con harina de maíz *(Zeas mays L)* plátano *(Musa paradisíaca L)* y garbanzo (*Cicer arietinum)* se muestran en la **Tabla 3**. Se puede observar que el contenido de humedad encontrado en el alimento tipo galleta es de 2,7. Este valor está por debajo de lo que establece el Instituto Nacional de Nutrición (2002), el cual señala que para galletas dulces el contenido de humedad es de 4,5. De igual forma el porcentaje de humedad hallado (2,7) en este producto cumple con lo establecido por la norma COVENIN (2001), pues este señala que el límite máximo es de 5,0.

Tabla 3. Valores promedios obtenidos para cada uno de los análisis proximales (g Base seca/100 g de galleta) del alimento tipo galleta elaborado con harina de maíz, plátano y garbanzo seleccionado por los panelistas.

COMPONENTE	N	PROMEDIO ± ESM	INN
HUMEDAD	12	2,7 ± 0,1364	4,5
CENIZAS	12	1,4 ± 0,0320	1,5
PROTEINAS	12	8,2 ± 0,0864	7,7
GRASA	12	14,7 ± 0,1866	9,2
FIBRA	12	1,3 ± 0,0901	--
CARBOHIDRATOS	12	74,46 ± 0,1968	77,1

N: número de observaciones
(X): rango de medias o promedio

Con respecto al contenido de cenizas el porcentaje encontrado fue de 1,4 este se encuentra ligeramente por debajo de lo que reporta el Instituto Nacional de Nutrición (2002), el cual señala que para este tipo de producto es de 1,5. Este bajo valor puede deberse a la perdida de cenizas por volatilización. Según Pearson (1993), las cenizas obtenidas no tienen necesariamente la misma composición que la materia mineral presente en el alimento original, ya que puede haber pérdidas por volatilización o alguna interacción entre los constituyentes. Esta pudo ser una de las razones principales por la que hubo esta disminución de cenizas en el alimento.

En cuanto al contenido de proteína se encontró que el alimento arrojo un valor de 8,2%, este último está por encima de lo que reglamenta el Instituto Nacional de Nutrición (2002), el cual señala que para galletas dulces el porcentaje debe ser de 7,7. Este incremento es debido a la combinación del cereal, la leguminosa y la fruta. Este producto alimenticio al tener esta mezcla garantiza una buena cantidad de aminoácidos esenciales, pues Muller y Tobin (1994), señalan que la mayoría de las leguminosas son pobres en aminoácidos sulfurados pero ricos en lisina, mientras que los cereales son pobres en lisina aunque la mayor parte de ellos poseen niveles adecuados de aminoácidos sulfurados. Por consiguiente, cada uno de ellos suplementa la deficiencia del otro.

En la misma **Tabla 3** se aprecia el porcentaje de grasa del alimento tipo galleta, el cual es de 14,7 este al ser comparado con lo establecido por el INN(2002) se encuentra por encima de lo que este recomienda (9,2), esto puede ser debido a la cantidad utilizada de margarina, así como también al contenido de grasa que pudo aportar el germen del maíz, pues es allí donde se encuentra la mayor cantidad de aceite, que tiene dentro de su composición otros nutrientes de gran importancia. Según la revista Cyted (2007) el germen es la fracción del maíz que contiene casi todas las vitaminas liposolubles tales como D, E; K.

El contenido de fibra encontrado en el alimento fue de 1,3, el cual es mayor al ser comparado con el reportado por Velasquez (2008) en galletas elaboradas con trigo (*Triticum aestivum*), avena (*avena Sativa)* y yuca (*Manihot sculenta*) que contienen un valor de 0,88. Este valor encontrado en el alimento es debido al contenido de fibra que poseen cada uno de los ingredientes utilizados (garbanzo, maíz y plátano) que aportan una cantidad considerable de este nutriente capaz de aumentar el porcentaje de fibra en el alimento elaborado.

El contenido de carbohidratos totales presentes en el alimento tipo galleta (74,46) es relativamente bajo con respecto al reportado por el INN (2002), el cual señala para galletas dulces un valor de 77,1. Este valor de carbohidratos encontrados en el alimento pudo deberse al uso de las harinas obtenidas con rendimiento de molienda elevada el cual aumenta otros nutrientes y disminuye los glúcidos. Quaglia (1991), señala que durante la molienda la composición química de las harinas difiere en cuanto a sus componentes de acuerdo a los diferentes rendimientos de extracción “La harina obtenida con rendimiento de molienda más elevado presenta un más alto contenido de proteínas, en lípidos, calcio, fósforo, hierro, vitaminas y una menor proporción en glúcidos”.

CONCLUSIONES

El panel evaluador escogió el tratamiento uno, 25% harina de garbanzo,75% harina de maíz y plátano, como el más aceptado entre los alimentos tipo galleta evaluados.

El alimento tipo galleta seleccionado posee una textura blanda semejante a las galletas polvorosas.

El valor de pH encontrado en el alimento tipo galleta fue de 5,6; tendiendo a la acidez.

El alimento tipo galleta tiene un contenido graso y de proteínas elevado.

De manera general el alimento tipo galleta seleccionado es un alimento con alto valor nutritivo y es buena fuente de energía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROCHA, P.1997. Introducción a la evaluación sensorial de los alimentos. Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar, Universidad de Oriente. Boca de Río, Venezuela. Pág.221.

AQUALAB. 2006. Actividad de agua en alimentos. Fichas técnicas. [Documento en línea]. Disponible en: http:/www.aqualab.com [consulta: 10/03/2008]

ASTIASARÁN, I. y MARTÍNEZ, J. 2000. Alimentos Composición y Propiedades. McGraw - Interamericana. Pág. 364.

BELIZT, H. y GROSCH W. 1997 Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza. España. Pág. 813.
CASTRO E. 1993, "Reología", Monografías sobre Ingeniería en Alimentos, Nº 11. Depto. De Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas. Universidad de Chile.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1979. Alimentos Determinación del pH. Norma Venezolana 1315. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1980. Alimentos. Determinación de Nitrógeno. Método de Kjeldahl. Norma Venezolana 1195. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1980. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Humedad. Norma Venezolana 1553. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1981. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Cenizas. Norma Venezolana 1783. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1981. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Grasa. Norma Venezolana 1785. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1981. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Acidez. Norma Venezolana1787. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1981. Productos de Cereales y Leguminosas. Determinación de Fibra Cruda. Norma Venezolana 1789. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

COVENIN. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 2001. Galletas. Norma Venezolana 14783. Fondonorma. Caracas. Venezuela.

CYTED. CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO. 2003. Efecto del procesamiento sobre la calidad nutricional de los alimentos. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela. Pág.210.

PONCE, E. 2005. Actividad de agua. [Documento en línea]. Disponible:http://www.Lab-Ferrer.com. [Consulta: 18/03/2007].

FOX, B. y CAMERON, A. 2002. Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Salud. Limusa. México. México. Pág.455.

GARCÍA, A. 2006. El plátano. Documento en línea]. Disponible: http://www.baobabs.com/platano.htm. [Consulta: 15/07/2006].

HOSENEY, R. 1991. "Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales". Acribia, España. Pág. 320.

INN. INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN. 2002. Tabla de Composición de Alimentos para Uso Práctico. Ministerio de sanidad y asistencia social. Caracas. Venezuela.

LARRAÑAGA, I. y CARBALLO, J. 1999. Control e higiene de los Alimentos. McGraw-Hill. Madrid. España. Pág. 544.

MACKEY, A; MÁRQUEZ, I y SOSA, M. 1984. Evaluación Sensorial de los Alimentos. 2º. ed. CIEPE. San Felipe. Venezuela. Pág.136.

MULLER, H. y TOBIN, G. 1986. Nutrición y ciencia de los alimentos. Acribia, España. Pág. 321.

MURILLO, O. 2002. Ficha Técnica de Industrialización de Plátano (*Mussa spp*). [Documento en línea]. Disponible en: http: //www.mercanet.cnp.go.cr/Desarrollo_Agroid/documentospdf/Pl%C3%A1tano_FTP.pdf. [Consulta: 12/ 05/ 07].

NAVA, C. 1997. El Plátano. Su Cultivo en Venezuela. Astro Data S.A. Maracaibo. Venezuela. Pág.194.

VELASQUEZ E. 2008. Evaluación de parámetros nutricionales en galletas elaboradas a base de trigo (*Triticum aestivum*) avena *(Avena sativa*) y yuca (*Manihot sculenta*). Trabajo de grado. Universidad de Oriente. Núcleo Monagas. Venezuela. Pág.58.

NICOLÁS, J.; RODRÍGUEZ, J.; ORBEA, M. y PUNTIERI, M. 2004. Desarrollo de Harinas Compuestas Precocidas por Extrusión y su Aplicación en Planes Alimentarios. [Documento en Línea] Disponible en: http://www4.inti.gov.ar/GD/5jornadas/doc/54.doc [Consulta: 10/05/2007].

PEARSON, D. 1993. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Alimentos**.** Acribia, Zaragoza España.

QUAGLIA, Giovanni. 1991. Ciencia y tecnología de la panificación. Acribia. Zaragoza. España. Pág. 748.

REYES, C.; MILLAN, J.; ROUZAUD O.; GARZÓN J. y MORA R. 2002. Descascarillado/Suavización/Extrusión (DSE): Alternativa tecnológica para mejorar la calidad nutricional del garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Agrociencia.36:181-189.

RODRIGES, N y ZULIAGA, J. 1999. Cultivo de Fluerutus Tuelnonarius en la pulpa de café. Cenicafé. 45 (3): 81.

SÁNCHEZ, L. 1989. Técnicas de Evaluación Sensorial de Productos. Graphittec. Caracas. Venezuela. Pág.526.

SANGRONIS, E; MACHADO, C y CAVA, R. 2004.Propiedades funcionales de las harinas de leguminosas (*Phaseolus vulgaris y Cajan cajan*) germinadas. INCI. 298(002): 81- 88.

SAS. STADISTICAL ANALISIS SISTEM INSTITUTE, Inc. 2004. SAS User's Guide: Stadist. SAS System Versión 6p2. Cary Nc. USA.

STEELL, R. y TORRIE, J. 1992. Bioestadística. Principios y Procedimientos. 2ª ed. McGraw-Hill. México D.F. Pág.622.

Caracterización reológica de masas aditivadas con celulosas modificadas y pectinas

Rheological characterization of dough supplemented with modified celluloses and pectins

Correa, M.J (1), Pérez, G (2), Añon, M.C (1), Ferrero, C. (1)

(1) CIDCA - Fac.Ciencias Exactas-UNLP- CCT La Plata (CONICET) 47 Y 116 (1900) La Plata -(2) CONICET - Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
mjcorrea@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se estudió el efecto producido por la utilización de celulosas modificadas y pectinas sobre las características reológicas de la masa obtenida a partir de harina de trigo 000. Fueron realizados métodos reológicos empíricos, ensayos farinográficos y análisis de perfil de textura, y fundamentales, ensayo oscilatorio dinámico. Las celulosas modificadas empleadas fueron: celulosa microcristalina (MCC), carboximetilcelulosa (CMC) y dos tipos de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) con distinto grado de sustitución de grupos metoxilo e hidroxipropilo, en cuanto a las pectinas se emplearon dos tipos: una de alto grado de esterificación: 69% (GP 105) y otra de bajo grado de esterificación y amidada (GP 8001). Los niveles de hidrocoloide empleados en los farinogramas fueron: 0%, 0,25%, 0,50%, 1,0%, 1,5% y 2,0%. Las mezclas harina-hidrocoloide se prepararon con y sin agregado de sal. A partir de los farinogramas se determinaron: la absorción de agua, el tiempo de desarrollo y la estabilidad. El agregado de los hidrocoloides ocasionó un aumento de la absorción farinográfica de agua, encontrándose los máximos valores de A en las masas con agregado de HPMC. En general las masas sin sal mostraron mayores valores de A que las masas con sal. Asimismo, se encontró una relación lineal entre el incremento porcentual de agua y la concentración de hidrocoloide empleado. El tiempo de desarrollo no se modificó sustancialmente al utilizar pectinas pero si se incrementó significativamente con las celulosas modificadas, en particular con el agregado de CMC. En la estabilidad de las masas con agregado de CMC y HPMC se observó un comportamiento diferencial las mismas ante la ausencia o presencia de sal. La utilización de MCC no modificó la estabilidad, mientras que las pectinas provocaron una disminución de la misma. En base a los resultados de los farinogramas se eligieron 2 niveles de hidrocoloide para realizar los ensayos de perfil de textura y reometría. Debido a que en las masas con CMC y HPMC se observó un efecto debido a la presencia o no de sal, para estos hidrocoloides se realizaron los ensayos también en masas sin sal. En el ensayo de perfil de textura (TPA) la presencia de los hidrocoloides ocasionó un ablandamiento de la masa en todos los casos, siendo este efecto mayor en las masas sin sal. La consistencia de la masa disminuyó mientras que la cohesividad aumentó en el mayor nivel estudiado en las masas con sal. En los ensayos oscilatorios dinámicos en todas las frecuencias estudiadas el módulo elástico superó al módulo viscoso. Al comparar las masas aditivadas con las masas control, se observó una disminución de los módulos elástico, viscoso y complejo en la mayor parte de las masas aditivadas y un incremento de la tg (δ). Los resultados indican que el agregado de hidrocoloides a la masa provoca un cambio en el comportamiento reológico de la misma, dependiendo este efecto no sólo de los componentes de la harina y de la estructura química y concentración de los hidrocoloides empleados sino también de otros componentes de la masa como puede ser la sal.

ABSTRACT

The effect of modified celluloses and pectins on dough rheological characteristics was studied. Empirical (farinographic assay and texture profile analysis) and fundamental (dynamic oscillatory test) rheological tests were employed. The hydrocolloids employed were: microcrystalline cellulose (MCC), carboxymethyl cellulose (CMC), two different types of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC F 4M and HPMC F 50) and two different types of pectins: high-methoxylated pectin (GP 105, degree of esterification=69%) and amidated low-methoxylated pectin (GP 8001).The hydrocolloid

levels used for farinographic assays were 0% , 0.25%, 0.50%, 1.0%, 1.5% and 2.0%. Farinographs were performed on mixtures of flour and hydrocolloid, without and with NaCl (2 g/ 100 g flour). The parameters determined were: Water absorption, development time and dough stability. Farinographic water absorption increased when hydrocolloids were incorporated, higher values were obtained in mixtures without NaCl. A linear relationship between the percentage increment in water absorption and the hydrocolloid level was observed within the assayed range of concentrations. The higher absorptions were observed when the two types of HPMC were used. The development time was not significantly modified when pectins were added but it significantly increased when modified celluloses were used, particularly when CMC was added. CMC and HPMC affected dough stability in a different way depending on the presence or absence of salt. The stability was not modified when MCC was used whereas it was diminished when pectins were added. According to these results, two hydrocolloids levels were chosen to perform the texture profile analysis and the rheometric assays. Since it was found a differential effect of CMC and HPMC when salt was present or not, the reometric and textural assays were performed in dough with and without salt. The texture profile analysis showed that hydrocolloids addition softened the dough and their effect was greater in dough without salt. Dough consistency was lower when hydrocolloids were present whereas the cohesiveness was higher in doughs with salt at the maximum level of hydrocolloid assayed. By dynamic oscillatory tests it was found that the elastic modulus was always greater than the viscous modulus at all the frequencies studied. The elastic, viscous and complex moduli were lower in doughs with hydrocolloids while the values for tg (δ) were higher than in control dough.
These results showed that hydrocolloids did modify the rheological behaviour of dough but their effect depended not only on flour components, chemical structure and concentration of hydrocolloid but also on the presence of other components like salt.

PALABRAS CLAVE: *hidrocoloide, masa, reometría, textura.*

KEYWORDS: *hydrocolloid, dough, reometry, texture.*

INTRODUCCIÓN

Cuando las proteínas del gluten presentes en la harina de trigo se ponen en contacto con agua y se les aplica un trabajo mecánico se forma una red elástica y extensible. Este material de características viscoelásticas, con un comportamiento intermedio entre un sólido elástico y un líquido viscoso, es lo que confiere las propiedades reológicas únicas a la masa. Estas propiedades reológicas son un factor esencial en la determinación de la calidad panadera, por lo que es importante su estudio.
Los ensayos reológicos que tradicionalmente se han utilizado para evaluar la calidad panadera de una harina son de tipo empírico (farinograma, alveograma, extensograma, mixograma), donde la masa es sometida a grandes deformaciones. Estos ensayos son útiles para evaluar el comportamiento durante el procesamiento.
Más recientemente se han incorporado los ensayos fundamentales, de pequeñas deformaciones, como los dinámicos oscilatorios, que permiten evaluar separadamente el comportamiento elástico y viscoso de un material como la masa, a través de la obtención de distintos parámetros que caracterizan al material, como los módulos dinámicos, la tangente del ángulo de desfasaje, viscosidad compleja, entre otros.
La reología de la masa está determinada por la red de gluten, cantidad de agua, interacción entre los distintos componentes ya sean los naturalmente presentes en la harina (proteína, almidón, lípidos, fibra) o los incorporados para obtener una determinada formulación. Como parte de estas formulaciones y para mejorar la aptitud de las masas de harina de trigo de inferior calidad panadera se emplean aditivos de diversa estructura química (oxidantes, enzimas, emulsificantes, hidrocoloides). Los hidrocoloides son polisacáridos de alto PM, obtenidos de diversas fuentes (semillas, algas, exudados de plantas, microbianos, etc.) que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como espesantes y gelificantes, aunque está menos extendido su uso en masa panaria. Entre estos polisacáridos se encuentran las celulosas modificadas (microcristalina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa) que son modificaciones químicas de las celulosas naturales, que de este modo adquieren propiedades distintas a las de la celulosa sin modificar (por ejemplo, aumento de la solubilidad). La celulosa microcristalina se obtiene por ataque (ruptura) de las fibrillas de celulosas

liberándose partículas que pueden formar una dispersión; la carboximetilcelulosa es una celulosa sustituida por grupos carboximetilo lo que le confiere carga negativa mientras que las hidroxipropilmetilcelulosas son celulosas sustituidas por hidroxipropilo y metilo que les confieren un cierto grado de hidrofobicidad respecto a otros hidrocoloides. Estas celulosas son, por este motivo, capaces de gelificar al aumentarse la temperatura (Glicksman 1982). Cada una de estas celulosas tiene, debido a su diferente estructura química un diferente comportamiento por lo que su incorporación en la masa panaria haría esperable un efecto distinto sobre la aptitud panadera, y en particular sobre las propiedades reológicas de la masa. Otros polisacáridos muy utilizados en la industria alimentaria son las pectinas. Las pectinas son poligalacturonanos de diverso grado de esterificación (alto, bajo metoxilo). Esta característica estructural incide en su funcionalidad: una baja metoxilación permite la interacción con cationes divalentes, como el calcio, formando geles cuyas zonas de unión están estabilizadas químicamente. Mientras que las pectinas de alto grado de esterificación gelifican en otras condiciones: medios ácidos y con alto contenido de azucares. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto producido en las características reológicas de la masa de harina de trigo por el agregado de celulosas modificadas y pectinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la preparación de las masas se utilizó harina de trigo comercial 000 (Código Alimentario Argentino) provista por el Molino Campodónico S.A. (La Plata, Argentina). La harina utilizada presentó la siguiente composición: proteínas, 11,43 % (determinadas por Kjeldhal, factor=5.7); humedad, 14,23%; gluten húmedo, 33,2% y gluten seco, 11,0% (relación gluten húmedo/ gluten seco = 3). Los parámetros alveográficos fueron los siguientes: P = 96 mm H_2O, L = 93 mm, W = 326.10^{-4} J y el valor del Falling Number (FN) fue de 486 segundos.

Los hidrocoloides de grado alimentario empleados fueron: celulosa microcristalina (MCC, FMC Biopolymer, Filadelfia), carboximetilcelulosa (CMC, Latinoquímica Amtex S.A, Argentina), dos tipos de hidroxipropilmetilceluosa (HPMC, Dow Chemical Company, USA) : HPMC F 4 M (29,3% de sustitución de grupos metoxilo y 6,0% de grupos hidroxipropilo) y HPMC F 50 (28,6% de sustitución de grupos metoxilo y 5,4% de grupos hidroxipropilo) y dos tipos de pectinas (CP Kelco,USA): una de bajo grado de esterificación y amidada (GP 8001) y otra de alto grado de esterificación, 69%, (GP 105).

En todos los casos se utilizó agua destilada y NaCl comercial para preparar las masas.

Ensayos farinográficos

Se realizaron los farinogramas de las mezclas de harina de trigo 000 - hidrocoloide sin sal y con sal incorporada a la mezcla (2%). Los niveles empleados para las celulosas modificadas fueron 0,25%, 0,5%, 1,0% y 1,5%, las pectinas se utilizaron en estos niveles y al 2,0%. Se empleó un equipo Brabender de 300 g (Duisburg, Germany) y el ensayo se realizó de acuerdo al método 54-21 (AACC 1995). A partir de los farinogramas se determinaron la absorción farinográfica de agua (A), el tiempo de desarrollo (td) y la estabilidad. La absorción farinográfica se define como el porcentaje de agua necesario para alcanzar una consistencia de 500 Unidades de Brabender (UB); td es el tiempo necesario (min) para alcanzar una consistencia de la masa de 500 UB y la estabilidad se define como el tiempo (min) durante el cual la consistencia de la masa permanece a 500 UB.

Ensayos de perfil de textura (TPA) y reometría

Formulación de la masa. Se utilizaron las siguientes proporciones: harina 100 g, celulosas modificadas, 0,5 % y 1,5%, pectinas, 0,5% y 2%, agua destilada según absorción farinográfica. En los casos que se empleó sal, esta se utilizó en una concentración de 2%.

Preparación de la masa: los ingredientes fueron mezclados en seco durante un minuto. Luego se agregó el agua y se amasó cada mezcla su tiempo de desarrollo farinográfico. La masa fue laminada y se dejó reposar durante 15 minutos. A partir de esta masa se obtuvieron las muestras para los ensayos de perfil de textura y oscilatorios dinámicos.

Análisis de perfil de textura (TPA). Se cortaron piezas cilíndricas de masa de 3 cm de diámetro y 1 cm de espesor para la realización de un ensayo de compresión de dos ciclos utilizando un texturómetro TA-XT2i (STABLE MICRO SYSTEMS, Surrey, U.K.). La masa se sometió a dos ciclos de compresión hasta un 40 % de la altura original con una sonda cilíndrica de 7.5 cm de diámetro. Se

obtuvieron curvas de fuerza en función del tiempo a una velocidad de 0.5 mm/s. Los parámetros determinados fueron dureza, cohesividad y consistencia de la masa. La dureza de la masa se calculó como la máxima fuerza registrada durante el primer ciclo de compresión, la cohesividad como el cociente entre el área positiva del segundo ciclo y el área positiva del primer ciclo y la consistencia se calculó como la suma de las áreas del primer y segundo pico.

Ensayos en reómetro oscilatorio

A partir de la masa laminada se cortaron piezas cilíndricas de 3 cm de diámetro y 2 mm de espesor, las cuales se mantuvieron refrigeradas hasta 10 minutos antes de realizar la medida.

Los ensayos oscilatorios se realizaron en un reómetro oscilatorio de esfuerzo controlado Haake RS 600 (Haake, Germany) a 25 ºC utilizando como sensor un sistema plato – plato de superficie rugosa con una separación entre los mismos de 1,5 mm. Para evitar la pérdida de humedad por parte de la muestra durante el ensayo se recubrieron los bordes con vaselina sólida.

Se realizaron barridos de deformación entre 0,5 y 200 Pa a una frecuencia de 1 Hz para determinar el rango de viscoelasticidad lineal de las muestras. A partir del mismo se definió un valor de deformación para realizar los barridos de frecuencia, los cuales fueron realizados entre 0,005 y 100 Hz a una deformación constante de 5 Pa. En ambos ensayos antes de realizar las mediciones las muestras se dejaron reposar durante 15 minutos entre los platos para que relajaran. Los parámetros determinados fueron los módulos complejo (G*), elástico (G‘), viscoso (G“) y la tg (δ), siendo δ el ángulo de desfasaje.

El módulo elástico o de almacenamiento se relaciona con la respuesta del material como un sólido mientras que el módulo viscoso o de pérdida, se relaciona con la respuesta del material como un fluido. El módulo complejo se define como la raíz cuadrada de la suma cuadrática de G´ y G´´ y es una medida de la resistencia total del material a la deformación mientras que la tg (δ) = G”/G’, refleja la relación entre la viscosidad y la elasticidad de la muestra. (Steffe 1992)

Estadística

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas entre las muestras se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias por el test de Bonferroni (nivel de confianza del 95%). El programa empleado fue Stat Graphics Plus 4.0.

Todos los ensayos fueron realizados al menos por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las gomas incrementaron la absorción farinográfica de agua, habiéndose alcanzado los máximos valores con las HPMC. Esta tendencia se observó en las mezclas con y sin sal (**Figura 1 a** y **b**). Entre las HPMC, fue HPMC F 4M la que presentó el máximo valor de A, lo cual indica que aunque el grado de sustitución de ambas HPMC es ligeramente diferente es suficiente para provocar un cambio en el comportamiento de las mismas. El incremento porcentual de agua respecto al control siguió una relación lineal con la concentración de hidrocoloide empleada. En las masas sin agregado de sal los valores de A alcanzados fueron mayores que los correspondientes a las masas con sal. El tiempo de desarrollo se incrementó con la utilización de las celulosas modificadas tanto en presencia como en ausencia de sal (datos no mostrados). El máximo tiempo de desarrollo se observó con el agregado de CMC a la masa. En la mayoría de los niveles empleados las pectinas no modificaron el tiempo de desarrollo. La estabilidad de la masa en presencia de sal no se vio afectada por el agregado de CMC mientras que las HPMC provocaron una disminución de la misma (**Figura 2a**). En ausencia de sal se apreció un comportamiento inverso, las HPMC no modificaron la estabilidad farinográfica mientras que CMC provocó su disminución (**Figura 2b**). Este comportamiento estaría indicando que la presencia de sal influye en las interacciones que se pueden establecer entre los componentes de la masa. Dado que CMC y HPMC presentan una muy diferente estructura química, CMC es un polisacárido aniónico mientras que HPMC es una molécula hidrofobica (Gliksman 1982), es de esperar que intervengan en diferente tipo de interacciones. La presencia de sal refuerza la estructura de las moléculas de agua lo cual favorece el establecimiento de interacciones hidrofóbicas (Kinsella *et al*. 1984). En presencia de sal las HPMC, al ser las más hidrofóbicas, podrían interactuar con las proteínas de la red de gluten dando lugar a una red menos estable (Rosell *et al*. 2007). A su vez las cargas de CMC podrían ser apantalladas por la sal. En ausencia de sal, no ocurriría el apantallamiento, se favorecería la interacción del gluten con moléculas cargadas como CMC dando lugar a una red más

débil por lo que soporta menos el trabajo mecánico. MCC no modificó la estabilidad de la masa en ninguna de las concentraciones utilizadas, mientras que las pectinas tienden a disminuirla; esto ocurre tanto en presencia como ausencia de sal. Esto estaría en acuerdo con los resultados encontrados por Ribotta *et al*. (2005), quienes encontraron que es posible el establecimiento de complejos hidrofílicos entre las proteínas del gluten y los grupos carboxilo de las pectinas.

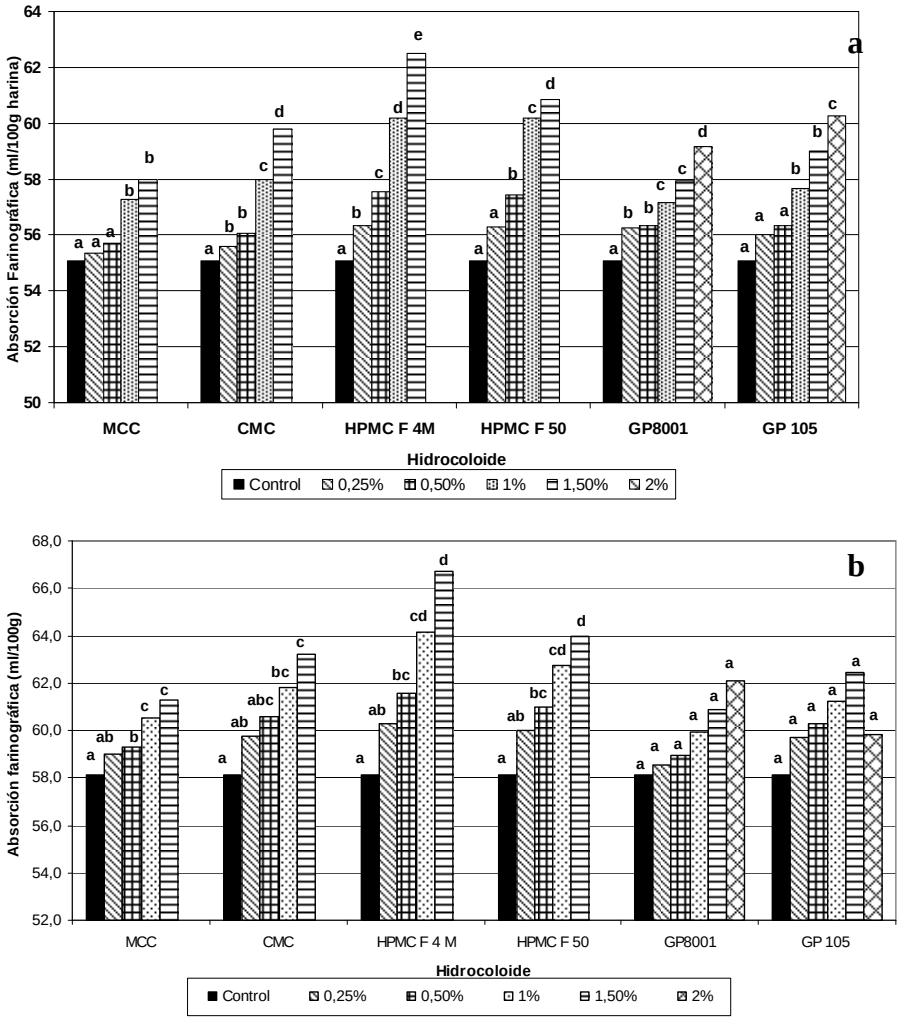
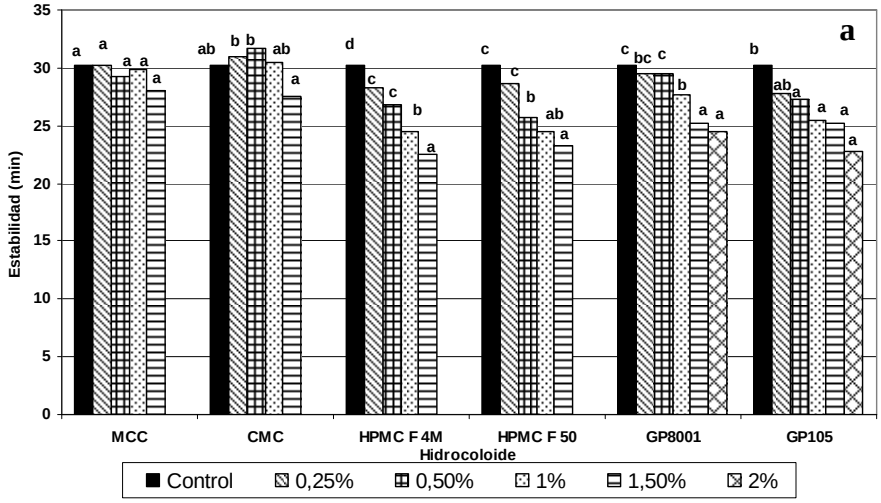


Figura 1. Absorción farinográfica de agua de las mezclas harina – hidrocoloide. a) con sal 2% b) sin agregado de sal.



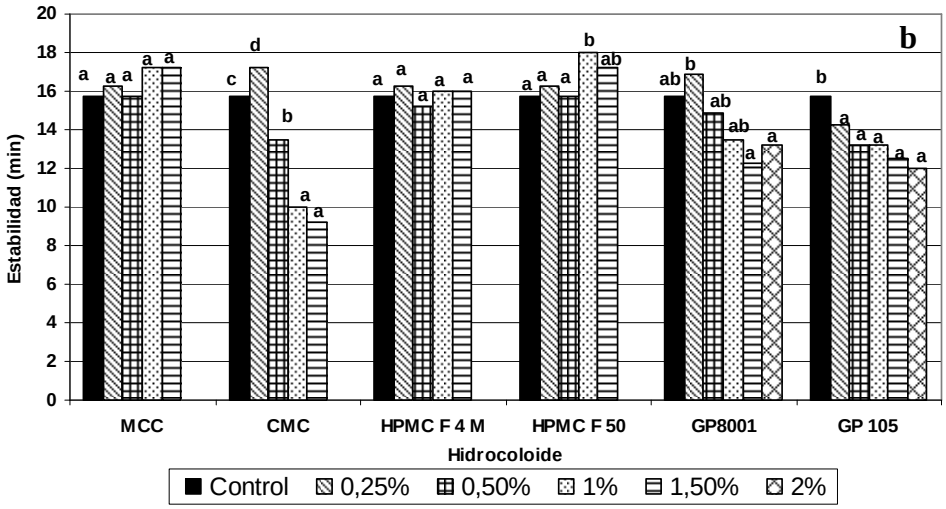


Figura 2. Estabilidad farinográfica de las mezclas harina – hidrocoloide. a) con sal 2% b) sin agregado de sal.

En el ensayo de perfil de textura se observó que el agregado de los hidrocoloides a la masa ocasionó un ablandamiento de la misma (**Figura 3a**, **b** y **c**). Este efecto fue menos marcado al utilizar MCC. En las masas sin sal la disminución porcentual de la dureza respecto al control es menor que en las masas con sal. En todos los casos estudiados, las masas sin agregado de sal son más blandas que las masas con sal.

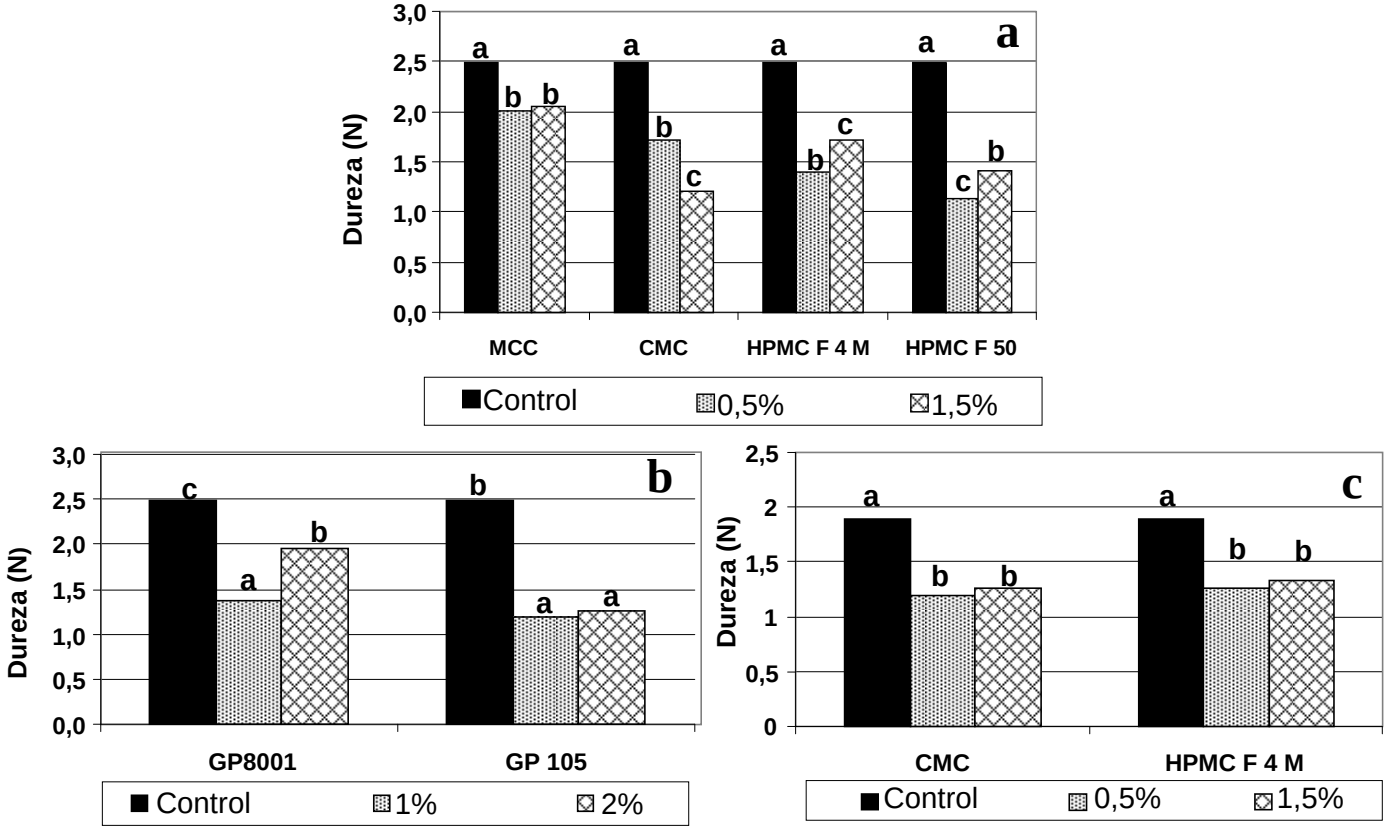


Figura 3. Se muestra la dureza obtenida en el TPA. a) masas con sal aditivadas con celulosas modificadas b) masas con sal aditivadas con pectinas c) masas sin sal aditivadas con CMC y HPMC.

La consistencia de las masas con agregado de hidrocoloide fue menor que para las masas control aunque no se observó efecto del nivel de hidrocoloide empleado (**Figura 4a**, **b** y **c**). MCC es la que produce menor caída de la consistencia. En ausencia de sal también se observa una disminución de la

consistencia pero ésta tiende a aumentar con el nivel de hidrocoloide empleado. En las masas con sal se observa un aumento de la cohesividad de la masa con el agregado de hidrocoloide (**Figura 5a** y **b**). En el nivel más alto se observan diferencias significativas respecto al control en todos los casos excepto con HPMC F 50. En las masas sin sal, HPMC F 4 M al 1,5% provocó un aumento de la cohesividad mientras que CMC al 1.5% provoca una disminución da la misma (**Figura 5c**). La cohesividad se relaciona con el trabajo necesario para vencer las uniones del material (Pilosof 2000).Una masa de mayor cohesividad estaría indicando que estamos ante una matriz en la cual sus componentes se encuentran interactuando más fuertemente. Estos resultados están en concordancia con los encontrados en la estabilidad farinográfica. En los ensayos realizados en el reómetro oscilatorio se observó una disminución de G´ al agregar CMC, GP 105 y las HPMC a las masas con sal (**Tabla 1**), lo cual estaría indicando un comportamiento menos elástico de estas masas con respecto al control. En las masas sin sal, CMC al 1,5% no modificó significativamente G´ mientras que HPMC F 4 M provocó su caída en los dos niveles empleados. El módulo viscoso disminuyó con la utilización de las HPMC y la pectina de alto metoxilo mientras que MCC, CMC y la pectina de bajo metoxilo no lo modificaron. En ausencia de sal CMC y HPMC F 4M tampoco modificaron significativamente G´´ (**Tabla 2**). La tg(δ) tiende aumentar tanto en las masas con sal como en las sin sal con todos los hidrocoloides empleados.

G* en las masas con sal no se modifica con el agregado de MCC y GP 8001, con el resto de los hidrocoloides disminuye. En ausencia de sal con HPMC F 4 M cae. En ninguno de los parámetros determinados, se observa una tendencia clara en relación al nivel de hidrocoloide empleado.

En general las masas sin sal tienen valores de G´ y G* menores a los de las masas con sal.

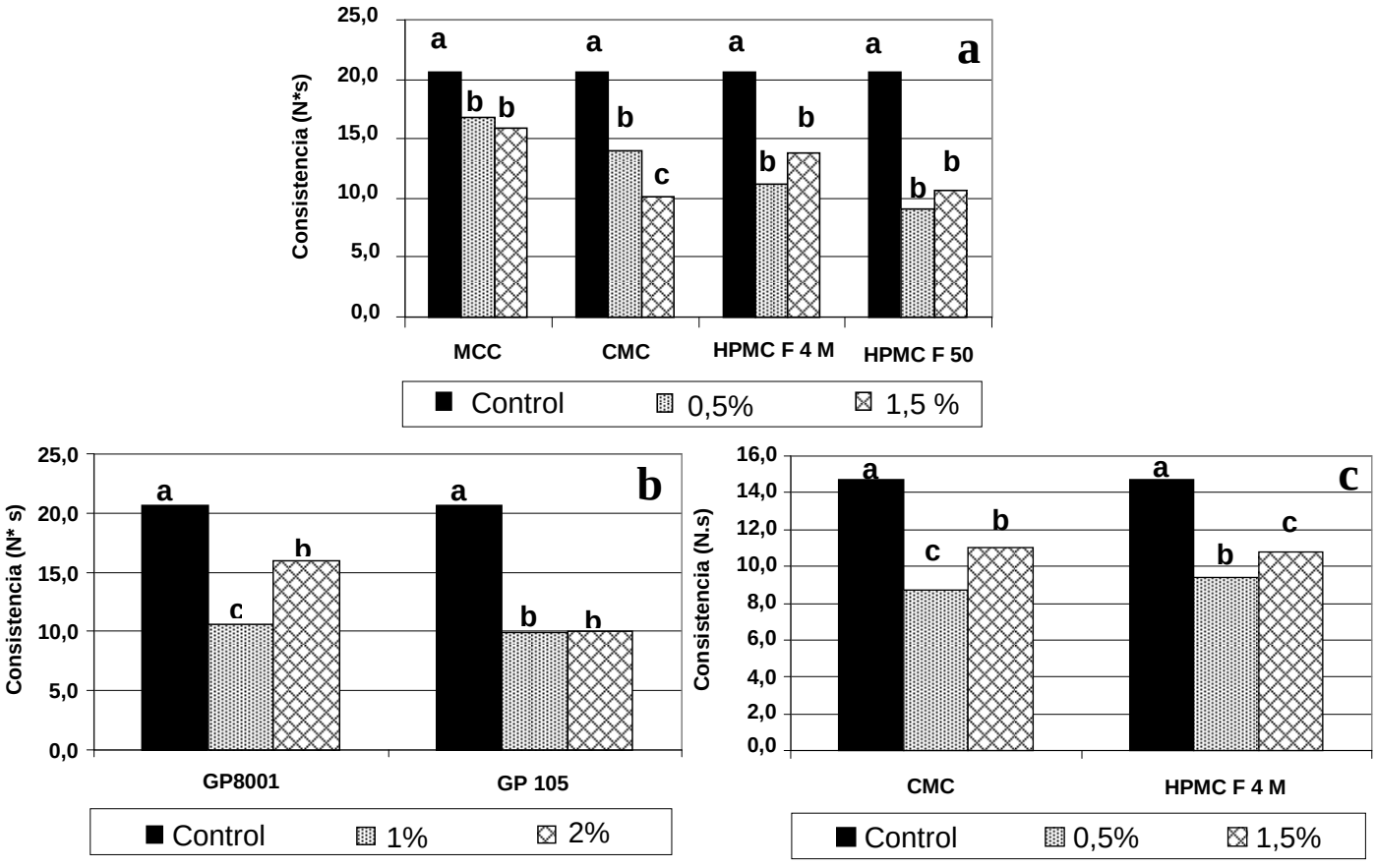


Figura 4. Consistencia obtenida en el TPA. a) masas con sal aditivadas con celulosas modificadas b) masas con sal aditivadas con pectinas c) masas sin sal aditivadas con CMC y HPMC.

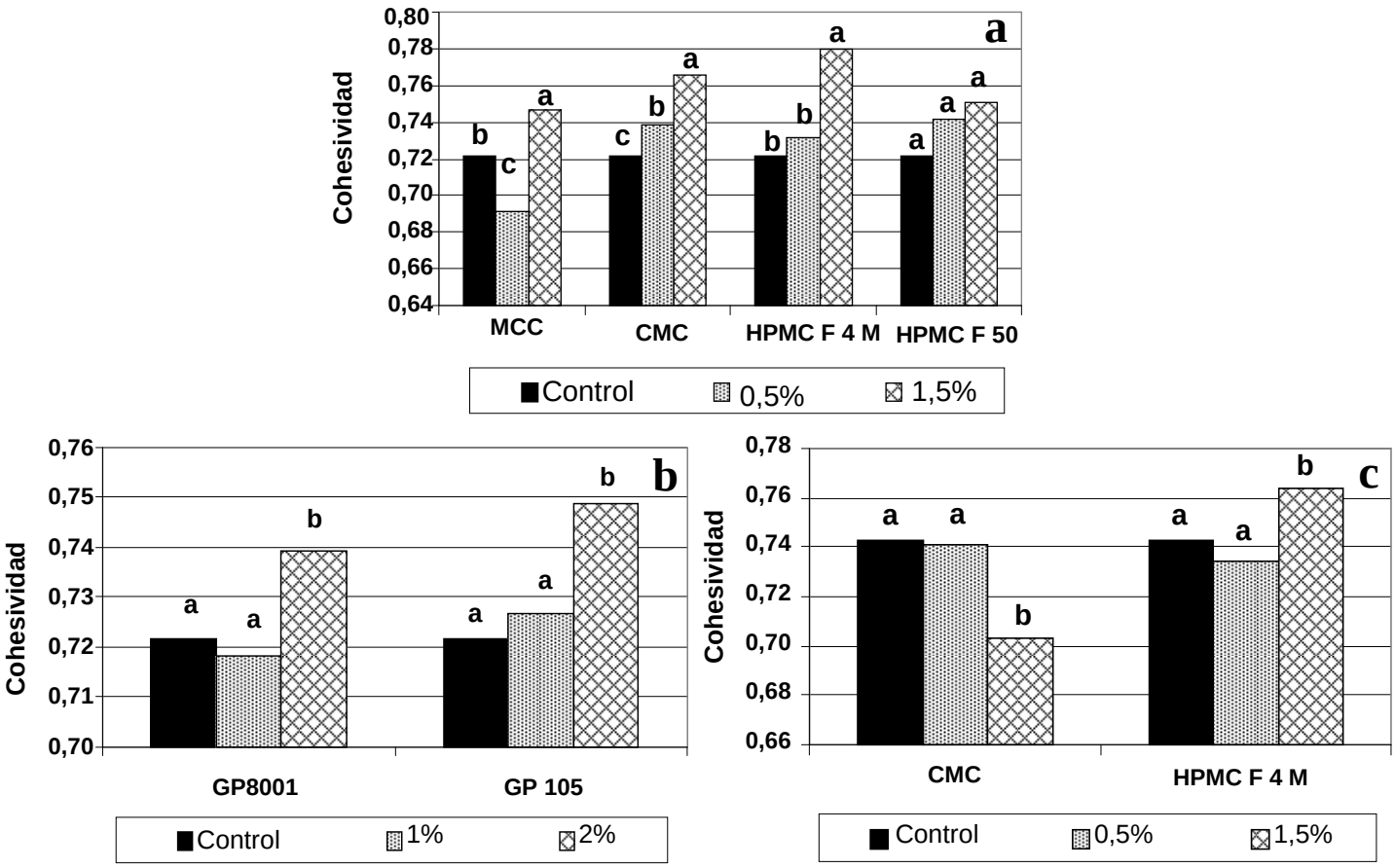


Figura 5. Se muestra la cohesividad obtenida en el TPA.a) masas con sal aditivadas con celulosas modificadas b) masas con sal aditivadas con pectinas c) masas sin sal aditivadas con CMC y HPMC.

Tabla 1. Parámetros reológicos dinámicos determinados en las masas con sal.

Masas con sal	**G***	**G' [Pa]**	**G" [Pa]**	**tan (δ)**
Control	19104	18165	5850	0,326
MCC 0,5%	19360	18282	6355	0,348
MCC 1,5%	17358	16455	5516	0,336
CMC 0,5 %	14050	13022	5271	0,404
CMC 1,5 %	14834	13660	5774	0,426
HPMC F 4M 0,5 %	11304	10541	4072	0,385
HPMC F 4M 1,5 %	12372	11505	4540	0,394
HPMC F 50 0,5 %	11990	11178	4334	0,387
HPMC F 50 1,5 %	12437	11710	4176	0,356
GP 8001 1%	15778	14810	5431	0,366
GP 8001 2%	18625	17680	5850	0,331
GP 105 1%	12137	11336	4330	0,383
GP 105 2%	11774	10983	4236	0,386

Tabla 2. Parámetros reológicos dinámicos determinados en las masas sin sal.

Masas sin sal	**G ***	**G' [Pa]**	**G" [Pa]**	**tan (δ)**
Control	13969	13129	4773	0,363
CMC 0,5 %	9708	9022	3584	0,397
CMC 1,5 %	13454	12540	4867	0,389
HPMC F 4 M 0,5 %	11924	10945	4732	0,431
HPMC F 4 M 1,5 %	10724	9846	4212	0,428

CONCLUSIONES

El efecto provocado por los hidrocoloides en el comportamiento reológico de la masa depende tanto de la estructura química del hidrocoloide como de la presencia de otros componentes, debido a que esto determina el tipo de interacciones que pueden establecerse en la masa. En este caso la presencia de NaCl provocó un comportamiento diferencial de la estabilidad de la masa ante el agregado de CMC y HPMC debido a que su presencia modifica las interacciones que se establecen entre estos hidrocoloides y las proteínas del gluten.

El agregado de hidrocoloides, en particular de pectina de alto metoxilo y CMC, provocó un ablandamiento de la masa, lo cual se vio reflejado en los valores de dureza (TPA) y en la disminución de los módulos elástico (G´) y complejo (G*) (ensayos dinámicos). La consistencia de la masa disminuyó mientras que la cohesividad se vio incrementada por los hidrocoloides en las masas con sal mientras que en las masas sin sal CMC la disminuyó mientras que HPMC F 4 M la incrementó.

Ante la ausencia de sal, las cargas de CMC no se verían apantalladas por la que interactuarían con la red de gluten dando lugar a una red más débil, menos estable y por lo tanto a una masa menos cohesiva. A su vez, al no encontrarse sal en la masa no se favorecería el establecimiento de interacciones hidrofóbicas entre las HPMC y las proteínas del gluten, por lo que se obtiene una masa más fuerte, más estable y más cohesiva.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado gracias al financiamiento de ANPCyT a través del subsidio PICTR2003 N 286 y del CONICET, a través del PIP 6353.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Glicksman M. 1982. Food Hydrocolloids Vol III. New York. CRC Press, Inc. pag 246.

Kinsella JE, Hale ML. 1984. Hydrophobic Associations and Gluten Consistency: Effects of Specific Anions. J. Agric. Food Chem. 32: 1054-1056.

Pilosoff AMR. 2000. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Buenos Aires. Editorial Universitaria de Bs. As.pag.181.

Ribotta PD, Ausar SF, Beltramo DM, León A.E. 2005. Interactions of hydrocolloids and sonicated – gluten proteins. Food Hydrocolloids 19: 93-99.

Rosell MC, Foegeding A. 2007. Interactions of hydroxipropylmethylcellulose with gluten protteins: Small deformation properties during thermal treatment. Food Hydrocolloids 21: 1092-1100.

Steffe JF. 1992. Rheological methods in food process engineering.2º edición. East Lansing, Michigan: Freeman Press.pag.418.

Caracterización fisicoquímica y liberación de extractos de yerba mate encapsulados

Lipid content, fraction separation and acidic composition of a commercial mate tee (*Ilex paraguayensis*) brand

Deladino L (1), Anbinder P. (3), Navarro A. (1,2) y Martino M. (1)

(1) CIDCA, CONICET, Fac. Cs. Exactas (UNLP), 47 y 116, La Plata (1900).
(2) Fac. Ing. (UNLP), 1 y 47, La Plata (1900).
(3) INIFTA, CONICET, Fac. Cs. Exactas (UNLP), Diag. 113 y 64, La Plata (1900), Argentina.
loredeladino@gmail.com

RESUMEN

Los antioxidantes evitan cambios de sabor, aroma, así como cambios en el valor nutricional de los alimentos. Además, el consumo de antioxidantes en la dieta o como suplemento dietario es aconsejable para disminuir el riesgo de contraer aterosclerosis, cáncer y retardar el proceso de envejecimiento. La encapsulación, como mecanismo de protección de compuestos activos, amplía el rango de aplicación de compuestos lábiles a las condiciones del medio y permite una liberación controlada de los mismos. Los objetivos del presente estudio fueron analizar las condiciones de obtención de las cápsulas de alginato de calcio con y sin recubrimiento de quitosano, conteniendo extractos liofilizados de yerba mate (*Ilex paraguariensis*), caracterizar las mismas a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Además se evaluó la liberación *in-vitro* de los antioxidantes encapsulados. Respecto a la obtención de las cápsulas, se estudió el efecto de la concentración de la solución de quitosano (1; 0.5 y 0.1 % p/v en ácido acético al 1%) y del agregado de cloruro de calcio 0.055 M a la solución del quitosano. La eficiencia de la encapsulación se determinó mediante la destrucción de la matriz con citrato de sodio (5% p/v) y posterior cuantificación de los polifenoles totales mediante la técnica de Folin Ciocalteau. Se seleccionó una concentración de quitosano de 0.5% p/v, observándose que el cloruro de calcio no tuvo efecto en la cantidad del compuesto activo encapsulado. En la caracterización mediante DSC se observó el pico característico del extracto de yerba mate (85°C) en ambos tipos de cápsulas, con y sin recubrimiento. En el estudio mediante FTIR se observaron bandas características del alginato y del quitosano, y nuevas bandas que indicarían la interacción entre ambos hidrocoloides y el extracto. La simulación de la digestión *in vitro* de los encapsulados mostró que la mayor parte de los antioxidantes se liberaban en el estómago.

ABSTRACT

Food antioxidants prevent changes in flavour, taste and nutritional value. Natural antioxidants intake in diet or as dietary supplement is highly recommended to decrease the risk of atherosclerosis, cancer and delay aging process. Encapsulation protects active compounds, broadens labile compounds application and allows their controlled release. Lyophilized yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts were encapsulated in calcium alginate, with and without chitosan external layer. The objectives of this work were to analyze the effect of chitosan solution concentration (1; 0.5 and 0.1 % w/v in acetic acid 1%) and the effect of calcium chloride incorporation in chitosan solution, on encapsulation efficiency. To characterize the capsules by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Infrared Spectroscopy (FT-IR) and to quantify the *in vitro* release of encapsulated antioxidants. The encapsulation efficiency was quantified by destroying the matrix with sodium citrate (5% w/v) and measuring total polyphenol content. The presence of $CaCl_2$ in chitosan solution did not increase the encapsulation efficiency. The concentration of 0.5% of chitosan was selected. Yerba mate extract showed a broad peak at 85°C by DSC. This peak was also observed in thermograms of both types of capsules, with or without external layer. In FT-IR spectra, characteristic bands of alginate and chitosan were observed and new ones appeared denoting the interaction between both hydrocolloids. *In vitro* digestion of capsules showed that antioxidants released mainly in stomach.

PALABRAS CLAVE: *encapsulación-antioxidantes-yerba mate.*

KEYWORDS: *encapsulation-antioxidants-yerba mate.*

INTRODUCCIÓN

La yerba mate (*Ilex paraguariensis Saint Hilare*) es una planta originaria del bosque subtropical de Sud América. La zona de distribución en nuestro país comprende la provincia de Misiones y el nordeste de la provincia de Corrientes. Una de las características distintivas de este cultivo, es la abundante concentración de sustancias antioxidantes, flavonoides, muy importantes en la búsqueda y mantenimiento de la salud. Estas sustancias combaten la acción oxidante de radicales libres que, al atacar a las células del organismo, son responsables de la producción de enfermedades y del envejecimiento temprano. Los antioxidantes retrasan o previenen la oxidación del sustrato, cuando están presentes en los alimentos o en el cuerpo a bajas concentraciones en comparación al sustrato oxidable. La industria alimenticia emplea antioxidantes de grado alimenticio, principalmente fenoles, para prevenir el deterioro de los productos y mantener su valor nutricional. Los antioxidantes también han sido de interés para los profesionales de la salud, ya que ayudan al cuerpo a protegerse del daño causado por las especies reactivas al oxígeno, nitrógeno y cloro, asociadas con enfermedades degenerativas (Shahidi y Naczk, 2004).

La encapsulación es una tecnología que permite incluir materiales sólidos, líquidos y gaseosos en pequeñas cápsulas que liberan su contenido a velocidades controladas durante períodos de tiempo prolongados. Además, la encapsulación en el área de los alimentos puede ser empleada para solucionar problemas de formulación causados por baja estabilidad química o física del ingrediente activo, incompatibilidad entre el ingrediente activo y la matriz del alimento o para controlar la liberación de un ingrediente sensorialmente activo o la biodisponibilidad de un nutriente (Champagne, 2007).

El amplio interés en el reemplazo de antioxidantes sintéticos por otros de origen natural, sobre todo en el campo de los alimentos, es mundialmente conocido. En nuestro laboratorio se obtuvo un extracto liofilizado de yerba mate (Deladino y col., 2008), el cual posee una elevada actividad antioxidante debido a su elevado contenido en polifenoles. Sin embargo, este polvo tiene una limitación en cuanto a su higroscopicidad, lo cual hace necesaria su protección a fin de conservarlo para su posterior aplicación.

Los objetivos de este trabajo fueron encapsular un extracto liofilizado de yerba mate en un sistema de alginato de calcio con y sin recubrimiento de quitosano y analizar las condiciones de obtención de las cápsulas; por otro lado, caracterizar las cápsulas obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y estudiar la liberación *in-vitro* de los antioxidantes encapsulados.

MATERIALES Y MÉTODOS

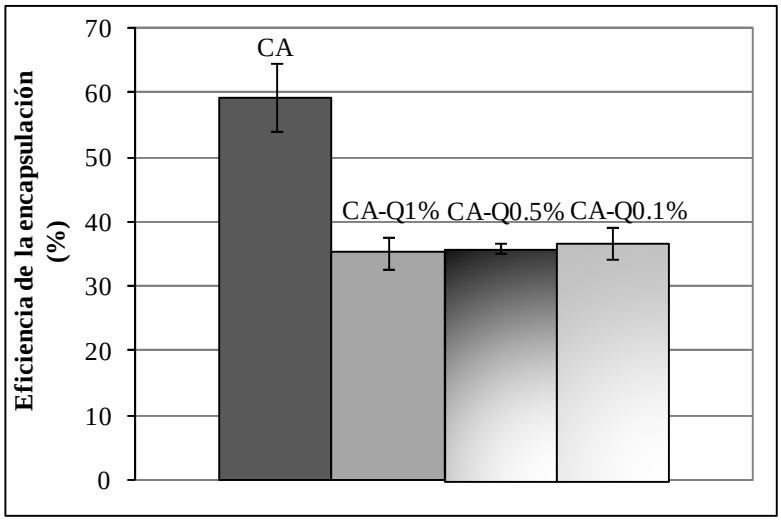
Para obtener los encapsulados se mezcló el compuesto activo (1% p/v) con una solución de alginato de sodio 2% (p/v) la cual se dejó gotear a través de una aguja conectada a una bomba peristáltica, en una solución de cloruro de calcio (0.05M). Las cápsulas obtenidas fueron mantenidas en la solución gelificante durante 15 min. Luego, fueron filtradas y enjuagadas con una solución buffer (acético-acetato, pH 5.5) y se dejaron estabilizar al aire durante otros 15 min para permitir la total difusión del calcio dentro de la cápsula. Los encapsulados así obtenidos se denominaron “cápsulas alginato”. A continuación, un grupo de cápsulas alginato fueron sumergidas en una solución de quitosano. El efecto del agregado de quitosano como capa externa se estudió ensayando tres soluciones de quitosano: 1%, 0.5% y 0.1% en ácido acético glacial al 1%. Para este experimento se empleó un diseño en bloques completos aleatorizados, ya que existía la posibilidad de que las diferentes tandas de cápsulas, obtenidas en días distintos, introduzcan cierta variabilidad en el ensayo. El ensayo se realizó por quintuplicado. Las cápsulas permanecieron durante 30 minutos en la solución de quitosano; a estos encapsulados se los denominó “cápsulas alginato-quitosano”.

Además, en el caso de los encapsulados recubiertos con quitosano, se estudió el efecto del agregado de iones calcio en la solución de quitosano, con el objetivo de evaluar si se retenían más cantidad de polifenoles con respecto al quitosano sin $CaCl_2$ debido a una diferencia de presión osmótica. Para ello, a cada una de las soluciones de quitosano preparadas, se le adicionó cloruro de calcio 0,05M. Ambos

tipos de cápsulas se secaron en estufa de convección a 65°C durante 3 h. La eficiencia de la encapsulación en todos los casos mencionados se determinó mediante la destrucción de la matriz con citrato de sodio 5% p/v y la posterior determinación de polifenoles totales mediante Folin-Ciocalteau (Schelesier, 2002). La liberación *in vitro* del extracto encapsulado se realizó empleando HCl 0,1 M (pH ≈ 2) como Fluido gástrico simulado (FGS) y Buffer Sorensen´s fosfato (pH=7.4) como Fluido intestinal simulado (FIS). Para el ensayo se colocaron en un erlenmeyer 40 cápsulas en 100 ml de FGS, en un agitador orbital a 37°C y 180 rpm durante 3 h. Luego de este período, se filtraron las cápsulas (aún íntegras) y se trasvasaron a otro erlenmeyer con 100 ml de fluido intestinal simulado, donde también permanecieron un tiempo de 3 h. Se cuantificó la masa de polifenoles totales en ambos medios simulados. La sumatoria de la masa de polifenoles en ambos medios se tomó como el contenido total liberado durante la digestión *in vitro*. Para el estudio mediante FT-IR se utilizaron muestras liofilizadas del extracto y de las cápsulas con y sin compuesto activo. Las mismas fueron mezcladas y trituradas con KBr para luego obtener pastillas y ser caracterizadas por transmisión. Se usó un equipo Nicolet 380 FT-IR, obteniendo 64 escaneos por ensayo, con una resolución de 4 cm^{-1}. Las muestras también fueron analizadas en un calorímetro diferencial de barrido (DSC Q100, TA Instruments). La velocidad de calentamiento fue de 10°C/min. Los análisis se realizaron por triplicado. Se analizó el extracto liofilizado sin encapsular, cápsulas control (sin extracto) y las cápsulas (alginato y alginato-quitosano) con extracto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la **Figura 1**, todas las cápsulas recubiertas con quitosano presentaron diferencias significativas con respecto a las cápsulas control ($p<0.05$), siendo las últimas las que más compuesto activo retuvieron. Entre las cápsulas con diferente concentración de quitosano en la capa externa, las cápsulas con quitosano al 0.5% obtuvieron porcentajes de encapsulación iguales a las otras dos concentraciones del policatión ($p>0.05$), en tanto las concentraciones de quitosano de 0.1 y 1 % presentaron porcentajes de retención significativamente diferentes entre sí ($p<0.05$). La concentración del 1% fue la que mayor porcentaje de encapsulación mostró, por lo tanto, como el quitosano al 0.5% no presentó diferencias significativas con ésta, se decidió continuar empleando una concentración del 0.5% en ensayos posteriores. Con el objetivo de incrementar el porcentaje de extracto retenido en las cápsulas cubiertas de quitosano, se agregaron iones calcio a la solución del policatión, pero su incorporación no se tradujo en un aumento de retención del extracto liofilizado, sin embargo, varios autores (Bartkowiak y Hunkeler 1999, 2000; George et al. 2006) estudiaron cápsulas de complejos de quitosano–alginato y concluyeron que la adición de calcio mejoraba la estabilidad de la estructura.



CA: Cápsulas alginato, CA-Q1%: Cápsulas alginato-quitosano 1%, CA-Q0.5%:Cápsulas alginato-quitosano 0.5%, CA-Q0.1%:Cápsulas alginato-quitosano 0.1%.

Figura 1. Efecto de la concentración de quitosano sobre la eficiencia de la encapsulación.

La eficiencia de la encapsulación fue menor para las cápsulas con quitosano, lo cual fue atribuido a una posible interacción entre el quitosano y los polifenoles del extracto lo cual no permitiría su detección (Popa et al. 2000). Con respecto a la liberación *in-vitro* de los extractos la mayor parte del mismo se liberó en el fluido gástrico simulado (FGS) a lo largo de un tiempo total de 3 h (**Figura 2**), quedando solo alrededor de un 10 % en el fluido intestinal simulado. Este ensayo permitió corroborar la eficiencia de la encapsulación, ya que si bien los porcentajes finales no son idénticos, se mantiene la relación entre cápsulas alginato/cápsulas alginato-quitosano. Sin embargo, las cápsulas recubiertas con quitosano protegieron mejor al compuesto activo durante su pasaje por el FGS, ya que retuvieron un 20% del total encapsulado, con respecto a un 10% retenido en cápsulas de alginato (**Figura 2**). De acuerdo a George y Abraham (2006) este resultado puede ser atribuido a que si bien el quitosano es soluble a bajos pHs como el del estómago, al estar formando un complejo o membrana con el alginato que es insoluble en esta condición, las cápsulas recubiertas con el policatión son más resistentes que las cápsulas alginato durante su pasaje por el fluido gástrico simulado.

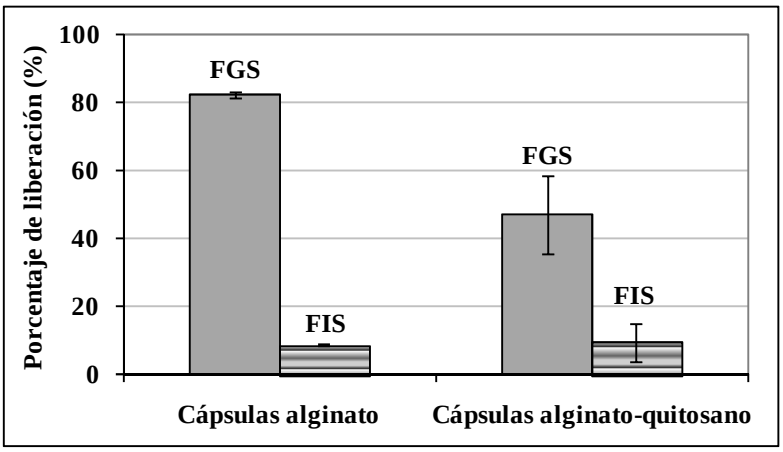


Figura 2. Porcentaje de extracto de yerba mate liberado *in-vitro*: FGS: Fluido Gástrico Simulado; FIS: Fluido Intestinal Simulado.

Con respecto a la caracterización de los encapsulados, se puede observar en la **Figura 3** que el espectro FT-IR del extracto de yerba mate liofilizado presenta bandas características de polifenoles, con una amplia banda centrada a 3400 cm^{-1} asignada a los grupos OH, también se observan picos a 1606 y 1520 cm^{-1} atribuidos a la vibración C=C del anillo aromático y a los grupos hidroxilos fenólicos respectivamente, así como una banda de estiramiento del grupo C=O a 1270 cm^{-1} **(**Tanizawa et al. 2007 y Ma et al. 2009)

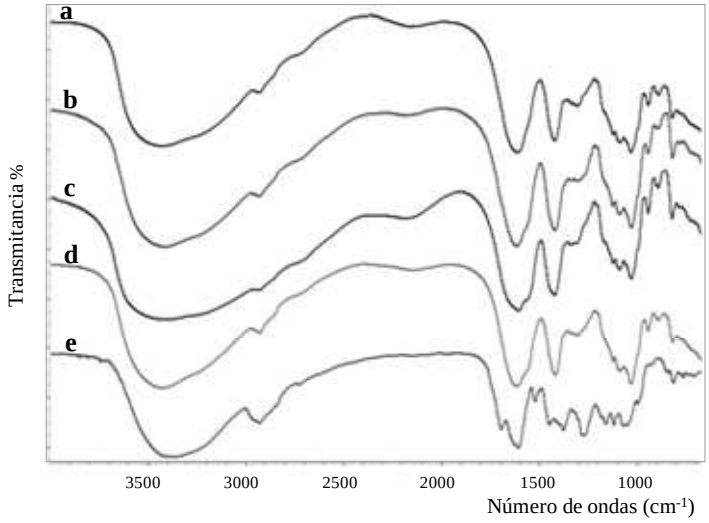


Figura 3. Espectros FT-IR a) Cápsulas alginato sin extracto, b) Cápsulas alginato-quitosano sin extracto, c) Cápsulas alginato, d) Cápsulas alginato-quitosano y e) Extracto liofilizado.

Las cápsulas presentan bandas características relacionadas con las unidades de sacáridos que tienen en común en su estructura (**Figura 3**). Entre 3450 y 3490 cm^{-1} los espectros muestran una banda atribuida a los grupos -OH, el anillo de glucosa aparece entre 1060 y 1150 cm^{-1} (Jansson Charrier et al, 1995). En aquellas cápsulas que contienen el antioxidante se puede observar las contribuciones de la yerba a 1270 cm^{-1} y la presencia de un hombro a 1560 cm^{-1}. Corrimientos en la frecuencia de los picos a 820 y 1420 cm^{-1} podrían estar asociados a interacciones no covalentes entre la matriz de alginato y algún componente del extracto liofilizado.
En la caracterización mediante DSC se observó un único pico para el extracto de yerba mate cercano a los 85°C (**Figuras 4** y **5**), este pico es muy amplio posiblemente debido a la gran cantidad de compuestos presentes en el extracto. En ambos tipos de cápsulas, se observa que la línea de base se encuentra ligeramente afectada por la presencia del extracto en comparación con el placebo cuya línea de base es recta. En el caso de las cápsulas de alginato de calcio, se observan en el placebo dos picos característicos uno endotérmico (≈205°C), y otro exotérmico. (≈260°C). Estos resultados concuerdan con los hallados por Sarmento et al. (2006), Wong et al. (2002) y Ribeiro et al. (2005).

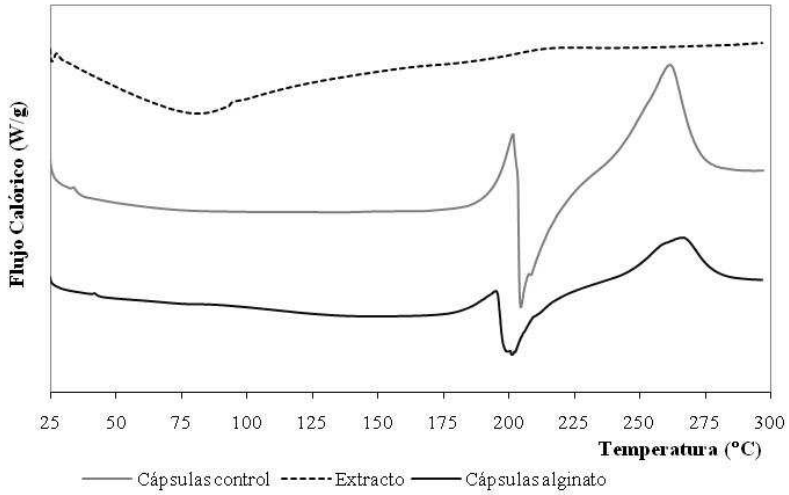


Figura 4. Endotermas obtenidas para el extracto liofilizado y cápsulas de alginato de calcio con y sin antioxidante.

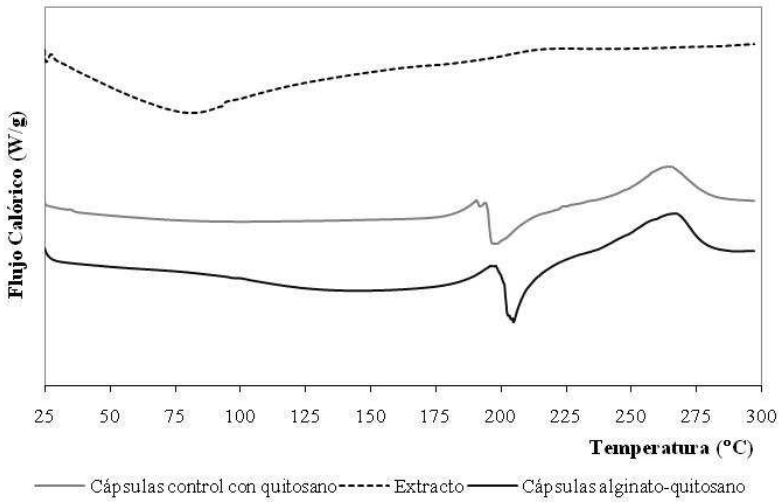


Figura 5. Endotermas obtenidas para el extracto liofilizado y cápsulas de alginato de calcio-quitosano, con y sin antioxidante.

En el caso de las cápsulas recubiertas con quitosano, no se evidenció el pico característico del quitosano (≈120°C), en los encapsulados probablemente debido a la baja masa que el hidrocoloide representa en los mismos, aunque los picos representativos de las cápsulas de alginato de calcio se

vieron modificados por el agregado de quitosano, las entalpías puestas en juego (ΔH) son menores, las temperaturas de pico están desplazadas a temperaturas menores y surgió un nuevo pico de muy bajo ΔH alrededor de 190°C. Smitha et al. (2005) encontraron resultados similares, un pico endotérmico alrededor de 200°C al estudiar el complejo alginato-quitosano. Wong et al. (2002) también encontraron este pico en encapsulados de alginato y quitosano sin incorporación del compuesto activo.

CONCLUSIONES

La concentración de la solución de quitosano tuvo efecto sobre la eficiencia de la encapsulación, en cambio, el agregado de iones calcio a la solución de quitosano no influyó sobre la misma. La digestión *in-vitro* mostró que ambas cápsulas liberan la mayoría de su contenido en el estómago y que las cápsulas recubiertas con quitosano protegen mejor al extracto durante su paso por el estómago. Las técnicas empleadas en la caracterización de los encapsulados, DSC y FT-IR permitieron conocer algunas de las interacciones entre los hidrocoloides entre sí y con el extracto de yerba mate.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate por el financiamiento otorgado en el marco de los subsidios PRASY.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bartkowiak A. y Hunkeler D. 1999. Alginate-Oligochitosan Microcapsules: A Mechanistic Study Relating Membrane and Capsule Properties to Reaction Conditions. Chemical Materials, 11: 2486-2492.

Bartkowiak A. y Hunkeler D. 2000. Alginate-Oligochitosan Microcapsules II. Control of Mechanical Resistance and Permeability of the Membrane. Chemical Materials, 12: 206-212.

Champagne C.P. y Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion on Biotechnology, 18: 184-190.

Deladino L., Anbinder P. S., Navarro A. S. y Martino M. N. 2008. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. Carbohydrate Polymers, 71: 126-134.

George M., Abraham E. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan-a review. Journal of Controlled Release, 114: 1-14.

Ma H.L., Kermasha S., Gao J.M., Morales Borges R., Yu X.Z. 2009. Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 57:Pages 89-95.

Jansson Charrier M., Saucedo I., Guibal E. y Le Cloirec P. 1995. Approach of uranium sorptions on chitosan and glutamate glucan by IR and C-NMR analysis. Reactive and Functional Polymers, 27: 209-221.

Popa M., Aelenei N., Popa V. y Andrei D. 2000. Study of the interaction between polyphenolic compounds and chitosan. Reactive and Functional Polymers, 45: 35-43.

Ribeiro A. J., Neufeld R. J., Arnaud P. y Chaumeil J. C. 1999. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. International Journal of Pharmaceutics, 187: 115–123.

Sarmento B., Ferreira D., Veiga F. y Ribeiro A. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. Carbohydrate Polymers, 66:1-7.

Schlesier K., Harwat M., Bo¨hm V. y Bitsch R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. Free Radical Research, 36: 177-187.

Shahidi F y Naczk M. 2004. Phenolics in Food and Nutraceuticals. 1era ed. Boca Ratón, Florida: CRC Press LLC.

Smitha B., Sridhar S. y Khan A.A. 2005. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuell cell membranes. European Polymer Journal, 41: 1859-1866.

Tanizawa Y., Abe T. y Yamada K. 2007. Black tea stain formed on the surface of teacups and pots. Part 1 – Study on the chemical composition and structure. Food Chemistry, 103:1-7.

Wong T. W., Chan L. W., Kho S. B. y Sia Heng P. W. 2002. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. Journal of Controlled Release, 84: 99-114.

Análisis sensorial de diferentes marcas comerciales de orégano

Sensory analysis of different brands of commercial oregano

Demmel GI(1), Nepote MV(2), Grosso NR(3), Olmedo RH(3), Ferrari MC(1), Criado SG(1), Vázquez AM(1)

(1)Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.
(2)ICTA, IMBIV-CONICET - Facultad de Cs. Exactas Físicas y Naturales, UNC, Argentina.
(3)IMBIV-CONICET - Facultad de Cs. Agropecuarias, UNC, Argentina.
gabrielademmel@yahoo.com.ar

RESUMEN

En el presente estudio se realizó una evaluación sensorial de nueve marcas comerciales de orégano, adquiridas en diferentes puntos de venta de la ciudad de Córdoba (Argentina), las cuales fueron identificadas con letras desde la A hasta la I. La finalidad del estudio consistió en medir la aceptabilidad de las muestras de orégano por parte de consumidores representativos de Córdoba, Argentina. El panel estuvo compuesto por 80 jueces de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 50 años, que valoraron los atributos "*aroma*" y "*sabor*" de orégano, usando una escala hedónica de 9 puntos (desde 1 – *Me disgusta muchísimo*-, hasta 9 – *Me gusta muchísimo*-). Los criterios de inclusión fueron: no fumadores, sin alergias alimentarias, y consumidores de productos con orégano al menos una vez por semana. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico de frecuencias en las categorías de aceptación de las variables aroma y sabor y a un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica (Kruskal-Wallis) con test posterior (prueba de Dunn), con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$). El medio alimenticio utilizado resultó útil para llevar a cabo la prueba de aceptabilidad sensorial de las distintas marcas comerciales de orégano, pudiendo establecerse diferencias significativas entre las muestras en cuanto al atributo *sabor*, no así en el atributo *aroma.* La marca más aceptada (de mayor promedio de aceptabilidad) fue la identificada con la letra G y la menos aceptada (menor promedio de aceptabilidad) fue la identificada con la letra A. Las muestras de orégano evaluadas fueron aceptadas por los consumidores, con medianas de aceptabilidad comprendidas entre 6 –*Me gusta ligeramente*- y 7-*Me gusta bastante*- para ambos atributos.

ABSTRACT

In the present study was conduced a sensory evaluation of nine commercial brands of oregano, acquired in different outlets of Cordoba (Argentina). The samples were identified with letters from A to I. The aim of this study consisted of acceptability test for consumers from Cordoba, Argentina. The panel was composed for 80 judges of both sexes, aged between 17 and 50 years, that valued *aroma* and *flavour* attributes for oregano, using a 9- point hedonic scale (from *1 – Unlike extremely*, up to *9 - Like extremely*) for *aroma* and *flavour* attributes. The inclusion criteria were: non-smokers, without allergies, and consumers of products with oregano at least once per week. The results were subjected to statistical analysis of frequencies in the categories of acceptance of aroma and flavour, and an analysis of variance (ANOVA) nonparametric (Kruskal-Wallis) with later test of Dunn, using a significance level of 5% ($\alpha = 0,05$). The used food was useful to carry out the test of sensory acceptability for oregano samples, being to establish significant differences among the samples for *flavour* attribute, but not in *aroma* attribute. The commercial brand more accepted (greater average) was the identified with letter G, and the brand with less acceptance (smaller average), was the identified with the letter A. Samples of oregano were accepted by the consumers, with average values of acceptability between *6 - Like slightly* and *7-Like enough* for the evaluated attributes.

PALABRAS CLAVE: *orégano, análisis sensorial, prueba afectiva, prueba de aceptabilidad.*

KEYWORDS: *oregano, sensory analysis, sensory acceptability.*

INTRODUCCIÓN

Origanum vulgare L, (orégano), es una herbácea perenne aromática cuyas hojas desecadas se utilizan como condimento por poseer glándulas productoras de aceite esencial, lo que le proporciona el sabor y aroma que la caracterízan. El género *Origanum* pertenece a la familia Lamiaceae y es originaria de la región Mediterránea de Europa. Se caracteriza por una gran diversidad de especies diferentes desde el punto de vista morfológico y químico. En Argentina, las especies mayormente cultivadas son híbridos entre *O. vulgare* y *O. mejorana* denominados *Origanum x aplii* (orégano criollo) y *Origanum x majoricum* (orégano mendocino).

Por sus excelentes propiedades aromáticas, se emplea como especia y condimento tanto en el consumo popular como en la industria, destacándose como el principal componente del condimento para pizzas. En la actualidad se utiliza ampliamente para condimentar panes, aceites, vinagres, tomates, quesos, berenjenas, pescados, crustáceos, salsas y carnes de vaca y cordero. Reviste particular importancia en la industria cárnica y de embutidos ya que se lo emplea fundamentalmente como conservante, aromatizante y sazonador.

En América Latina, los principales productores tradicionales son México, Chile y Perú. Argentina posee condiciones agroedafoclimáticas muy favorables para la producción de esta hierba (Arizio *et al.* 2007) y es de destacar que la región de cultivo condiciona las características aromáticas del producto final: cuando se cultiva en zonas más cálidas, el aroma es de mayor intensidad, el sabor más picante y el perfume más persistente (Kokkini 1996).

En nuestro País, las Provincias de Mendoza (Departamento San Carlos) y Córdoba (Departamento San Javier) son las regiones productoras por excelencia de esta hierba aromática. En el caso particular de Córdoba, existen más de 60 pequeños productores, que por lo general se agrupan en cooperativas. Actualmente uno de los desafíos del sector es poder contar con herramientas que permitan determinar la calidad del producto final y, de esta manera, alcanzar estándares establecidos y lograr certificaciones para competir en los mercados extranjeros (COFECYT 2007).

En este sentido, la evaluación sensorial permite medir la interacción que se produce cuando un sistema alimenticio es percibido por los sentidos, y constituye una de las herramientas fundamentales del proceso de control de calidad de los alimentos, siendo considerada de igual importancia que la calidad química o física (Anzaldúa-Morales 1994).

El interés por la valoración sensorial de los alimentos ha experimentado, en las últimas décadas, un crecimiento notorio esencialmente debido a la toma de conciencia, por parte del sector alimentario, de la importancia de las características organolépticas debido a que son las que determinan, en última instancia, la aceptabilidad o rechazo de un producto por parte de los consumidores.

Los métodos sensoriales son empleados fundamentalmente en dos direcciones: la primera consiste en analizar, describir y cuantificar las características necesarias y suficientes de aspecto, textura, aroma y sabor del producto, o en evaluar diferencias entre productos; la segunda tiene por finalidad el establecer las reacciones de los consumidores a los productos que presentan caracteres previamente definidos. Entre estas reacciones se miden dos aspectos fundamentales: *aceptabilidad* y *preferencia*, las cuales son denominadas *pruebas afectivas* (Watts *et al.* 1992). En ellas intervienen componentes derivados de la propia fisiología individual, sensaciones que experimenta el individuo en contacto con el alimento, condicionamientos culturales, disponibilidad y factores económicos. En consecuencia deben realizarse exclusivamente con consumidores y no con evaluadores entrenados como es el caso de la primera situación.

En estas pruebas afectivas, el consumidor expresa su grado de aceptación por una muestra a través de una encuesta cerrada, cuyos atributos son evaluados en una escala ordinal. En este sentido, el test hedónico de 9 puntos es una de las técnicas utilizadas para llevar a cabo pruebas afectivas (Peryam *et al.* 1957, Pearson *et al.* 1993).

Este tipo de evaluaciones es ampliamente utilizado para el desarrollo de nuevos productos y para la reformulación de alimentos ya existentes en el mercado, así como también para el análisis de líneas de producción y para control de calidad.

El objetivo del presente estudio fue comparar la aceptabilidad sensorial de nueve marcas comerciales de orégano por parte de *consumidores* frecuentes de este condimento, con la finalidad de determinar si se producían diferencias estadísticamente significativas en los atributos *olor* y *sabor* entre las muestras, y determinar si estas diferencias pueden ser utilizadas como indicadores de aceptación o rechazo de los productos estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Nueve marcas comerciales de orégano fueron adquiridas en distintos puntos de venta de la ciudad de Córdoba, Argentina. Todas poseían número de certificado de inscripción en el Registro Nacional de Productos Alimenticios (RNPA). A cada una de ellas se las identificó con una letra desde la A hasta la I, y a los fines del estudio de aceptabilidad sensorial, se les asignó un número aleatorio de cuatro dígitos (**Tabla 1**) para evitar sesgo por la identificación.

Tabla 1. Números aleatorios asignados a las muestras de orégano comercial.

Marca Evaluada	Número Aleatorio
A	1288
B	3524
C	2549
D	8831
E	5452
F	7561
G	3221
H	6150
I	4578

Métodos

Prueba de aceptabilidad. La aceptabilidad sensorial de las muestras de orégano fue evaluada teniendo en cuenta los atributos *olor* y *sabor*, utilizando para ello una escala hedónica de nueve puntos (Peryam *et al.* 1957), donde cada punto de la escala fue categorizado según se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Categorización de la escala hedónica de 9 puntos para el análisis de aceptabilidad de muestras de orégano.

Categoría escala hedónica	Descripción
1	Me disgusta muchísimo
2	Me disgusta mucho
3	Me disgusta bastante
4	Me disgusta ligeramente
5	Ni me gusta – ni me disgusta
6	Me gusta ligeramente
7	Me gusta bastante
8	Me gusta mucho
9	Me gusta muchísimo

La prueba fue realizada por un panel de consumidores (no entrenados), representativos de la Ciudad de Córdoba (Argentina). El mismo estuvo compuesto por 80 jueces de ambos sexos, con edades comprendidas entre 17 y 50 años, cuyos criterios de inclusión fueron: no fumadores, sin alergias alimentarias y consumidores de alimentos con orégano al menos una vez por semana.

La degustación de las muestras se realizó utilizando un pan tipo lactal, liviano, con miga aireada, sin los bordes y cortados en porciones rectangulares (28 mm de ancho x 38 mm de largo x 12 mm de alto) de 3,6 g ± 0,4 g, al cual se adicionaron 0,85 g ± 0,05 g de puré de tomate, que tenía como únicos ingredientes tomate y sal, al que se le agregó 0,10 g ± 0,04 g de la muestra de orégano (previamente triturado con procesadora eléctrica y tamizado a 1 μm).

Para evitar interferencias en la degustación entre las muestras, se indicó a los jueces enjuagar la boca con agua e ingerir un bocado de galletita de agua entre las mismas. En cada sesión se degustaron no más de tres muestras diferentes de orégano y las mismas fueron degustadas de forma aleatoria durante cada sesión.

A cada juez se le entregó la encuesta para completar (**Figura 1**), un plato conteniendo las muestras rotuladas con el número aleatorio asignado según **Tabla 1**, un vaso con agua y una galletita de agua (**Figura 2**).

Complete por favor la siguiente encuesta
Fecha: .....
Edad: .....
Sexo: .....

Fumador: Si ☐ No ☐

Con qué frecuencia consume orégano:

- ☐ más de una vez a la semana
- ☐ una vez a la semana
- ☐ una vez al mes
- ☐ nunca

En caso de tener alergia al orégano, pan o tomate no consumir

---

Marque con una **X** en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra.

Atributo **OLOR a orégano**

ESCALA		1288	3524	2549
Me gusta muchísimo	(9)			
Me gusta mucho	(8)			
Me gusta bastante	(7)			
Me gusta ligeramente	(6)			
Ni me gusta ni me disgusta	(5)			
Me disgusta ligeramente	(4)			
Me disgusta bastante	(3)			
Me disgusta mucho	(2)			
Me disgusta muchísimo	(1)			

MUCHAS GRACIAS

Marque con una **X** en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra.

Atributo **SABOR a orégano**

ESCALA		1288	3524	2549
Me gusta muchísimo	(9)			
Me gusta mucho	(8)			
Me gusta bastante	(7)			
Me gusta ligeramente	(6)			
Ni me gusta ni me disgusta	(5)			
Me disgusta ligeramente	(4)			
Me disgusta bastante	(3)			
Me disgusta mucho	(2)			
Me disgusta muchísimo	(1)			

MUCHAS GRACIAS

Figura 1. Modelo de encuesta utilizado para la prueba de aceptabilidad sensorial de orégano. Los números de muestra era lo único que cambiaba de manera aleatoria con respecto al modelo.

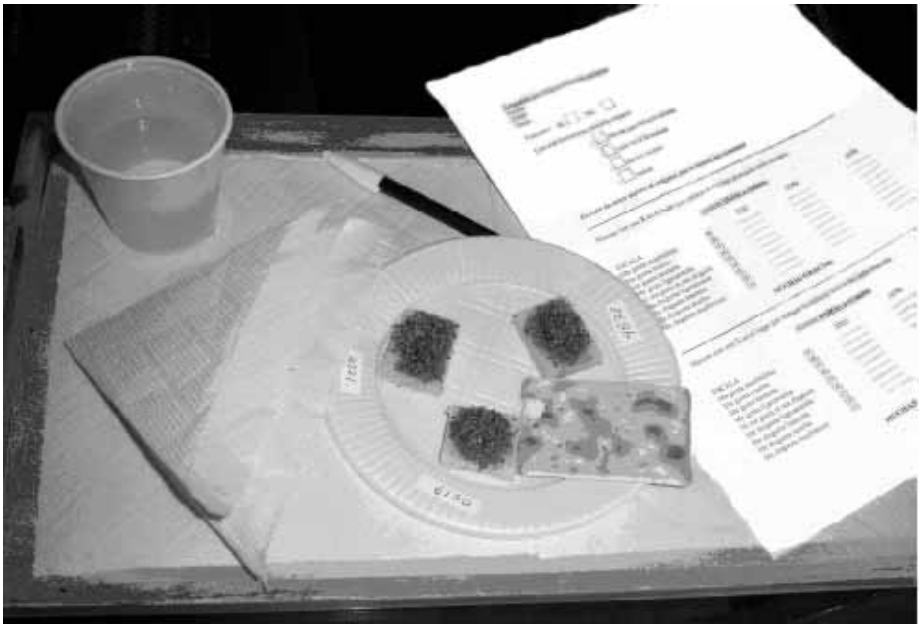


Figura 2.Material entregado a cada juez para la prueba de aceptabilidad de orégano.

Análisis estadístico

Con los resultados de las encuestas del análisis sensorial se obtuvieron las frecuencias absolutas y relativas para cada categoría de la escala hedónica. Además, se calcularon medias, medianas y desvíos estándares de la prueba de aceptabilidad para cada muestra y se analizaron las diferencias significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica (Kruskal-Wallis) y test

posterior (Prueba de Dunn), para un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0,05$). En este estudio se utilizó el software Infostat (versión 2008p, desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las **Tablas 3** y **4** muestran las frecuencias porcentuales obtenidas a partir de la prueba de aceptabilidad sensorial, para cada categoría de la escala hedónica de los atributos *sabor* y *olor* respectivamente. Se puede observar que el rango de categorías elegidas para las variables *sabor* y *olor* fueron desde 4 (*Me disgusta ligeramente*) hasta 9 (*Me gusta muchísimo*). Las categorías más elegidas para el caso de la variable *sabor* fueron: 6 *–Me gusta ligeramente-* (muestras A, E, F, H), 7 *–Me gusta bastante-* (muestras B, C, D, I), 8 (muestra G) y 9 *–Me gusta muchísimo-* (muestra F). En el caso de la muestra F, las categorías 6 *–Me gusta ligeramente-* y 9 *–Me gusta muchísimo-* tuvieron la misma frecuencia. Por otro lado, las categorías más elegidas para la variable *olor* fueron: 6 *–Me gusta ligeramente-* (muestras C, F, H, I) y 7 *–Me gusta bastante-* (muestras A, B, D, E, G).

Tabla 3. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo *sabor*. Se muestran las frecuencias porcentuales obtenidas para cada categoría de la escala hedónica.

Categoría escala hedónica		Muestras de orégano								
		A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**
1	Me disgusta muchísimo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	1%	1%
2	Me disgusta mucho	0%	0%	3%	0%	0%	1%	0%	0%	0%
3	Me disgusta bastante	4%	3%	3%	0%	0%	3%	1%	0%	1%
4	Me disgusta ligeramente	13%	10%	3%	8%	4%	9%	1%	6%	9%
5	Ni me gusta – ni me disgusta	8%	14%	21%*	11%	18%	10%	5%	11%	15%
6	Me gusta ligeramente	35%*	20%*	19%*	15%	28%*	23%*	21%*	26%*	18%*
7	Me gusta bastante	28%*	29%*	23%*	39%*	25%*	14%	28%*	25%*	29%*
8	Me gusta mucho	4%	19%*	14%	21%*	23%*	19%*	29%*	14%	18%*
9	Me gusta muchísimo	10%	6%	16%	6%	4%	23%*	14%	16%	10%

* Categorías de mayor frecuencia porcentual relativa.

Tabla 4. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo *olor*. Se muestran las frecuencias porcentuales obtenidas para cada categoría de la escala hedónica.

Categoría escala hedónica		Muestras de orégano								
		A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**
1	Me disgusta muchísimo	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
2	Me disgusta mucho	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3	Me disgusta bastante	0%	1%	2%	0%	0%	0%	0%	1%	0%
4	Me disgusta ligeramente	7%	4%	6%	2%	2%	8%	1%	3%	2%
5	Ni me gusta – ni me disgusta	11%	9%	13%	5%	16%	12%	9%	11%	14%
6	Me gusta ligeramente	18%*	22%*	21%*	23%*	19%*	21%*	15%	25%*	19%*
7	Me gusta bastante	21%*	26%*	18%*	32%*	22%*	19%*	28%*	15%	17%*
8	Me gusta mucho	18%*	15%	14%	13%	15%	10%	16%	12%	13%
9	Me gusta muchísimo	5%	3%	6%	5%	6%	10%	11%	13%	15%

* Categorías de mayor frecuencia porcentual relativa.

Los valores promedios de aceptabilidad obtenidos para *sabor* y *olor* se muestran en las **Figuras 3** y **4** respectivamente, y en la **Tabla 5** se muestran los resultados de aceptabilidad para ambos atributos. Los promedios de aceptabilidad para el atributo *sabor* estuvieron comprendidos entre 6,21 (marca A) y 7,09 (marca G), mientras que para el atributo *olor*, entre 6,41 (marca C) y 7,03 (marca G).

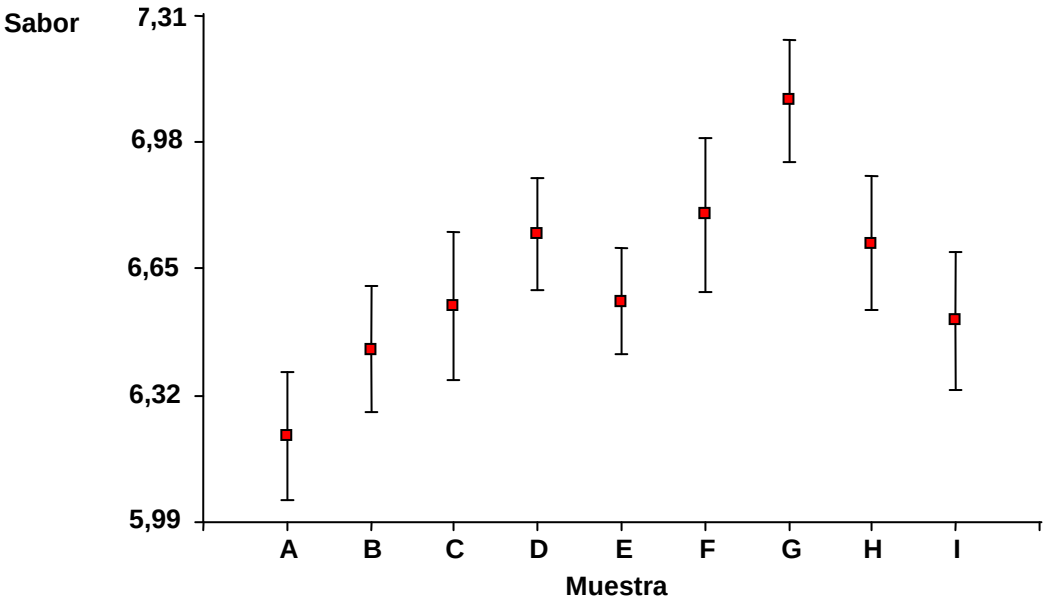


Figura 3. Promedios de aceptabilidad obtenidos para el atributo *sabor*.

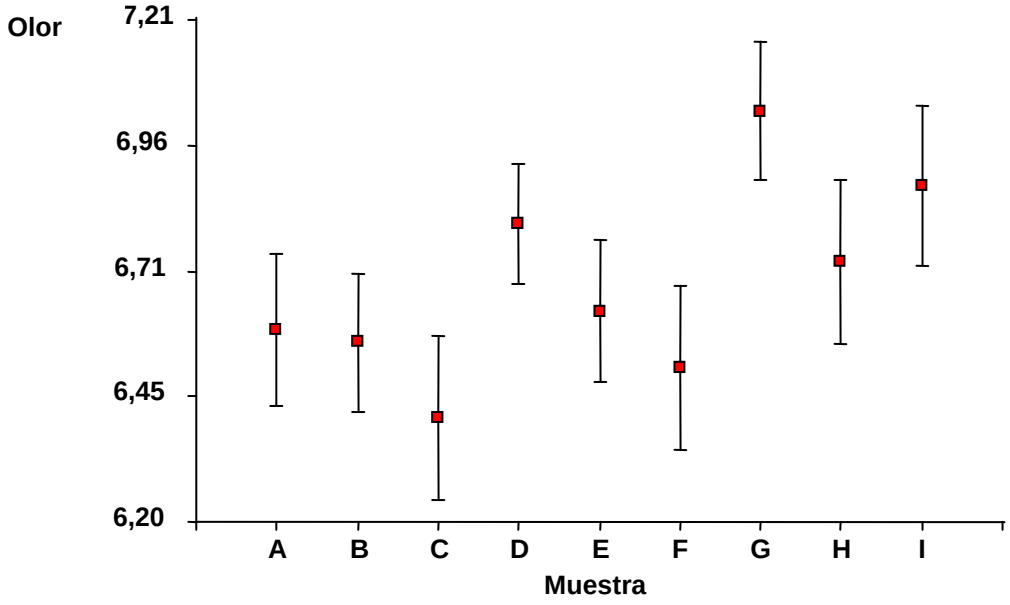


Figura 4. Promedios de aceptabilidad obtenidos para el atributo *olor*.

Tabla 5. Resultados de la prueba de aceptabilidad de orégano.

Muestra	Atributos evaluados			
	Olor		Sabor	
	Media	Mediana	Media	Mediana
A	6,7 ± 1,4	7,00 ± 0,15	6,2 ± 1,5	6,00 ± 0,17
B	6,6 ± 1,2	7,00 ± 0,14	6,4 ± 1,5	7,00 ± 0,17
C	6,4 ± 1,5	6,00 ± 0,16	6,6 ± 1,7	7,00 ± 0,19
D	6,8 ± 1,1	7,00 ± 0,12	6,7 ± 1,3	7,00 ± 0,15
E	6,6 ± 1,3	7,00 ± 0,14	6,6 ± 1,2	7,00 ± 0,14
F	6,5 ± 1,5	6,00 ± 0,16	6,8 ± 1,8	7,00 ± 0,20
G	7,0 ± 1,2	7,00 ± 0,14	7,1 ± 1,4	7,00 ± 0,16
H	6,7 ± 1,5	6,50 ± 0,16	6,7 ± 1,6	7,00 ± 0,18
I	6,9 ± 1,4	7,00 ± 0,16	6,5 ± 1,6	7,00 ± 0,18

Al aplicar a los resultados obtenidos, un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica (Kruskal-Wallis) y test posterior (prueba de Dunn) con un nivel de significancia del 5 % ($p<0,05$), se observaron diferencias significativas en la aceptabilidad de las muestras para el atributo *sabor*, no así para el atributo *olor* (**Figura 5**). La **Tabla 6** muestra los resultados de la prueba de Dunn para los datos de aceptabilidad según el atributo *sabor*. Las muestras están ordenadas según el ranking de menor a mayor aceptabilidad por parte de los consumidores.

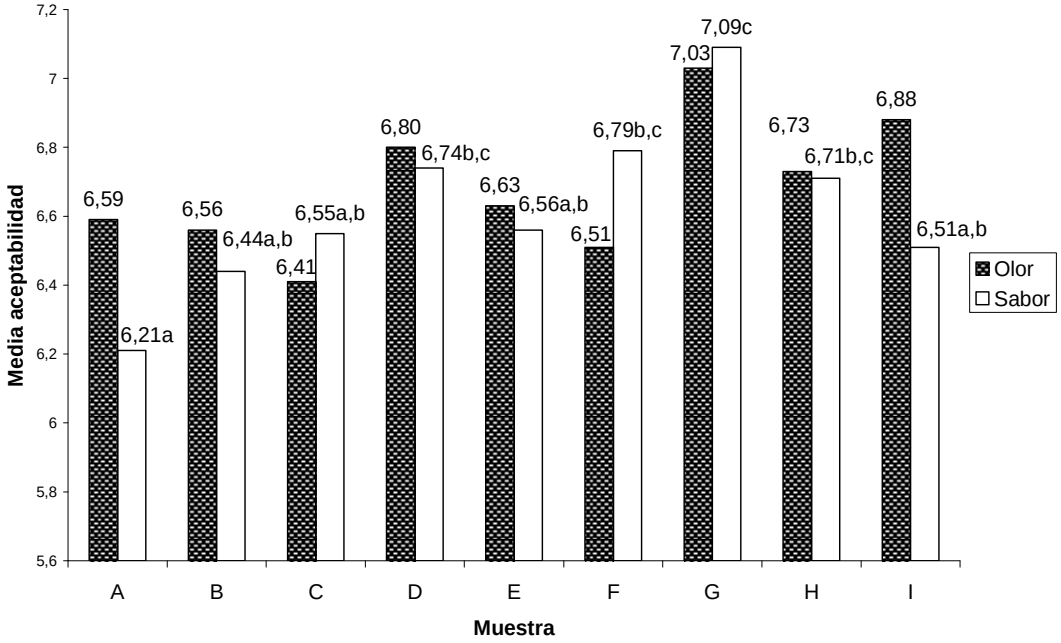


Figura 5. Medias de aceptabilidad en cuanto a "**olor**" y a "**sabor**" de muestras de orégano. Letras distintas en el atributo *sabor*, indican diferencias significativas entre las muestras (ANOVA Kruskal-Wallis, test Dunn, $\alpha=0,05$). En el atributo *olor* las diferencias no fueron significativas.

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis) con test posterior (prueba de Dunn) para los datos de la prueba de aceptabilidad de orégano en cuanto al atributo *sabor*.

Muestra	Ranking según prueba de Dunn ($\alpha=0,05$)*
A	300,69 (a)
B	336,44 (a,b)
E	344,53 (a,b)
I	349,52 (a,b)
C	352,10 (a,b)
H	370,34 (b,c)
D	376,18 (b,c)
F	385,83 (b,c)
G	428,87 (c)

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$). Las muestras aparecen ordenadas según ranking de menor a mayor aceptabilidad.

Finalmente se realizó un análisis multivariado a través del Análisis de Conglomerados (CA), con el objetivo de observar el agrupamiento de las muestras según su aceptabilidad. La **Figura 6** muestra el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea a los atributos de aceptabilidad (*olor* y *sabor*), usando como criterio de clasificación las muestras comerciales de orégano. Fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 1,57 (50 % de la distancia máxima), la muestra G se separa del resto. Las muestras D, H e I forman un grupo, mientras que las muestras restantes (A, B, C, E y F) forman otro grupo.

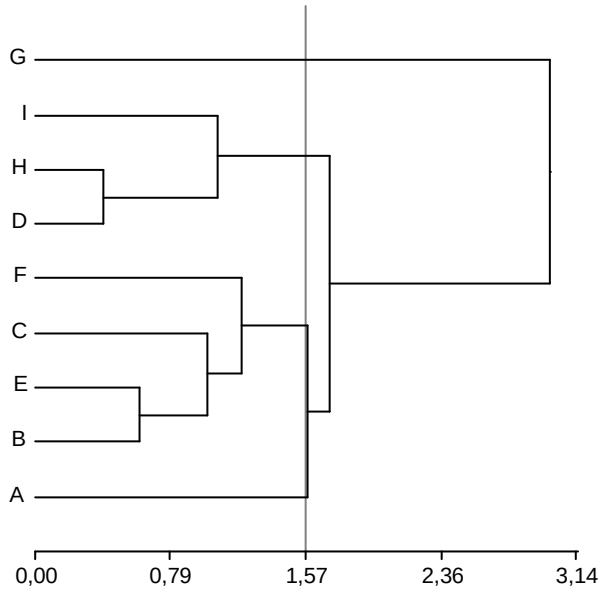


Figura 6. Dendograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de aceptabilidad de las muestras comerciales de orégano.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, es posible destacar que el medio alimenticio utilizado resultó útil para llevar a cabo la prueba de aceptabilidad sensorial de las distintas marcas comerciales de orégano, pudiéndose establecer diferencias significativas entre las mismas en cuanto al atributo *sabor*, no así en el atributo *olor*. Como se observa en la **Tabla 6**, se encontraron diferencias significativas entre las marcas comerciales A y G; entre la marca A y el grupo de marcas D, F, H y entre la marca G y el grupo de marcas B, C, E e I. Las muestras más aceptadas fueron D, F, G y H, mientras que las menos aceptadas fueron A, B, C, E e I. Las diferencias encontradas permiten concluir que el atributo *sabor* sirvió como indicador para comparar la aceptabilidad sensorial de las muestras, no así el atributo *olor*.

Las muestras de orégano evaluadas fueron aceptadas por los consumidores, con medianas de aceptabilidad comprendidas entre *6 –Me gusta ligeramente-* y *7-Me gusta bastante-* para los atributos estudiados. Por otro lado, las medias de aceptabilidad estuvieron comprendidas entre 6,5 y 7,0 para el atributo *olor*, y entre 6,2 y 7,1 para el atributo *sabor*.

A partir del análisis de los resultados, no se obtuvieron los mismos promedios para las variables *olor* y *sabor* en cada muestra. En el caso del atributo *olor*, la marca de menor promedio fue la C, mientras que en lo que respecta al atributo *sabor*, la marca de menor promedio fue la A. Para los dos atributos la marca de mayor promedio fue la G.

El análisis multivariado permitió agrupar las muestras teniendo en cuenta la aceptabilidad de las muestras en cuanto a ambos atributos juntos (olor y sabor). Si se considera que la muestra G es la más aceptada en ambos atributos, se podría suponer que las que se encuentren a menor distancia Euclídea tendrán mejor aceptabilidad considerando los atributos olor y sabor en conjunto. Así, la muestra más alejada de G es la A, por lo que se podría considerar el producto menos aceptado si se consideran ambos atributos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico brindado por UCC y gracias a la participación de todos los jueces intervinientes en la evaluación sensorial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anzaldúa-Morales A. 1994 La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. 1º ed. Zaragoza. Editorial Acribia. Pág. 214.

Arizio OP, Curioni AO. 2007. Argentina: de importar a exportar orégano. Buenos Aires. Asociación Argentina de Economía Agraria.
URL: http://www.cappama.org.ar/descargas/ArgentinaExportadorOregano_curioni%5B1%5D.pdf

Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECYT). 2007: Proyectos Federales de Innovación Productiva
Eslabonamientos Productivos (PFIP-ESPRO): Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo: Especias, hierbas aromáticas y medicinales. Catamarca, Córdoba, Misiones, Salta.

Kokkini S. 1996. Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. En: Padulosi editor. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano. Italy.

Pearson D, Pearson F, Romero C, Miranda J, Suso J. 1993 Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. 3º edición. Zaragoza. Editorial Acribia. Pág. 331.

Peryam DR y Pilgrim FJ. 1957. Hedonic scale method of measuring food preferentes. Food Technology, Vol:1 (9), 9-14.

Watts BM, Ylimanki GL, Jeffery LE, Elías LJ. 1992 Métodos Sensoriales Básicos para la Evaluación de Alimentos. Canadá. International Development Centre. Pág. 170.

Estudio de correlación entre aceptabilidad sensorial y composición química de compuestos orgánicos volátiles en diferentes marcas comerciales de orégano

Study of the correlation between sensory acceptability and chemical composition of volatile organic compounds in different commercial brands of oregano

Demmel GI(1), Nepote MV(2), Grosso NR(3), Olmedo RH(3), Ferrari MC (1), Criado SG(1), Vázquez AM(1)

(1)Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.
(2)ICTA, IMBIV-CONICET - Facultad de Cs. Exactas Físicas y Naturales, UNC, Argentina.
(3)IMBIV-CONICET - Facultad de Cs. Agropecuarias, UNC, Argentina.
gabrielademmel@yahoo.com.ar

RESUMEN

En este trabajo se realizó un estudio de correlación entre la aceptabilidad sensorial y la composición de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) de nueve marcas diferentes de orégano comercializado en Córdoba, Argentina. La prueba de aceptabilidad se realizó utilizando una escala hedónica de 9 puntos (desde 1 – Me disgusta muchísimo-, hasta 9 – Me gusta muchísimo-) para los atributos "*olor*" y "*sabor*", con un panel de 80 jueces no entrenados (consumidores). El estudio de composición de compuestos orgánicos volátiles (COVs) se llevó a cabo a través un método basado en la combinación analítica Micro-Extracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (HS-SPME/CG-MS). El estudio de correlación se llevó a cabo entre las medias de aceptabilidad sensorial obtenidas para cada muestra y las cantidades relativas porcentuales (RA%) de COVs halladas en las muestras, aplicando un análisis de correlación de Spearman con un nivel de significancia de 5 % (α=0,05). De los 56 Compuestos Orgánicos Volátiles hallados en las muestras de orégano, sólo cuatro mostraron correlación significativa con el atributo "*olor*" (*p*-Cimeno, α-Ylangeno, cis-α-Bisaboleno y Salvial-4(14)-en-1-ona) y tres con el atributo "*sabor*" (Estragol, Timol y α-Muroleno). A excepción de *p*-Cimeno, todos lo compuestos anteriores tuvieron correlación positiva, lo que indica que el aumento en la concentración de ellos en las muestras de orégano, aumenta su aceptabilidad por parte de los consumidores. Por el contrario, un aumento en la concentración de *p*-Cimeno, indica que disminuye la aceptabilidad del producto.

ABSTRACT

A study of the correlation between sensory acceptability and composition of volatile organic compounds (VOCs) was performed on nine different brands of oregano marketed in Cordoba, Argentina. The acceptability test of was carried out using a 9-point hedónic scale (from *1 – Unlike extremely*, up to *9 - Like extremely*) to "*odor*" and "*flavor*" attributes, with a panel of 80 non-trained judges (consumers). The study of composition of volatile organic compound (COVs) was permormed using a method based on the technique of Headspace - Solid Phase Microextraction (HS-SPME) with subsequent analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HS-SPME/CG-MS). The correlation study was carried out between the medians of the sensory acceptability obtained for each sample and the percentage relative amounts (RA%) of VOCs found in the samples, using a Spearman correlation analysis with a significance level of 5% (α=0,05). Of the 56 found Volatile Organic Compounds found in samples of oregano, only four showed significant correlation with the attribute "*odor*" (*p*- Cymene, α- Ylangene, cis-α- Bisabolene and Salvial-4 (14) - in-1-one) and three with the attribute "*flavor*" (Estragole, Thymol and α- Murolene). All had positive correlation except for *p*-Cymene, suggesting that the increase in the concentration of them increases the acceptability by

consumers, unlike *p*- Cymene, that an increase in concentration decreases the acceptability by consumers.

PALABRAS CLAVE: *orégano, correlación químico-sensorial.*

KEYOWORDS: *oregano, chemistry-sensorial correlation.*

INTRODUCCIÓN

Origanum vulgare L, (orégano), es una herbácea perenne aromática cuyas hojas desecadas se utilizan como condimento por poseer glándulas productoras de aceite esencial, lo que le da el sabor y aroma que la caracterizan. En Argentina, las especies mayormente cultivadas son híbridos entre *O. vulgare* y *O. mejorana* denominadas *Origanum x aplii* ("*orégano criollo*") y *Origanum x majoricum* ("*orégano mendocino*").

La calidad sensorial de una especia aromática está determinada por su aroma y sabor, las cuales, en última instancia, están estrechamente relacionadas a la composición de su fracción orgánica volátil y la composición química de dicha fracción está determinada por el tipo de variedad de planta utilizada, por las condiciones edafoclimáticas en las que se desarrolló el vegetal y en el caso de las especia desecada, por la metodología y procesos realizados para su deshidratación.

Por esa razón, las herramientas utilizadas para la realización de controles de calidad incluyen análisis químicos (especialmente de Compuestos Orgánicos Volátiles –COVs-) y análisis sensoriales.

En estudios previos (Demmel *et al.* 2009 y Vázquez *et al.* 2009), se evaluó la aceptabilidad sensorial, en sus atributos *olor* y *sabor*, y la composición química de COVs de nueve marcas diferentes de orégano comercializado en Córdoba, Argentina. El estudio de aceptabilidad sensorial se llevó a cabo con un panel de 80 jueces no entrenados (consumidores de orégano), utilizando una escala hedónica de nueve puntos (Pearson 1991). Los resultados del análisis sensorial mostraron diferencias estadísticamente significativas en la aceptación de las diferentes muestras por parte de los consumidores con respecto al atributo *sabor*, no así en el atributo *olor*, obteniéndose un ranking de aceptación entre las marcas más aceptadas (D, F, G y H) y las menos aceptadas (A, B, C, E e I).

Por otro lado, la determinación de COVs se realizó utilizando la combinación analítica Micro-extracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (HS-SPME/CG-MS) la cual fue optimizada previamente para el análisis de las muestras de orégano (Vázquez *et al.* 2009). En estos estudios, se lograron identificar 56 compuestos diferentes. Los resultados de los análisis mostraron además, diferencias estadísticamente significativas en la composición de la fracción volátil de las muestras.

Con la finalidad de determinar el efecto de los COVs sobre la aceptabilidad de las muestras de orégano por parte de los consumidores normales de este condimento, se llevó a cabo un estudio de correlación para tratar de establecer el grado de correspondencia entre los datos químicos obtenidos por HS-SPME/CG-MS y los resultados del análisis sensorial. Para ello, se aplicó un análisis de correlación de Spearman (no paramétrico) con un nivel de significancia del 5 % (α=0,05) entre las *medias* de los atributos sensoriales evaluados (*olor* y *sabor*) y las cantidades relativas porcentuales (RA%) de COVs halladas en las muestras analizadas. Cabe destacar que se seleccionó esta metodología de correlación debido a que el análisis de correlación de Spearman es una medida no paramétrica de asociación basada en rangos (Conover 1999), que puede ser usado para variables cualitativas ordinales (como es el caso de los atributos sensoriales) y para variables discretas o continuas no normales como es el caso de la composición química de un condimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Nueve marcas comerciales de orégano fueron tomadas de distintos puntos del mercado en la ciudad de Córdoba (Argentina), todas con certificado de inscripción en el Registro Nacional de Producto Alimenticio (RNPA). Las mismas se identificaron con letras por orden alfabético desde la A hasta la I. Para el análisis sensorial se asignó a cada muestra un número aleatorio.

Alícuotas de 100,0 ± 0,1mg de orégano se colocaron en viales de vidrio de 20 cm^3 y se analizaron por HS-SPME/CG-MS.

Métodos

La matriz de correlación se construyó con las *medias* de los atributos sensoriales *olor* y *sabor* frente a los datos de cantidad relativa porcentual (RA%) de los 56 COVs hallados, definiendo cada muestra como un bloque para el control local (Di Rienzo *et al.* 2008). Se determinaron los respectivos coeficientes de correlación de Spearman para un nivel de significancia del 5 % (α=0,05). Además, los índices de regresión lineal múltiple se establecieron para un nivel de significancia del 5% (α=0,05) para las variables que mostraron correlación significativa (P<0,05). En este trabajo se utilizó el software Infostat (versión 2008p) desarrollado por la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** presenta los resultados obtenidos del análisis químico y sensorial. La marca de orégano de mayor promedio de aceptabilidad en los atributos *olor* y *sabor* fue la G, mientras que la de menor promedio de aceptabilidad sensorial en el atributo *olor* fue la C y en el atributo *sabor* fue la A. Las **Figuras 1**, **2** y **3** muestran los cromatogramas de dichas muestras.

Tabla 1 Resultados de aceptabilidad sensorial y de análisis químicos, obtenidos en las muestras de orégano analizadas. En el caso de las variables *olor* y *sabor*, se presentan las medias de aceptabilidad sensorial; mientras que en el caso de las variables químicas (COVs), se presentan las cantidades relativas porcentuales (RA%). Los COVs se numeran del 1 al 56 en orden creciente de tiempos de retención.

Variable	Muestras de orégano analizadas								
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**
Olor	6,59	6,56	6,41**	6,80	6,63	6,51	7,03*	6,73	6,88
Sabor	6,21**	6,44	6,55	6,74	6,56	6,79	7,09*	6,71	6,51
1- α-Tujeno	0,39	0,77	0,47	0,37	1,32	0,84	0,92	0,57	1,18
2- Sabineno	0,73	1,43	0,71	0,67	2,50	1,55	1,71	1,10	2,59
3- 1-Octen-3-ol	0,25	0	0,13	0,13	0	0	0	0,12	0
4- Mirceno	0,72	0,43	0,93	0,76	0,88	0,64	0,07	0,54	0,48
5- α-Felandreno	1,12	1,19	1,14	0	0,80	0,92	0,88	1,26	0,65
6- α-Terpineno	1,80	1,68	2,30	0,60	2,43	1,92	1,66	2,08	1,83
7- *p*-Cimeno	4,89	6,77	10,06	1,05	6,47	4,86	0	5,95	4,27
8- β-Felandreno	2,96	0	0	0	0	0	2,26	0	0
9- *cis*-Ocimeno	0,90	0,19	0	0,38	0	0	0	0	0
10- *trans*-β-Ocimeno	0,26	0	0,64	0,23	0,33	0,18	0	0,29	0
11- γ-Terpineno	4,68	4,88	7,04	2,01	9,46	6,17	3,22	5,12	6,73
12- *trans*-Sabineno Hidrato	1,72	3,44	1,35	0,87	7,22	2,20	5,16	2,79	5,89
13- α-Terpinoleno	1,07	0,96	1,03	0,26	1,13	0,70	0,69	1,12	0,93
14- *cis*-Sabineno Hidrato	3,50	4,28	1,64	2,29	6,00	7,28	5,67	2,12	15,62
15- *l*-Linalol	3,85	5,98	1,26	7,37	5,59	6,52	4,54	4,60	2,42
16- p-Menta-2-en-1-ol	1,51	1,40	1,01	0	0,65	0,80	2,34	2,04	2,20
17- 1-Terpineol	1,18	1,11	0,53	0	0,32	0,55	0,90	1,21	0,76
18- *dl*-Borneol	0	0	0,51	0,30	0	0	0,41	0,40	0,13
19- 4-Terpineol	17,36	18,06	12,41	2,62	8,23	14,19	12,10	16,54	6,32
20- α-Terpineol	4,50	3,75	3,09	0,87	2,04	2,87	3,10	3,01	2,60
21- Estragol	0	0	0	0,40	0,40	1,03	0,96	0,87	0
22- Linalil propanoato	0	1,82	2,71	0	1,55	1,66	1,55	2,12	0
23- *cis*-Piperitol	1,42	0,29	0,30	0	0	0,20	0	0,30	0
24- Timil Metil Eter	2,30	2,17	0	1,25	1,48	1,15	1,04	1,31	1,45
25- Carvacrol Metil Eter	4,71	3,39	1,94	1,54	3,22	2,12	2,04	2,95	2,46
26- Timoquinona	0,64	1,35	0,56	0	0,34	0,21	0,19	0,15	0,08
27- Nerol	0	0	0	1,65	0	0	0	0	0
28- Linalil Acetato	5,77	0	0	3,84	0,57	0,23	0	0,38	0
29- *trans*-Anetol	0	0	0	0	0	0,36	0	0	0
30- Carvona	0	0	0,24	0	0	0	0	0	0

Tabla 1: (Continuación)

Variable	Muestras de orégano analizadas								
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**
31- Piperitona	0	0,17	0	0	0	0	0	0	0
32- Timol	13,07	24,40	32,81	55,46	25,29	31,90	34,05	27,88	25,17
33- Carvacrol	9,70	0,74	5,63	3,90	2,10	0,82	0,54	0,57	0,66
34- α-Cubebeno	0	0	0,09	0,13	0	0,17	0	0,07	0,27
35- α-Ylangeno	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0,04
36- α-Copaeno	0	0,12	0,12	0	0,09	0,11	0,10	0,12	0,08
37- Neril Acetato	0,17	0	0	0	0	0	0	0	0
38- β-Burboneno	0	0,27	0,13	0,20	0,16	0,14	0,23	0,17	0,23
39- Geranil Acetato	0,21	0	0	0,49	0	0	0	0,12	0
40- *n*-Tetradecano	0,78	0,08	0	0,14	0	0,16	0,06	0,05	0,11
41- β-Cariofileno	3,79	1,81	3,90	2,21	2,52	2,14	3,18	2,86	2,55
42- β-Cubebeno	0	0,13	0,17	0,16	0,13	0,15	0,16	0,14	0,16
43- Aromadendreno	0,19	0	0,17	0,43	0,13	0,13	0,16	0,29	0,16
44- α-Cariofileno	0,47	0,23	0,39	0,19	0,28	0,27	0,37	0,29	0,33
45- Geranil Acetona	0,19	0,16	0,16	0	0	0,20	0,20	0,12	0,20
46- α-Amorfeno	0	0	0	0,60	0	0	0	0	0
48- Germacreno B	0,14	0,14	0	0	0,29	0,33	0,31	0,21	0,46
49- α-Muroleno	0	0	0	0,14	0,17	0,17	0,09	0,07	0,06
50- β-Bisaboleno	0,61	2,18	0,52	1,26	1,62	2,38	3,16	3,17	3,07
51- δ-Cadineno	0,18	0,23	0,55	0,39	0,33	0,39	0,42	0,32	0,40
52- *cis*-α-Bisaboleno	0	0	0	0	0	0	0,06	0,07	0,09
53- Elemicin	0	0	0	0,06	0	0	0	0	0
54- Spatulenol	0,48	0,18	0,37	0,41	0,19	0,25	0,53	0,42	0,36
55- Óxido de Cariofileno	0,25	0,11	0,14	0,30	0,06	0,10	0,17	0,22	0,17
56- Salvial-4(14)-en-1-ona	0	0	0	0,07	0	0	0,15	0,11	0,11

* Mayor media de aceptabilidad sensorial obtenida.

** Menor media de aceptabilidad sensorial obtenida.

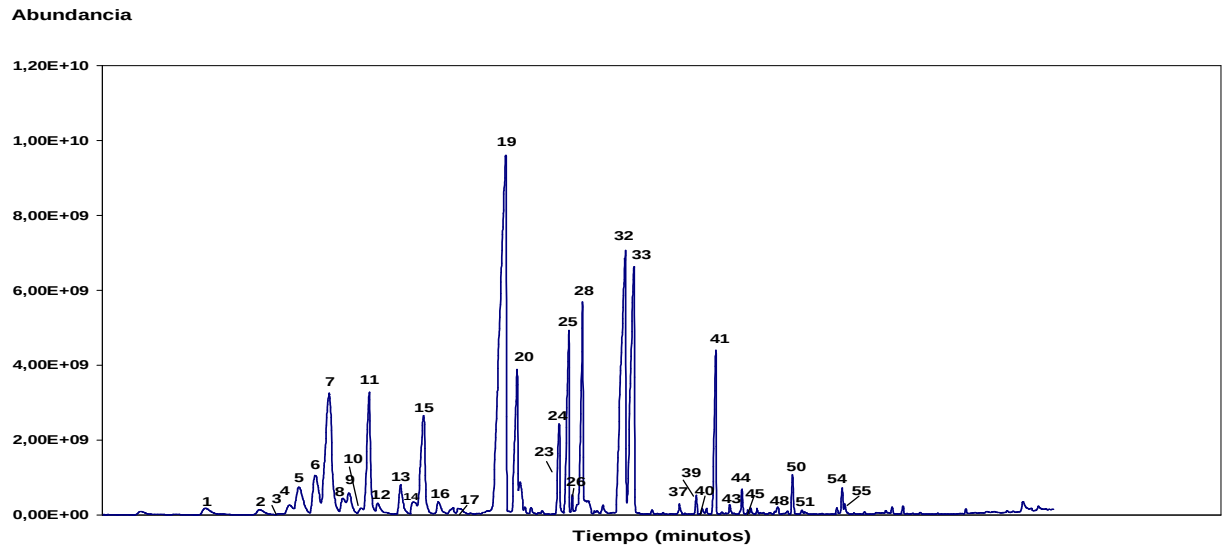


Figura 1. Cromatograma de la marca A de orégano. Corresponde a la muestra de menor promedio de aceptabilidad sensorial con respecto al atributo *sabor*.

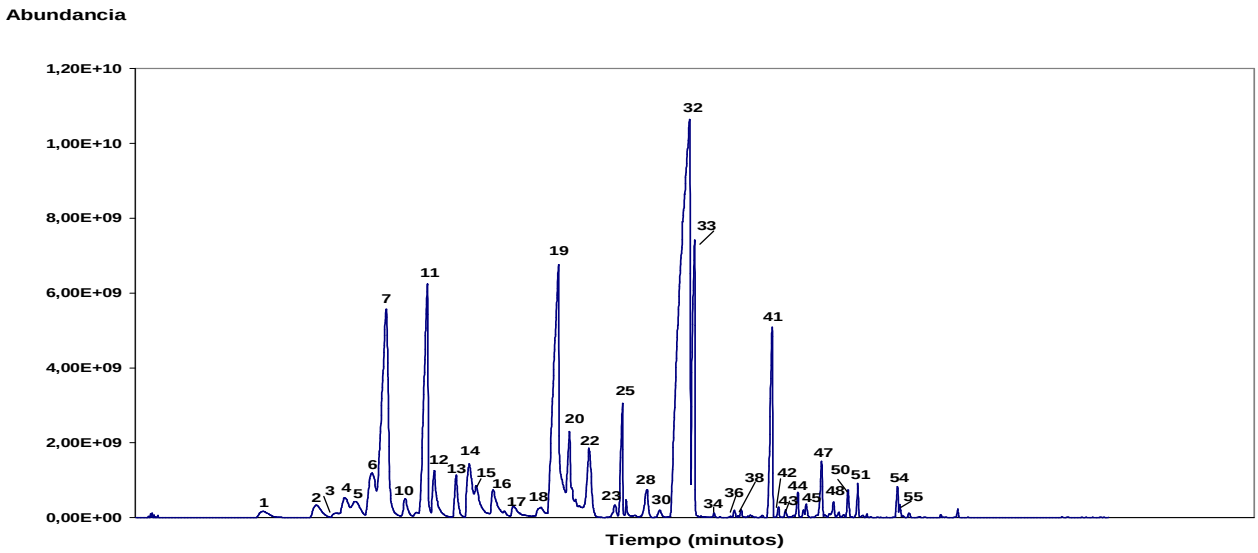


Figura 2. Cromatograma de la marca C de orégano. Corresponde a la muestra de menor promedio de aceptabilidad sensorial con respecto al atributo *olor*.

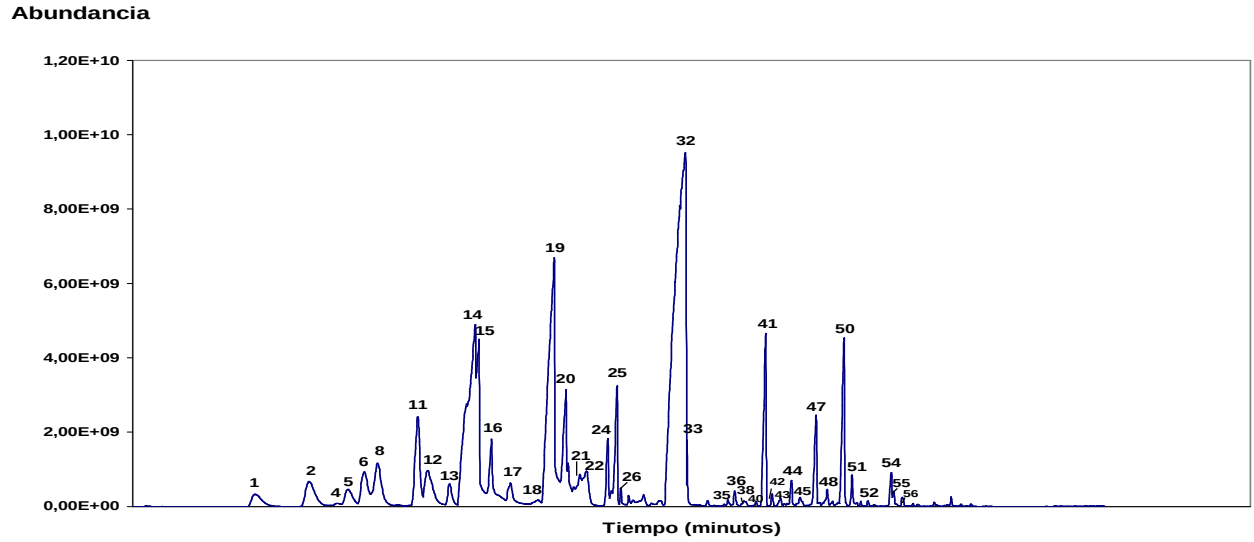


Figura 3. Cromatograma de la marca G de orégano. Corresponde a la muestra de mayor promedio de aceptabilidad sensorial con respecto a los atributos *olor* y *sabor*.

En la **Tabla 2** se muestran los resultados de correlación entre las variables químicas y sensoriales. Como puede ser visualizado allí, se encontró correlación significativa (P<0,05) entre componentes volátiles y la aceptabilidad de las muestras de orégano para los dos atributos evaluados (*olor* y *sabor*).
En el caso de la variable "*olor*", se hallaron correlaciones significativas *positivas* con los compuestos α-Ylangeno (r = 0,77), *cis*-α-Bisaboleno (r = 0,76) y Salvial-4(14)-en-1-ona (r = 0,87); y correlación significativa *negativa* con el compuesto *p*-Cimeno (r = - 0,73).
Por otra parte, en el caso de la variable "*sabor*", se observó correlación significativa *positiva* con los compuestos Estragol (r = 0,94), Timol (r = 0,80) y α-Muroleno (r = 0,76).
Las **Figuras 4** y **5** muestran los gráficos de correlación que resultaron estadísticamente significativos entre COVs y los atributos *olor* y *sabor* respectivamente. Teniendo en cuenta que los datos sensoriales no tienen una distribución normal, los gráficos muestran la tendencia seguida por aquellos COVs que afectaron a los atributos sensoriales, esto es, aquellos cuyas prueba de hipótesis estableció que los coeficientes de correlación (r) eran estadísticamente diferentes de 0 (cero) para un nivel de significancia del 5 % (α=0,05). Como se observa en los gráficos de las **Figuras 4** y **5**, correspondientes a α-Ylangeno, *cis*-α-Bisaboleno, Salvial-4(14)-en-1-ona, Estragol y α-Muroleno, en

ausencia de dichos COVs la variabilidad de resultados en los atributos sensoriales es elevada probablemente debida al efecto del resto de componentes de las muestras, mientras que en presencia de los mismos la tendencia de los atributos sensoriales cambia.

Tabla 2. Correlación entre las medias de los atributos sensoriales (*olor* y *sabor*) y las cantidades de COVs presentes en las muestras de orégano analizadas. La correlación fue expresada como *r* (coeficiente de correlación). Se consideró correlación significativa cuando P<0,05 (5 % de significancia). En la tabla se muestran los valores r/P.

Nº	Compuesto Orgánico Volátil	Atributo sensorial	
		Olor	Sabor
1	α-Tujeno	0,20/0,57	0,25/0,48
2	Sabineno	0,25/0,48	0,22/0,54
3	1-Octen-3-ol	-0,18/0,60	-0,23/0,51
4	β-Mirceno	-0,63/0,07	-0,22/0,54
5	α-Felandreno	-0,40/0,25	0,05/0,90
6	α-Terpineno	-0,40/0,26	0,02/0,96
7	*p*-Cimeno	**-0,73/0,04**	-0,40/0,26
8	β-Felandreno	0,50/0,16	0,30/0,40
9	*cis*-Ocimeno	0,09/0,80	-0,25/0,49
10	*trans*-β-Ocimeno	-0,52/0,14	-0,07/0,85
11	γ-Terpineno	-0,42/0,24	-0,22/0,54
12	α-Terpinoleno	-0,39/0,27	-0,42/0,23
13	*trans*-Sabineno Hidrato	0,35/0,32	0,03/0,92
14	*cis*-Sabineno Hidrato	0,27/0,45	0,13/0,71
15	*l*-Linalol	0	0,42/0,24
16	*p*-Menta-2-en-1-ol	0,43/0,22	-0,03/0,92
17	1-Terpineol	0,05/0,89	-0,38/0,28
18	*dl*-Borneol	0,29/0,41	0,41/0,25
19	4-Terpineol	-0,40/0,26	-0,35/0,32
20	α-Terpineol	-0,25/0,48	-0,28/0,42
21	Estragol	0,39/0,27	**0,94/0,01**
22	Linalil propanoato	-0,40/0,26	0,17/0,64
23	*cis*-Piperitol	-0,62/0,08	-0,56/0,11
24	Timil Metil Eter	-0,13/0,71	-0,63/0,08
25	Carvacrol Metil Eter	-0,17/0,64	-0,67/0,06
26	Timoquinona	-0,57/0,11	-0,54/0,13
27	Nerol	0,50/0,16	0,50/0,16
28	Linalil Acetato	0,05/0,89	-0,03/0,94
29	*trans*-Anetol	0,13/0,72	0,58/0,10
30	Carvona	0,05/0,89	0,28/0,44
31	Piperitona	0,20/0,57	0,13/0,72
32	Timol	0,27/0,45	**0,80/0,02**
33	Carvacrol	-0,58/0,10	-0,40/0,26
34	α-Cubebeno	-0,18/0,60	0,40/0,26
35	α-Ylangeno	**0,77/0,03**	0,43/0,22
36	α-Copaeno	-0,49/0,17	0,25/0,47
37	Neril Acetato	0,28/0,44	0,05/0,89
38	β-Burboneno	0,56/0,11	0,18/0,61
39	Geranil Acetato	0,35/0,33	0,17/0,63
40	*n*-Tetradecano	0,24/0,50	-0,29/0,42
41	β-Cariofileno	0,10/0,78	-0,18/0,60
42	β-Cubebeno	0,5/0,15	0,36/0,31
43	Aromadendrene	0,35/0,32	0,38/0,28

Tabla 2. (Continuación).

Nº	Compuesto Orgánico Volátil	Atributo sensorial	
		Olor	Sabor
44	α-Cariofileno	0,05/0,88	-0,25/0,47
45	Geranil Acetona	-0,38/0,29	-0,38/0,28
46	α-Amorfeno	0,50/0,16	0,50/0,16
47	Germacreno D	0,35/0,33	0,32/0,36
48	Germacreno B	0,38/0,28	0,28/0,44
49	α-Muroleno	0,28/0,43	**0,76/0,03**
50	β-Bisaboleno	0,58/0,10	0,4/0,26
51	δ-Cadineno	-0,12/0,74	0,47/0,19
52	cis-α-Bisaboleno	**0,76/0,03**	0,30/0,40
53	Elemicin	0,50/0,16	0,50/0,16
54	Spatulenol	0,33/0,35	0,18/0,60
55	Óxido de Cariofileno	0,46/0,19	-0,05/0,90
56	Salvial-4(14)-en-1-ona	**0,87/0,01**	0,53/0,13

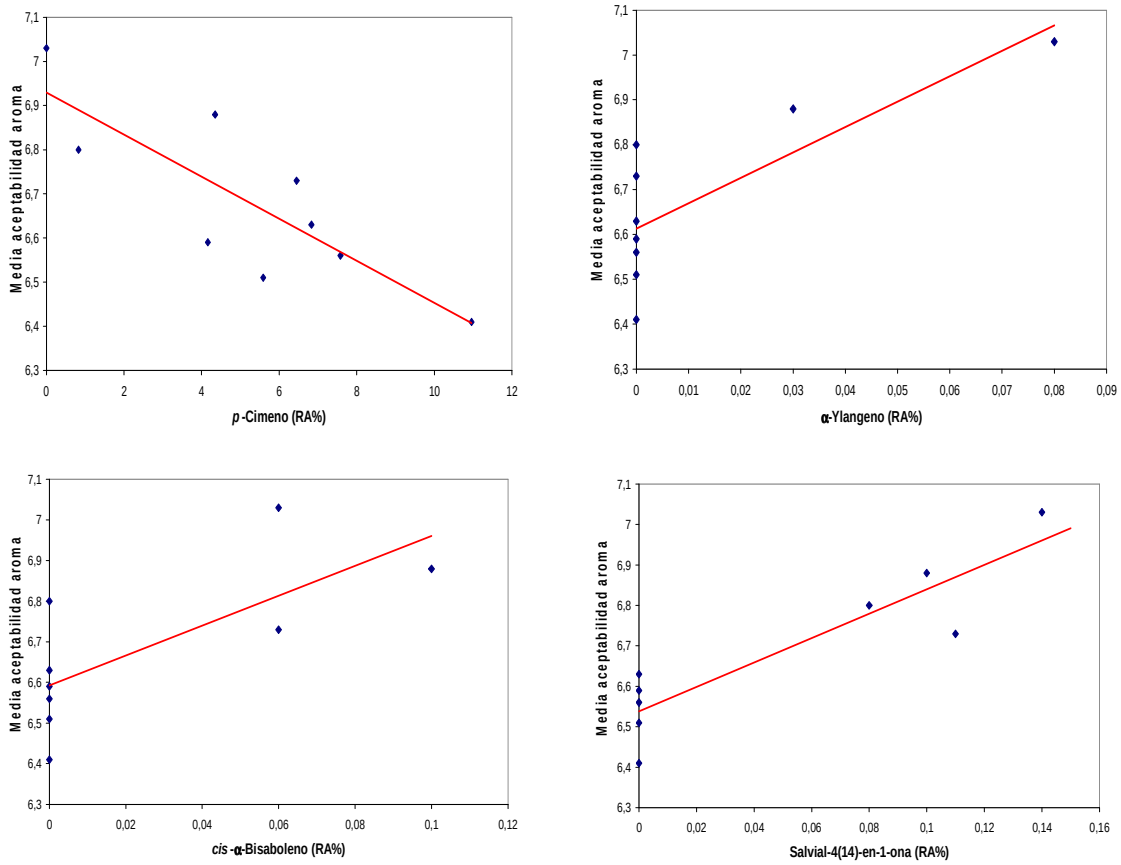


Figura 4. Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo *olor* vs. *p*-Cimeno, α-Ylangeno, *cis*-α-Bisaboleno y Salvial-4(14)-en-1-ona. Los coeficientes de correlación de Spearman (r) fueron – 0,93; 0,77; 0,76 y 0,87 respectivamente, los cuales resultaron estadísticamente significativos (P<0,05) para un nivel de significancia del 5 % (α=0,05).

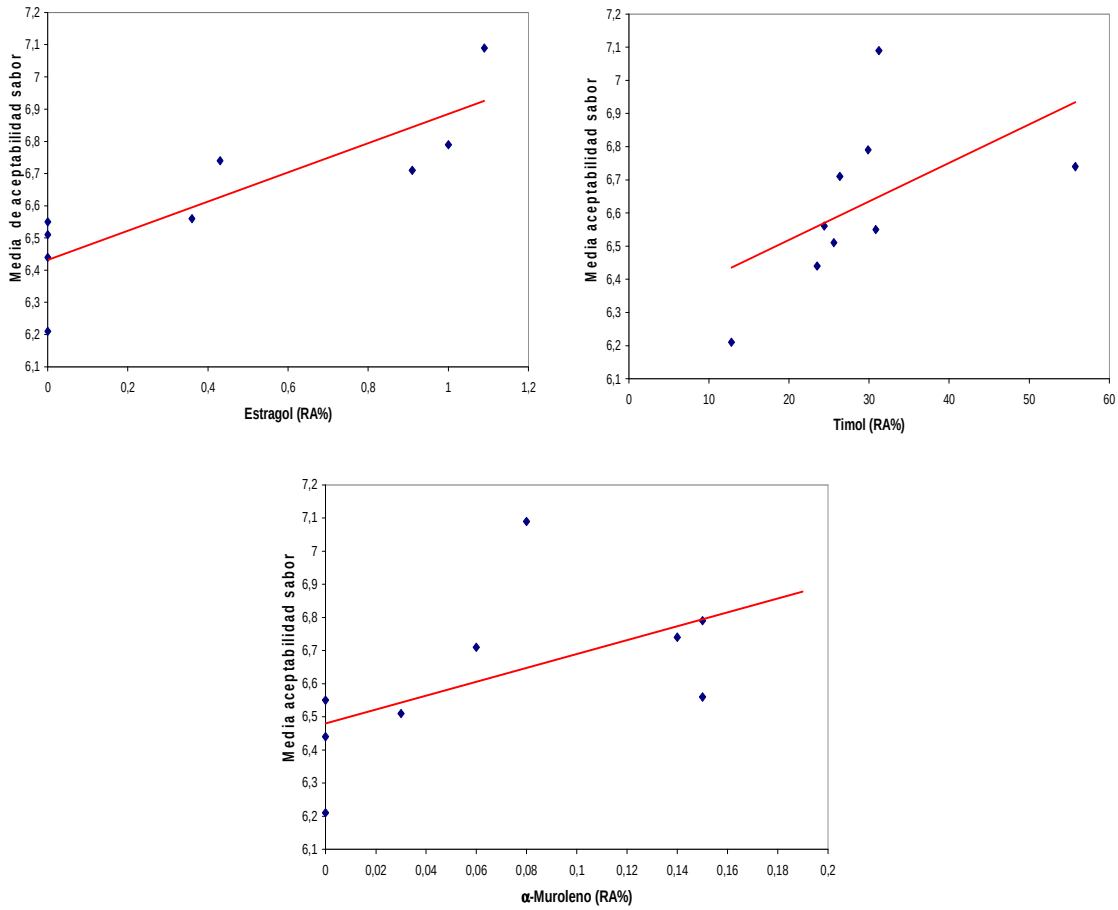


Figura 5. Gráficos de correlación lineal significativos entre las medias de aceptabilidad obtenidas para el atributo *sabor* vs. Estragol, Timol y α-Muroleno. Los coeficientes de correlación de Spearman (r) fueron 0,94; 0,80 y 0,76 respectivamente, los cuales resultaron estadísticamente significativos (P<0,05) para un nivel de significancia del 5 % (α=0,05).

A partir de los resultados de correlación lineal se determinaron modelos de Regresión Lineal Múltiple (RLM) para las variables químicas que afectaron al atributo *olor* por un lado, y al atributo *sabor* por el otro. En ellos se consideraron los compuestos volátiles como variables independientes (X) y las medias de aceptabilidad como variables dependientes (Y):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \ldots + \beta_n X_n \qquad \text{Ecuación 1: Modelo de RLM}$$

Se determinaron los estimadores estadísticos (b_0 –ordenada- y b_1 –pendiente-) y se aplicaron pruebas de hipótesis para determinar si eran significativos a un nivel de significancia del 5 % (P<0,05). La **Tabla 3** muestra los estimadores estadísticos de la regresión con respecto a *olor* y la **Tabla 4**, los estimadores de la regresión con respecto a *sabor*, todos con sus respectivos valores de P. En ellas se muestran también los respectivos coeficientes de determinación (R^2) del modelo.
A partir de los coeficientes de determinación encontrados, el 95 % de la variabilidad en la aceptabilidad del *olor* se puede explicar por la variabilidad de las cantidades relativas porcentuales de *p*-Cimeno, α-Ylangeno, *cis*-α-Bisaboleno y Salvial-4(14)-en-1-ona, mientras que el 85 % de la variabilidad en la aceptabilidad del *sabor* se puede explicar por la variabilidad de las cantidades relativas porcentuales de Estragol, Timol y α-Muroleno. En ambos modelos de RLM, los estimadores de la ordenada (b_0) resultaron estadísticamente significativos (P<0,05), mientras que sólo los estimadores de las pendientes de *p*-Cimeno (b_1, olor) y Estragol (b_1, sabor) resultaron estadísticamente significativos (P<0,05).

Tabla 3: Estimadores de RLM para el atributo *olor*. El valor del coeficiente de determinación del modelo de RLM (R^2) fue 0,95.

Coeficiente de regresión lineal	Estimador	P
Ordenada (β_0)	6,73	<0,0001
p-Cimeno (β_1)	-0,03	0,0065
α-Ylangeno (β_2)	1,12	0,4008
cis-α-Bisaboleno (β_3)	1,2	0,3361
Salvial-4(14)-en-1-ona (β_4)	1,05	0,2929

Tabla 4: Estimadores de RLM para el atributo *sabor*. El valor del coeficiente de determinación del modelo de RLM (R^2) fue 0,85.

Coeficiente de regresión lineal	Estimador	P
Ordenada (β_0)	6,22	<0,0001
Estragol (β_1)	0,46	0,0112
Timol (β_2)	0,01	0,0943
α-Muroleno (β_3)	-0,75	0,4676

CONCLUSIONES

Los resultados de la evaluación sensorial con respecto a los atributos estudiados mostraron diferencias significativas en la aceptabilidad de las muestras sólo para el atributo *sabor*. Sin embargo, cuando se correlacionaron los resultados de la evaluación sensorial con las variables químicas (COVs), se encontraron asociaciones lineales significativas entre las concentraciones de algunos compuestos volátiles y la aceptabilidad sensorial de las muestras tanto en lo que respecta al *olor* como al *sabor*.

A partir de las correlaciones *positivas* encontradas se puede decir que el incremento de las concentraciones de α-Ylangeno, *cis*-α-Bisaboleno y Salvial-4(14)-en-1-ona tendrían un efecto positivo aumentando la aceptabilidad del *olor* de las muestras de orégano, mientras que el incremento de las concentraciones de Estragol, Timol y α-Muroleno tendría un efecto positivo, aumentando la aceptabilidad del *sabor* de las mismas muestras por parte de los consumidores.

Por otro lado, a partir de la única correlación negativa encontrada, se puede decir que el aumento de la concentración de *p*-Cimeno tendría un efecto negativo, disminuyendo la aceptabilidad del *olor* de las muestras de orégano por parte de los consumidores.

Los resultados obtenidos de la RLM indican que un alto porcentaje de la variabilidad en la aceptabilidad de los atributos estudiados es explicada por la variabilidad en la composición de los compuestos volátiles correlacionados. Además, los componentes que más afectaron al modelo de RLM fueron *p*-Cimeno para la aceptabilidad del *olor* y Estragol para la aceptabilidad del *sabor*.

En la actualidad, se están llevando a cabo estudios tendientes a determinar qué especies de orégano, cultivadas en nuestra provincia, presentan mayor contenido de α-Ylangeno, *cis*-α-Bisaboleno, Salvial-4(14)-en-1-ona, Estragol, Timol y α-Muroleno y menor contenido de *p*-Cimeno, para diseñar un orégano comercial que presente mayor aceptabilidad por parte de los potenciales consumidores de esta hierba aromática.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico brindado por: UCC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Conover WJ. 1999. Practical Non-parametric Statistics. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Demmel GI, Nepote MV, Grosso NR, Olmedo RH, Ferrari MC, Criado SG y Vázquez AM. 2009. Análisis sensorial de diferentes marcas comerciales de orégano. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba Argentina. Código GP8.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Gonzalez LA, Tablada EM, Díaz MP, Robledo CW y Balzarini MG. 2008. Estadística para las ciencias agropecuarias. 7º edición. Editorial Brujas. Córdoba. Argentina.

Pearson, D. 1991 "Técnicas de laboratorio para análisis de alimentos", Editorial Acribia, Zaragoza.

Vázquez AM, Demmel GI, Ferrari MC, Criado SG, Cavaglia DJ, Aimar ML. 2009. Determinación de la composición química del aroma de orégano comercial mediante micro extracción en fase sólida con posterior análisis por CG/MS. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba Argentina. Código GP-9.

Vázquez AM, Demmel GI, Ferrari MC, Criado SG, Cavaglia DJ, Aimar ML. 2009. Optimización del método de Microextracción en Fase Sólida/Cromatografía Gas-Masa para la determinación de la composición del aroma de orégano comercial. III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba. Argentina. Código GP-10.

Contenido de lípidos, separación en fracciones y composición acídica de una marca comercial de yerba mate elaborada

Lipid content, fraction separation and acidic composition of a commercial mate tee (*Ilex paraguayensis*) brand

Escalada MA(1), Argüello MF(1), Matto IY(1), Naranjo G (2), Argüello B del V (1), Malec LS (2)

(1) FCEQyN - Universidad Nacional de Misiones, Argentina
(2)FCEN- Universidad de Buenos Aires, Argentina
CP. 1428 Dpto. Química Orgánica. Área Bromatología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Buenos Aires, Argentina.
malec@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

La naturaleza de los lípidos presentes en la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) y su distribución en fracciones de diferente polaridad, aún no han sido completamente determinadas. El único antecedente referente a lípidos en este vegetal, data de hace varios años. Actualmente se desconoce si las nuevas tecnologías de secado y estacionamiento incorporadas a su proceso de elaboración, producen cambios en la composición lipídica del producto final. El objetivo de este trabajo fue estudiar, en una primera etapa, el contenido lipídico de una marca comercial de yerba mate elaborada, determinar la proporción de las fracciones de lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos y analizar la composición acídica de las mismas. En una etapa posterior se prevé analizar los cambios que ocurren en los lípidos durante el procesamiento de este producto. Se compararon dos métodos comúnmente empleados para la extracción de lípidos utilizando hexano en el primero y en el segundo una mezcla cloroformo-metanol (2:1) (método Folch). Los lípidos totales obtenidos por este último método se fraccionaron en columna de ácido silícico en lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos utilizando como eluyentes cloroformo, acetona y metanol respectivamente. Los solventes se evaporaron a sequedad y los porcentajes de cada fracción se determinaron gravimétricamente. Los pigmentos fueron eliminados utilizando una columna de Carbón:Celite (2:1, p/p). Para determinar la composición acídica, los ésteres metílicos se analizaron por cromatografía gas-líquido. El contenido de lípidos obtenido con la mezcla cloroformo-metanol fue de 2,65 ± 0,12 (b.s.), muy superior al obtenido por extracción con hexano (0,48 ± 0.04% b.s.), lo que podría deberse a la presencia de elevadas cantidades de lípidos polares, que se encuentran comúnmente en hojas verdes. Los porcentajes de cada fracción lipídica obtenida fueron: 30,6% de lípidos neutros, 64,3% de glucolípidos y 5,1% de fosfolípidos, confirmando el alto contenido en lípidos polares, en especial de glucolípidos, presentes en la yerba mate. El porcentaje de glucolípidos fue el más elevado después de la separación en fracciones; sin embargo, por efecto del proceso de decoloración, pudo observarse una marcada disminución de su valor, a causa de la eliminación de la importante cantidad de pigmentos presentes en esa fracción. De esta forma, la decoloración de las fracciones reveló que los gliceroles neutros resultaron ser los predominantes (87,9%). Del análisis de la composición acídica se deduce que la fracción no polar (lípidos neutros) está constituida, en su mayor parte, por el ácido graso 16:0, mientras que las fracciones polares (glucolípidos y fosfolípidos), además del ácido 16:0, presentan cantidades significativas de los ácidos insaturados 18:1, 18:2 y 20:1.

ABSTRACT

The nature of lipids present in the yerba mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and its distribution in fractions of different polarity were already not completely studied. The only previous work related to the lipids of this vegetable was carried out a few years ago. Today is unknown if the new drying and storage technologies in its manufacture process could produce changes in the acidic composition of this product. This study was undertaken to obtain information about the lipid content in a trademark of mate to determine the proportions of neutral lipids, glycolipids and phospholipids and to analyze their acidic composition. In a further analysis, changes in lipid fraction during the process of this product

will be investigated. This study started comparing two extraction methods, with solvents commonly used for lipids, the first employing hexane and the second using chloroform-methanol (2:1) (Folch). The lipids obtained with the last method, were fractioned by a silicic acid column into neutral lipids, glycolipids and phospholipids, using chloroform, acetone and methanol respectively as eluents. The solvents were evaporated to dryness and each fraction percent was estimated gravimetrically. Pigments were removed from the fractions by using a Charcoal - Celite column (2:1, w/w). Acyl lipids were converted into fatty acid methyl esters with methanol-sulfuric acid, and analyzed by using a gas chromatograph fitted with a flame ionization detector. The lipids content obtained with chloroform-methanol was 2,65 ± 0,12 (b.s.), very higher than the obtained with hexane (0,48 ± 0.04% b.s.). This could be due to the presence of high amounts of polar lipids, which are commonly found in green leaves. The percentages of each lipid fraction were: 30.6% neutral lipids, 64.3% glycolipids and 5.1% phospholipids, confirming the high content of polar lipids, especially glycolipids, present in yerba mate. The main fraction obtained was the glycolipidic, although, after the removal of pigments, it decreased markedly. In this way, the neutral acylglycerols (87, 9%) became the most important after discoloring. From the analysis of the acidic composition, it follows that in the non-polar fraction (neutral lipids) the major fatty acid was 16:0, while the polar fractions (glycolipids and phospholipids), in addition to the 16:0 acid, contained significant amounts of unsaturated acids 18:1, 18:2 and 20:1.

PALABRAS CLAVES: *Lípidos, Ilex paraguarienses St. Hil., yerba mate, composición acídica.*

KEYWORDS: *Lipids, Ilex paraguariensis St. Hil., acidic composition.*

INTRODUCCIÓN

La yerba mate es un estimulante del sistema nervioso de origen vegetal, de consumo extendido en algunos países de Sudamérica como Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. El proceso de elaboración comprende la recolección del follaje y una serie de operaciones sucesivas: sapecado, presecado, secado, canchado y estacionamiento. Las mismas tienen como objetivo la detención de los procesos enzimáticos a través de un tratamiento térmico, la reducción de la humedad hasta un 3% y una molienda grosera que aumenta la superficie expuesta y el almacenamiento del producto por un periodo de 9 a 24 meses (estacionamiento natural), para favorecer el desarrollo de caracteres organolépticos requeridos por el consumidor.

Existe muy poca información acerca de cuáles son las transformaciones que conducen al desarrollo del flavor característico, aunque se supone que las reacciones involucradas son oxidativas, ya que requieren la presencia de oxígeno (Fanti y Kohan 1970). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la elaboración de otras infusiones como el té negro, no son reacciones de naturaleza enzimática, debido a que durante el sapecado se inactivan las enzimas (Xander 1999). A pesar de que el contenido de lípidos en los tejidos vegetales es bajo, juegan un papel importante en la generación del flavor durante la elaboración del té negro (Mahanta *et al*. 1993, Selvendran *et al* 1978 y Springett *et al*. 1994). La degradación oxidativa de los ácidos grasos insaturados ha sido identificada como uno de los principales mecanismos involucrados en dicho proceso (Bhuyan 1991, Ravichandran 2000, Lam y Proctor 1994).

La naturaleza de los lípidos presentes en la yerba mate (*Ilex paraguarienses* St. Hil.) y su distribución en fracciones de diferente polaridad, aún no han sido completamente determinadas. El único antecedente referente a lípidos en este vegetal, data de hace varios años (Bertoni 1992). Actualmente se desconoce si las nuevas tecnologías de secado y estacionamiento incorporadas a su proceso de elaboración, producen cambios en la composición lipídica del producto final.

El conocimiento de la composición lipídica de la yerba mate podría ser utilizado para optimizar o modificar su proceso y preservar sus cualidades, buscando incrementar el consumo sobre la base de sus propiedades y lograr nuevos mercados.

El objetivo de este trabajo fue estudiar, en una primera etapa, el contenido lipídico de una marca comercial de yerba mate elaborada, determinar la proporción de las fracciones de lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos y analizar la composición acídica de las mismas. Para ello se compararon dos métodos de extracción de lípidos con solventes habitualmente empleados en vegetales y luego el extracto crudo (EC) de lípidos obtenido con Folch se separó en fracciones de diferente polaridad: lípidos neutros (LN), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (PL) para determinar la composición acídica de

los extractos y de sus fracciones correspondientes. En una etapa posterior se prevé analizar los cambios que ocurren en los lípidos durante el procesamiento de este producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La muestra inicial se obtuvo mezclando y cuarteando 5 paquetes de 1 kg de 5 lotes de producción diferentes, de yerba mate elaborada con palos y estacionada en forma natural en el establecimiento Molinos Río de la Plata S.A. La yerba mate contenida en dichos paquetes, fue cosechada en el año 2007, en plantaciones de las regiones centro y sur de la Provincia de Misiones (Argentina), y fue acopiada en secaderos ubicados en Jardín América, Oberá y San José.

Los solventes de extracción, de purificación y todos los reactivos fueron de grado analítico: hexano, metanol, cloroformo, acetona, ácido sulfúrico concentrado y Celite 545 de Merck (Darmstadt, Germany); ácido silícico (100 mesh) de Mallinckrodt (Hazelwood, MO, USA); carbón activado para decolorar de Carlo Erba (Milano, Italy) y patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos para cromatografía de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Conservación de las muestras, los extractos y las fracciones

La muestra inicial de yerba mate elaborada, se conservó bajo atmósfera inerte de Nitrógeno, a 4 ºC y en ausencia de luz, para evitar la oxidación de los lípidos, durante la realización del estudio. Los extractos y las fracciones lipídicas se conservaron disueltas en cloroformo, en frascos de vidrio de color caramelo, bajo atmósfera de Nitrógeno a -18 ºC.

Determinación del contenido de Humedad

Se realizó por triplicado, por secado en estufa de vacío (100 mmHg), hasta peso constante a 100 - 105º C.

Comparación de métodos de extracción de lípidos

El extracto crudo de lípidos se obtuvo utilizando dos métodos de extracción con solventes, a) con hexano, y b) con cloroformo-metanol (Folch 1957).

Hexano. Los lípidos se extrajeron con hexano en extractor Soxhlet, durante 4 horas. El extracto se evaporó en evaporador rotatorio a sequedad y se determinó el porcentaje en forma gravimétrica. Este análisis se realizó por triplicado.

Método de Folch. Los extractos crudos (EC) se extrajeron por triplicado con una mezcla de cloroformo - metanol (2:1). Se filtró a través de papel de filtro, luego se le agregó una solución de cloruro de sodio 0,29 % de manera que la proporción final de solventes en la ampolla fuera de: cloroformo-metanol-agua (2:1:0,75). La capa etérea se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, se filtró, se evaporó en evaporador rotario hasta un mínimo volumen y se llevó a sequedad con Nitrógeno gaseoso. El porcentaje de lípidos crudos se determinó gravimétricamente.

Fraccionamiento de lípidos

Se utilizó una columna de vidrio con robinete de teflón de 2,5cm de diámetro, y 50cm de largo, rellena con ácido silícico, hasta una altura de 8cm (1g de ácido silícico por cada 30mg de extracto a separar). La separación en fracciones se efectuó por duplicado a partir del extracto crudo sin decolorar obtenido por el método Folch a una velocidad de flujo de la fase móvil de 1-3 mL/min.; utilizando como eluyente cloroformo para los lípidos neutros, acetona para los glucolípidos y metanol para los fosfolípidos (Rouser 1967). Las fracciones se recogieron en balones previamente tarados, los solventes se evaporaron en evaporador rotatorio y se llevaron a sequedad con corriente de Nitrógeno. Los porcentajes de las fracciones se determinaron gravimétricamente.

Extracción de pigmentos vegetales

Previamente al análisis de la composición acídica de cada fracción, se eliminaron los pigmentos a fin de evitar posibles interferencias. Los extractos crudos y las fracciones de GL, se disolvieron en cloroformo y se decoloraron en una columna de vidrio de un diámetro interno mayor de 2,5cm, rellena con una mezcla de carbón-celite (2:1 p/p) (Khor 1979). Los pigmentos presentes en las fracciones de lípidos neutros y fosfolípidos disueltas en cloroformo, se separaron en una columna de vidrio de un diámetro interno de 1,5cm. Las fracciones decoloradas se evaporaron inmediatamente en evaporador rotatorio y en corriente de Nitrógeno y sus porcentajes se determinaron gravimétricamente. Esta purificación se realizó en todos los replicados de EC, así como en cada una de sus fracciones correspondientes (LN, GL y PL) obtenidas por separación en columna.

Cromatografía Gaseosa de ésteres metílicos de ácidos grasos

Todos los extractos crudos y todas las fracciones de LN, GL y PL, libres de pigmentos, se llevaron a sequedad en corriente de Nitrógeno. Luego se transesterificaron como se describe en Indarti (2005), en un solo paso, utilizando ácido sulfúrico 1% en metanol y cloroformo como co-solvente para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. Se mantuvieron a 50º C durante una noche, luego se adicionó 1ml de solución de NaCl 5% a la mezcla y se agitó suavemente durante 1min hasta la formación de dos fases. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se utilizó para el análisis de la composición acídica por cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos, utilizando un cromatógrafo gaseoso Shimadzu 17A (Japan), equipado con inyector split-splitless, detector de ionización de llama y una columna capilar DB-23 ((50%-cianopropil)-(metilpolisiloxano), 30m x 0.25mm di x 0.25µm espesor de película (J&W Scientific, USA). Las inyecciones fueron realizadas por triplicado en modo split (relación 1:10), empleando nitrógeno como gas portador (flujo = 0,5 mL/min.). La temperatura del inyector y detector fue de 230º C. El análisis se llevó a cabo utilizando el siguiente programa de temperatura: 5 minutos a 140º C y luego un incremento hasta 190º C a 4º C/min., manteniendo esta temperatura por 18 minutos; posteriormente, a una velocidad de 10º C/min., la temperatura se llevó a 200º C y se mantuvo por 20 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de lípidos obtenido con la mezcla cloroformo-metanol (método de Folch) fue de 2,65 ± 0,12 (b.s.), muy superior al obtenido por extracción con hexano (0,48 ± 0.04% b.s.). Esta diferencia se debe a que utilizando hexano se extraen sólo los lípidos no polares solubles en este solvente (Moureau, 2005), lo que impide la obtención de glucolípidos y fosfolípidos por este método. Además, el contenido de lípidos neutros presentes en la yerba mate elaborada, hallado por Bertoni (1992), es considerablemente bajo. En cambio, la mezcla cloroformo-metanol permite también la extracción de lípidos polares (glucolípidos y fosfolípidos), que se encuentran en la yerba mate elaborada en un porcentaje significativo. Por este motivo, se seleccionó el método de Folch para extraer los lípidos de la yerba mate.

En la **Tabla 1** figuran los porcentajes de extracto crudo y de fracciones de lípidos neutros, glucolípidos y fosfolípidos obtenidas luego de la separación en columna de ácido silícico. Previo a la decoloración, todos los extractos presentaban un color verde oscuro debido a los elevados contenidos de clorofilas a y b (Schmalko *et al.* 2005). Como puede observarse a partir de los valores obtenidos tras el proceso de decoloración con carbón-celite, las proporciones de las fracciones de lípidos neutros y de glucolípidos variaron significativamente. Esto se debe a que en el fraccionamiento, los pigmentos quedaron en las fracciones polares, fundamentalmente en la de glucolípidos (GL). Por lo tanto, al eliminarse estos y quedar los gliceroles como principales componentes en cada fracción, aumentó considerablemente la proporción de lípidos neutros (LN) y disminuyó la de glucolípidos (GL).

Tabla 1. Porcentaje en peso de extracto crudo (EC) de lípidos de una marca comercial de yerba mate elaborada y sus fracciones de lípidos neutros (LN), glucolípidos (GL) y fosfolípidos (PL) obtenidas luego de la separación en columna de ácido silícico.

	EC (% peso b.s. de yerba elaborada)	**LN (% peso del EC)**	**% GL (% peso del EC)**	**% PL (% peso del EC)**
Sin decolorar	2,6	30,6	64,3	5,1
Decolorado	2,0	87,9	6,2	5,9

Al analizar la composición acídica del extracto crudo decolorado puede observarse (**Tabla 2**) que predominan como componentes mayoritarios el ácido palmítico (16:0) y el ácido oleico (18:1). Los ácidos esteárico (18:0) y gadoleico (20:1) se encuentran en un porcentaje cercano al 5%, mientras que los ácidos mirístico (14:0), palmitoleico (16:1), linoleico (18:2) y araquídico (20:0) se encuentran en porcentajes menores al 5%. Con respecto a la composición acídica de las tres fracciones lipídicas decoloradas, el ácido graso mayoritario fue el 16:0, alcanzando valores muy importantes en todas, presentando su máximo aporte en la fracción correspondiente a los lípidos neutros en la que alcanzó

un 80,5%. En las fracciones polares, se observaron valores de los ácidos 18:0, 18:1 y 20:1 mayores a un 5%.

Tabla 2. Composición acídica del extracto crudo decolorado obtenido de una marca comercial de yerba mate elaborada, por el método de Folch y de sus fracciones lípidicas decoloradas.

	Ácidos grasos (% en peso)								
	14:0	**16:0**	**16:1**	**18:0**	**18:1**	**18:2**	**20:0**	**20:1**	**Otros**
Extracto crudo (Folch)	1.7	66.5	0.4	5.4	12.7	2.4	1.7	5.6	3.6
Lípidos Neutros	1.0	80.5	0.2	4.7	7.3	1.5	1.8	1.2	1.8
Glucolípidos	6.9	53.0	0.9	6.8	12.9	3.2	---	13.9	2.4
Fosfolípidos	6.0	36.0	3.5	14.4	9.3	5.5	7.5	15.7	2.1

Los ácidos grasos presentes en mayor cantidad en las hojas de diversos vegetales, en general, son linolénico (18:3), 18:2 y 16:0 (Hitchcock C y Nichols BW 1971) variando sus concentraciones con las distintas especies. Según Bertoni *et al*. (1992) los porcentajes de 18:2 y 18:3 en las hojas verdes de *Ilex paragueriensis* St. Hil. por extracción con hexano, se encontrarían en un 18% y 27,9% b.s.
En cambio, la yerba mate elaborada, presentó un elevado porcentaje en peso del ácido 16:0, tanto en el extracto crudo decolorado obtenido con Folch como en las tres fracciones lipídicas decoloradas. Se observó además, un contenido de 18:2 menor al 10% siendo más importante en los lípidos polares (GL y PL), y que podría estar relacionado con la presencia de este ácido graso esencial en las membranas de los cloroplastos, ricas en este tipo de lípidos.
Las cantidades de 18:3 resultaron inferiores al 1%. Los bajos porcentajes de ácidos grasos poliinsaturados hallados en la yerba elaborada, comparados con los obtenidos por otros investigadores en hojas verdes de esta y otras especies, lleva a suponer que éstos disminuyen por oxidación durante el proceso de elaboración y el estacionamiento, para transformarse en compuestos volátiles que le brindan al producto su flavor característico.
Por lo tanto, el tratamiento térmico enérgico en el proceso (sapecado) así como el prolongado estacionamiento durante 6 meses a1 año, causarían una pérdida significativa de los ácidos grasos esenciales 18:2 y 18:3 asociados a las fracciones polares, con la consecuente pérdida del valor nutricional del producto elaborado por lo que deberían estudiarse alternativas al proceso tradicional de elaboración de la yerba mate que permitieran conservar en mayor medida el valor nutricional de este producto vegetal.

CONCLUSIONES

El porcentaje de glucolípidos fue el más elevado después de la separación en fracciones; sin embargo, por efecto del proceso de decoloración, pudo observarse una marcada disminución de su valor, a causa de la eliminación de la importante cantidad de pigmentos presentes en esa fracción. De esta forma, la decoloración de las fracciones reveló que los gliceroles neutros resultaron ser los predominantes. Del análisis de la composición acídica del extracto crudo decolorado y de las tres fracciones lipídicas decoloradas, se deduce que la fracción no polar (lípidos neutros) está constituida, en su mayor parte, por 16:0. Mientras que en las fracciones polares (glucolípidos y fosfolípidos decolorados), aunque este ácido graso es también el mayoritario, su proporción es considerablemente menor, y presentan, en cambio, mayores proporciones de los ácidos insaturados, principalmente 18:1, 18:2 y 20:1.
En etapas posteriores de esta investigación se intentará identificar cuál de las etapas del proceso tradicional de elaboración de la yerba mate es la causante de la mayor pérdida de ácidos grasos esenciales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subsidiado parcialmente por la Secretaría General de Ciencia y Tecnología (SGCyT) de la Universidad Nacional de Misiones (UnaM).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bertoni MH, Prat Kricun SD, Känzing RG, Cattaneo P. 1992. Hojas frescas de *Ilex paraguarienses* Saint Hil. III. Influencia de las distintas etapas del proceso tradicional de elaboración de Yerba Mate (zapecado, secado+canchado y estacionamiento) sobre la composición de hoja fresca del clon 44/75, cosecha 1988. Anales Asociación Química Argentina, 80: 493-501.

Bhuyan L P, Tamuly P, Mahanta P Kr**.** 1991. Lipid Content and Fatty Acid Composition of Tea Shoot and Manufactured Tea. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 39: 1159-1162.

Carroll KK, Serdarevich B. 1967. Lipid Chromatographic Analysis. Rochester New York Ed: Marcel Dekker. 1: 205-237.

Christie WW. 2003. Lipid analysis: Isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. Bridgwater, UK: Oily Press

Fanti O, Kohan E. 1970. Fijación de oxígeno en la yerba mate canchada sin estacionar. Revista de Investigaciones Agropecuarias. INTA. Bs. As. Serie II. Biología y producción vegetal. 7. Nº 3.

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total of total lipids from animal tissue. Journal of Biological Chemistry 226: 497 -509.

Hitchcock C, Nichols BW 1971. Plant Lipid Biochemistry. Academic Press. New York 66-90

Indarti E, Abul Majid MI, Hashim R, Chong A. 2005. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 161-170.

Khor HT. 1979. Removal of chlorophyll pigments from plant neutral lipids. Journal of Chromatography, 179: 225-226.

Lakshminarayana G, Pantulu AJ, Rao KS.1984. Lipid Class and Fatty Acid Compositions of Young Amaranthus gangeticus L. Leaves. Journal Agriculture and Food Chemistry 32: 1361-1363.

Lam HS, Proctor A. 1994. Hydrolysis of acylglicerols and phospholipids of milled rice surface lipids during storage. Journal of American Oil Chemist's Society, 81: 385-388.

Mahanta PK, Tamuli P, Bhuyan LP, 1993. Changes of fatty acid contents, lipoxigenase activities, and volatiles during black tea manufacture. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 41: 1677-1683.

Moreau RA. 2005. Chapter 5: Extraction and Analysis of Food Lipids.

Ravichandran R, Parthiban R. 2000. Lipid occurrence, distribution and degradation to flavor volatiles during tea processing. Food Chemistry, 68: 7-13.

Rouser G, Kritchevsky G, Yamamoto A. 1967. Lipid Chromatographic Analysis. Rochester New York Ed: Marcel Dekker. Vol I p: 99-162.

Schmalko ME, Scipioni GP, Ferreyra DJ. 2005. Effect of water activity and temperature in color and chlorophylls changes in Yerba Mate leaves. International Journal of Food Properties. Taylor & Francis. Filadelfia, 8(2): 313 – 322.

Selvendran RR, Reynolds J, Galliard T. 1998. Production of volatiles by degradation of lipids during manufacture of black tea. Phytochemistry, 17: 233-236.

Springett MB, Williams BM, Barnes RJ. 1994. The effect of packaging conditions and storage time on the volatile composition of Assam black tea leaf. Food Chemistry, *4:* 393-398.

Xander CG, Scipioni GP, Argüello BDelV, 1999. Estudio cinético de la inactivación térmica de las peroxidasas en yerba mate (*Ilex paraguarensis*). Proceedings del VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rafaela, Santa Fe.

Evaluación de la edad de vinos tintos basada en parámetros de color y concentración de dietil succinato (Valle de Tulum-San Juan-Argentina)

Evaluation of age based on colour and concentration of diethylsuccinate in red wines from the Valley of Tulum (Province of San Juan- Argentine)

Fabani MP (1-2), Ravera MJA (1), Wunderlin DA (1)

(1) CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, ISIDSA, CIBICI, Ciudad Universitaria - 5000, Córdoba, Argentina.
(2) CONICET-Universidad Nacional de San Juan, Facultad de Ingeniería, Instituto de Biotecnología, Av. Libertador 1109 (Oeste) - 5400, San Juan, Argentina.
paufabani@unsj.edu.ar

RESUMEN

Un gran número de cambios ocurre en los vinos durante el almacenamiento, los cuales pueden afectar sus propiedades finales. El color es una de las características sensoriales más importantes en los vinos, influenciando su aceptabilidad por parte de los consumidores. Numerosos factores pueden afectar el color del vino, como la composición de la uva, el método de vinificación y las condiciones de almacenamiento. El color del vino cambia con el tiempo, especialmente durante los primeros meses de almacenamiento. La estabilidad del color durante el añejamiento está relacionada principalmente con el grado de polimerización entre antocianos y otros compuestos fenólicos. Además, el color influencia la percepción del aroma y el *flavour*. La formación de nuevos compuestos junto con las variaciones en las cantidades de los compuestos ya existentes, también tiene lugar durante el almacenamiento, afectando la calidad final del vino. En los vinos terminados, los ésteres del ácido succínico (monoetil y dietil) son formados durante la fermentación maloláctica y aumentan su concentración durante el añejamiento, contribuyendo con el *bouquet* final del vino. Se estudió la concentración de dietil succinato y diversos parámetros de color en vinos tintos del Valle de Tulum (Provincia de San Juan-Argentina), con el objetivo de clasificar los vinos en función del año de elaboración, mediante la aplicación de quimiometria al conjunto de datos. Se analizaron vinos varietales 100% puros: Syrah (n= 8), Cabernet Sauvignon (n= 10), Malbec (n= 8) y Bonarda (n= 6), de cuatro cosechas consecutivas (2004–2007), provistos por la bodega Augusto Pulenta, Finca "Doña Filomena" (San Juan, Argentina). El dietil succinato fue determinado por HS-SPME, acoplado a GC-MS/MS, empleando una fibra de tres componentes (DVB-Carboxen-PDMS). Las mediciones del color fueron realizadas en un espectrofotómetro UV-Vis. El espectro visible (400–670 nm) fue analizado para cada muestra. La intensidad de color fue calculada midiendo la absorbancia a 420, 520 y 620 nm. El índice de polifenoles totales fue calculado a 280 nm. Los antocianos totales fueron analizados a 520 nm, usando una matriz de HCl 1%. Los parámetros CIELAB: L* (luminosidad), C* (croma), H* (tonalidad), a* (rojo) y b* (amarillo) fueron determinados usando el software MSCV. Cada muestra fue analizada por triplicado. Se aplicó Análisis Lineal Discriminante (ALD) para determinar si existen diferencias entre vinos de diferentes cosechas. El análisis discriminante permitió diferenciar vinos de diferentes cosechas con un 99% de certeza, empleando solo cuatro parámetros: dietil succinato (frutas-melón); C* (croma); L* (luminosidad) y H* (tonalidad). Se demostró que el dietilsuccinato y la tonalidad permiten la completa discriminación entre vinos de diferentes cosechas, permitiendo evaluar el año de elaboración de los vinos tintos estudiados. Proponemos la evaluación de estos parámetros para prevenir fraudes en la comercialización de vinos añejos.

ABSTRACT

A large number of changes occur in wines during storage, which can affect their final properties. Colour is one of the most important sensory characteristics of wines, influencing its overall acceptability by consumers. Numerous factors can affect the colour of wine, such as the grape composition, the vinification method and storage conditions. Wine colour changes with the time, especially during the first few months of storage. Colour stability during ageing is closely related to the degree of polymerization between anthocyanins and other phenolic compounds. Also, colour

influences the perception of other sensory properties such as aroma and flavour. The formation of new aroma compounds together with variations in the amounts of other existing components also take place during storage, affecting the overall quality of the wine. Ethyl esters of succinic acid are formed during the malolactic fermentation. Its content increase during wine ageing, contributing to the *bouquet*. We studied the concentration of diethyl succinate and several colour parameters in red wines from the Valley of Tulum (Province of San Juan-Argentina), aiming to classify these wines in according to its year of elaboration. Our main goal was evaluating a practical method to assess the age of wine by measuring chemical parameters with further application of chemometrics. We studied four consecutive vintages (2004–2007) consisting of 100% pure wine varieties. Studied varieties were: Syrah (n= 8), Cabernet Sauvignon (n= 10), Malbec (n= 8) and Bonarda (n= 6), which were provided by the cellar Augusto Pulenta, Finca "Doña Filomena" (San Juan, Argentina). Diethyl succinate was determined by HS-SPME, coupled to GC-MS/MS, using a DVB-Carboxen-PDMS fibre. Colour measurements were made in a UV-Vis spectrophotometer. The visible spectrum (400–670 nm) was recorded for each sample. Color intensity was calculated from absorbance measurement at 420, 520 and 620 nm. Total polyphenol index was calculated at 280 nm. Total anthocyanins were analyzed at 520 nm, using a matrix of 1% HCl. The CIELAB parameters L* (lightness); C* (chroma), h* (hue), a* (redness) and b* (yellowness) were determined by using the MSCV software. Each sample was analyzed by triplicate. We applied Linear Discriminant Analysis (LDA) to find differences among wine from different vintages. Stepwise discriminant analysis allows us to differentiate wines from four vintages with 99% accuracy using 4 parameters: diethyl succinate (fruity-melon); C* (chroma); L* (lightness) and H* (hue). Box plots show that diethyl succinate and hue allows complete discrimination among wines of different vintages. Considering our present results, we are able to assess the age of red wines from the studied region studied. The evaluation of these parameters could also be used to prevent frauds.

PALABRAS CLAVE: *vino, color, dietil succinato, quimiometria.*

KEYWORDS: *wine, colour, diethyl succinate, chemometric.*

INTRODUCCIÓN

Un gran número de cambios ocurre en los vinos durante el almacenamiento, los cuales pueden afectar sus propiedades finales (Gonzalez-Viñas *et al.* 1996). El color es uno de los parámetros cualitativos más importantes en los vinos, en especial en las variedades tintas ya que influencia la aceptabilidad, el precio y la calidad global del vino (Meléndez *et al.* 2001, Esparza *et al.* 2006).

El color inicial de los vinos tintos se debe a los compuestos polifenólicos presentes en la uva, siendo principalmente los antocianos monoméricos los responsables del color azul y rojo. Los antocianos son pigmentos hidrosolubles presentes en el hollejo de las uvas tintas, los cuales se disuelven durante el prensado, la maceración y la fermentación, además de evolucionar durante el añejamiento de los vinos (García-Puente Rivas 2006, Versari 2008), interviniendo además otros factores, como son los procesos redox y las variaciones en el pH (Meléndez *et al.* 2001).

El color de los vinos depende de varios aspectos como la variedad de uva (Presa-Owens *et al.* 1995), el grado de madurez al momento de la cosecha (Pérez-Magariño y González-Sanjosé 2004, Bautista-Ortín *et al.* 2004), las prácticas vitivinícolas (Almela *et al.* 1995, Pérez-Lamela *et al.* 2007), el método de vinificación (Gil-Muñoz *et al.* 1997, Bakker *et al.* 1999), las condiciones de almacenamiento, el suelo y los factores ambientales (Almela *et al.* 1995, Mazza *et al.* 1999).

Durante la maduración y añejamiento del vino, los pigmentos antociánicos participan en numerosas reacciones las cuales conducen a la degradación progresiva de los mismos, debido a la oxidación (Martínez y Whitaker 1995) y formación de nuevos pigmentos oligómeros y poliméricos más estables, modificando el color rojo brillante de los vinos jóvenes hacia tonalidades más anaranjadas-amarronadas (Somers 1971, García-Puente Rivas *et al.* 2006). Varios autores han demostrado que los parámetros cromáticos así como los fisicoquímicos pueden ser modificados durante el almacenamiento del vino tinto (Bakker *et al.* 1993, Almela *et al.* 1995).

En 1984, Glories propuso una metodología para el análisis del color en vinos, basado en varios parámetros estándar: IC (intensidad de color), H (tonalidad), L (luminosidad), % Amarillo, % Rojo y % Azul, considerando la intensidad de color (IC) como el mejor parámetro de control de calidad

colorimétrico. Posteriormente la "Comisión Internacional de L'Eclairage'' (CIE) estableció un método para medir el color basado en la determinación de valores triestímulo. El método CIE usa medidas en todo el rango del espectro visible (380–770 nm), similar a lo que percibe el ojo humano. En 1986, CIE desarrolló un mejor método para medir el color, el espacio CieLab, el cual es una transformación no-lineal de los valores tri-estímulo CIE (X, Y, Z) y define al color mediante coordinadas rectangulares: L* (luminosidad), a* (rojo/verde) y b* (amarillo/azul), y coordinadas cilíndricas: C* (croma), H* (tonalidad) y L*. El parámetro S* (saturación) contribuye a la información de la saturación visual del color (García-Puente Rivas *et al.* 2006). La Organización Internacional del Vino (OIV) recomienda el uso de los parámetros CieLab para determinar las variables del color en los vinos (Bulletin de L'OIV 1994, Negueruela *et al.* 2001).

El método CieLab ha sido aplicado por varios autores para determinar las características cromáticas y estudiar la evolución de diferentes variedades de vinos (Almela *et al*. 1995, Pérez-Magariño y González-SanJosé 2001-2003, Esparza *et al*. 2006, García-Puente Rivas *et al*. 2006); demostrando que este método es preciso para medir el color, siendo útil en la caracterización y diferenciación de vinos (Meléndez *et al.* 2001).

La evolución del color también influencia la percepción de otras propiedades sensoriales como el aroma y el *flavour* (Pérez-Lamela *et al.* 2007). Durante el añejamiento del vino ocurre la formación de nuevos compuestos aromáticos junto con la variación en la cantidad de otros existentes, afectando la calidad general del producto (Gonzalez-Viñas *et al.* 1996). En los vinos estabilizados, los esteres dietílicos del ácido succínico son formados durante la fermentación maloláctica, y su contenido se incrementa durante el añejamiento, contribuyendo con el *bouquet*. Gonzalez-Viñas *et al*. (1996) reportó que el aumento en el contenido de dietil succinato era estadísticamente significativo de un año al otro.

El análisis de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), como el dietil succinato, es posible por Microextracción en Fase Sólida (SPME) (Rocha *et al*. 2001, Cámara *et al*. 2006). Este método permite una extracción y pre-concentración libre de solventes en una simple etapa, sin pre-tratamientos de la muestra, y puede ser utilizado tanto para determinaciones cualitativas como cuantitativas de los VOCs en muestras de vino (Arthur *et al*. 1992, Rocha *et al.* 2001, Cámara *et al.* 2006).

La evaluación de la edad del vino es importante para verificar su calidad y prevenir fraudes. Hasta el alcance de nuestros conocimientos, la evaluación de la edad del vino mediante el uso combinado de de color CieLab y la composición de VOCs no ha sido reportado todavía, aún cuando si hay reportes sobre el uso individual de cada una de estas técnicas. Tampoco se han publicado trabajos realizados en vinos Argentinos respecto a la evolución del color durante el añejamiento ni su empleo como herramienta de control.

El principal objetivo de este trabajo fue verificar la posibilidad de determinar la edad de diversos varietales de vino tinto utilizando una combinación de la medición de color CieLab y el análisis cromatográfico de dietilsuccinato con posterior aplicación de estadística multivariada para discernir el conjunto de parámetros que mejor permitan lograr este objetivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron 32 muestras de vino tinto correspondientes a cuatro cosechas consecutivas (2004-2007) de *Vitis vinífera*. Los vinos fueron en todos los casos monovarietales: Syrah (n=8), Cabernet Sauvignon (n=10), Malbec (n=8) y Bonarda (n=6), proporcionados por la bodega "Augusto Pulenta" (San Juan-Argentina) en botellas de vidrio de 750 mL luego del proceso de vinificación, estabilización y añejamiento del vino. Las muestras fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a 4-8°C hasta su análisis en el término de dos meses desde su ingreso.

Análisis de VOCs

Se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utilizando micro-extracción en fase sólida (SPME) desde el espacio de cabeza (HS, head space). Se utilizó un soporte SPME manual (Supelco, Bellafonte, PA), una fibra SPME 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (Supelco, Bellafonte, PA), previamente acondicionada por 1 hora a 270°C en el puerto de inyección del GC.

Tratamiento de las muestras. Las botellas de vino se abrieron, se transfirió un volumen de 0,1 mL a cada uno de tres viales de vidrio con tapa a rosca y septum de PTFE, en cada vial se adicionó 60 mg de NaCl. Cada vial se analizó por HS-SPME-GC/MS dentro de las 2 h de abierta la botella. Luego de

un tiempo de equilibrio (30 min) la fibra de SPME fue manualmente insertada dentro del vial a través del septum y expuesta al espacio de cabeza del vial durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-22°C), procediendo inmediatamente al análisis por GC-MS.

GC/MS. El análisis fue llevado a cabo en un equipo GC/MS-MS (Varian CP3800-Saturn 2200) equipado con una columna capilar Factor *Four* VF-5 ms; 30 m x 0.25 mm ID; DF= 0.25 µm, usando un Inyector (Varian 1079) con *septum* (Varian AG3) en modo *splitless* (1:25) operado a 250°C. El detector de masas fue operado en el modo de impacto de electrones a 70 eV, abarcando el rango m/z 50-150. La fibra SPME fue desorbida en el inyector en modo *splitless*. La temperatura de la columna fue programada desde 35 a 250 °C, incrementándose a un ritmo de 8°C min^{-1}. El gas portador fue helio (Grado ultra puro 5.0) a flujo constante de 1 mL min^{-1}.

Identificación y cuantificación del dietil succinato. La identificación fue llevada a cabo por comparación de los tiempos de retención de GC y el espectro de masas. Se utilizó un testigo con el compuesto puro y se confirmó mediante búsqueda en la biblioteca de espectros del equipo (NIST-MS 2.0). La concentración fue determinada mediante curvas de calibración utilizando standard externo. Los standards fueron preparados usando agua ultra-pura (Milli-Q) conteniendo 10% de etanol (grado analítico) para simular parcialmente la matriz del vino. El límite de detección (LOD) fue determinando considerando una relación señal/ ruido S/N=5, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) fue determinado considerando una relación S/N=15. La reproducibilidad de los resultados fue determinada evaluando el coeficiente de variación porcentual (CV%).

Análisis de Color

Medición espectral. Espectrofotómetro UV-Vis (Shimatzu Corporation MultiSpec-1501, soporte para múltiples celdas y control de temperatura). Se utilizó una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico. El espectro visible (400–670 nm) fue adquirido para cada muestra.

Características cromáticas de los vinos. La **Tabla 1** resume los métodos empleados. Los parámetros CieLab a* (rojo/verde); b* (amarillo/azul); L* (luminosidad); C* (croma); H* (tonalidad) y S* (saturación), fueron determinados por medidas de transmitancia a cuatro longitudes de onda diferentes: 450, 520, 570 y 630 nm (condiciones de iluminación de un observador estándar: D65/ CIE 1964-10°). La diferencia de color (ΔE*) entre dos muestras de vino de diferentes años fue calculada de acuerdo a la ecuación: $\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (Ayala *et al.* 1997). Los parámetros CieLab fueron procesados mediante el método descripto por Pérez-Caballero *et al*. (2003) usando el software MSCV.

Tabla 1. Métodos analíticos utilizados para determinar las características de color en vinos tintos.

Parámetros	Metodo	Bibliografía
Índice de color (IC)	$IC = A_{420}+A_{520}+A_{620}$	Glories (1984)
Tinte (T)	$T = (A_{420}/A_{520})$	Glories (1984)
Antocianos totales (AT)	$AT = A_{520}x875$	Ribéreau-Gayon *et al.* (1965)
Índice de polifenoles totales (IPT)[a]	$IPT = A_{280}xFd$[b]	Bulletin de L'OIV (1994)
S* (Saturación)	S* = C*/L*	Melendez *et al.* (2001)

[a] Las muestras de vino fueron diluidas con una solución de etanol al 12-13%, en un factor de dilución entre 50-100.
[b] Fd: factor de dilución.

Análisis Estadístico

Cada muestra fue analizada por triplicado, los resultados se informan como valor promedio y desviación estándar. Los datos se trataron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANOVA). Además, se empleó Análisis Lineal Discriminante paso a paso (stepwise-LDA) para verificar la contribución de cada variable al modelo y su capacidad de discriminar vinos de diferentes cosechas. Se utilizó el paquete estadístico, STATISTICA 7 de Statsoft (2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de dietilsuccinato en vinos

Los etil ésteres son producidos durante la fermentación por reacción del etanol y Acetil-CoA (Pérez-Prieto *et al.* 2003). La concentración de estos ésteres en vinos jóvenes depende de la cepa de levadura, la temperatura de fermentación, la realización de fermentación maloláctica (Pérez-Prieto *et al.* 2003) y el contenido de azúcar (Cámara *et al.* 2006). El *bouquet* de reducción aparece durante la maduración de los vinos en botella, caracterizado por una disminución en los acetatos y etil esteres de cadena corta de los ácidos grasos, como así también por un incremento de los etil esteres provenientes de los ácidos dicarboxílicos como resultado de la esterificación química durante el almacenamiento (Pérez-Prieto *et al.* 2003).

Analizando el perfil de VOCs de los vinos estudiados, se observaron diferencias significativas en la concentración de dietil succinato en las sucesivas cosechas (**Figura 1**), independientemente de la variedad de vino (información no mostrada). Estos resultados concuerdan con reportes anteriores de Gonzalez-Viña *et al.* (1996) y Pérez-Coello *et al.* (2003).

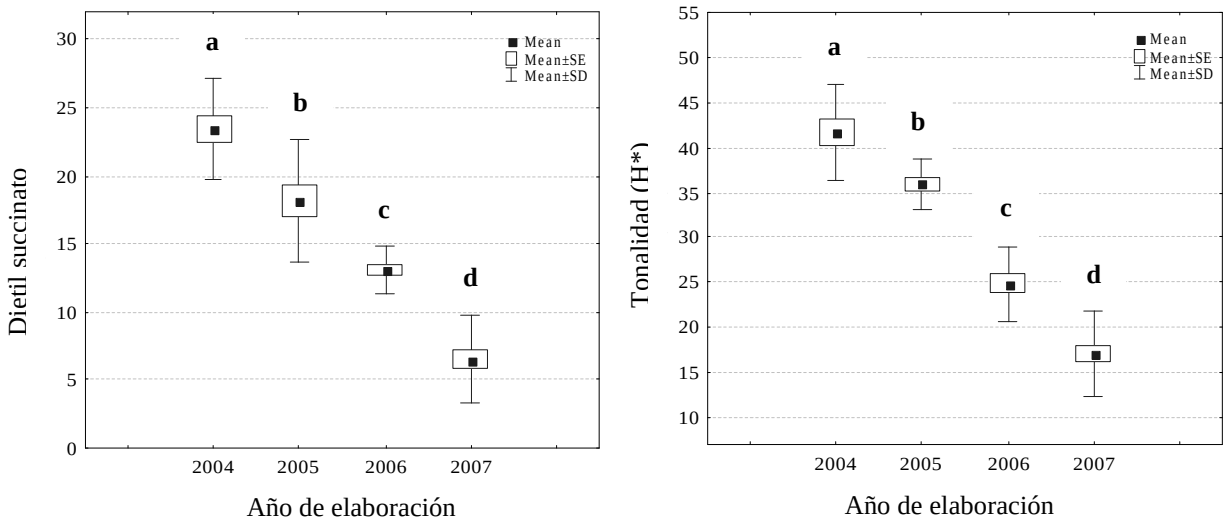


Figura 1. Gráficos de cajas correspondientes a los parámetros que más contribuyen a la diferenciación de la edad del vino. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Dietilsuccinato: valores expresados en mg L^{-1}; LOD: 0.003 mg L^{-1}; LOQ: 0.009 mg L^{-1}. Coeficiente de variación (CV): 0.56%.

Evolución cromática del vino

En la **Tabla 1**, se muestran los resultados de los parámetros de color evaluados en los vinos. El índice de color (IC) de los vinos correspondientes a la segunda y tercer cosecha (2005-2006) fue menor respecto de los elaborados en la primer cosecha (2004). Estos resultados coinciden con datos reportados por Esparza *et al*. (2006). Los vinos de la cosecha 2007 tuvieron los IC más elevados (8.38), lo cual podría atribuirse a que, en los vinos jóvenes, la materia colorante no ha precipitado completamente (Almela *et al.*, 1995).

En los vinos tintos, los valores del tinte (T) se incrementaron durante el añejamiento pero las diferencias entre las cosechas 2004 y 2005 no fueron estadísticamente significativas. Este resultado es consistente con los valores reportados por García-Puente Rivas *et al*. (2006).

Los antocianos totales (AT) disminuyeron progresivamente durante el almacenamiento de los vinos, desde 664.95 mg L^{-1} (cosecha 2007) hasta 431.91 mg L^{-1} (cosecha 2004). Cliff *et al.* (2007) reportó el mismo comportamiento en vinos tintos comerciales. Estos datos son consistentes con la pérdida progresiva de pigmentos antociánicos que ocurre durante la maduración y envejecimiento del vino (Martínez y Whitaker 1995). Oberholster (2000) reportó que los antocianos varían entre 100-1500 mg L^{-1} en vinos jóvenes, dependiendo de la variedad de uva utilizada.

El índice de polifenoles totales (IPT) varió entre 50,4 y 52,2, decreciendo su valor inicial durante los primeros dos años de almacenamiento (2005-2006), e incrementándose levemente en el tercer año (2004), no evidenciando una clara asociación con la edad del vino. Pérez-Lamela *et al.* (2007) citó que el índice de polifenoles totales (IPT), como la concentración de taninos y antocianos, miden el

potencial de envejecimiento de los vinos tintos y la estabilidad del color; por lo que los valores esperables en el vino deben ser mayores a 40 (IPT). El valor del IPT en los vinos elaborados en el año 2007 fue mayor a 40; por lo que se espera que esta cosecha tenga buen añejamiento en botella. Estos resultados también fueron coincidentes con los reportados por Almela *et al.* (1995).

La coordinada a* es un parámetro que mide el color rojo. Si a* > 0 indica dominancia del color rojo y del verde si a* < 0. Todas las muestras tuvieron valores de a* positivos, que decrecieron durante el almacenamiento. Esto indica que los vinos jóvenes son más rojos que los más añejos. La coordinada b* es una medida del color amarillo. Si b* > 0 indica dominancia del amarillo, mientras que valores de b* < 0 señalan predominio del azul. Los vinos analizados mostraron valores de b* > 0, que se incrementaba con los años de almacenamiento. En todas las muestras el valor de a* fue mayor que el de b*, mostrando una predominancia de los colores rojos vívidos, típicos de los vinos tintos. Estos resultados son coincidentes con trabajos previos (Pérez-Magariño y González-Sanjosé 2001-2003).

El parámetro L* representa la luminosidad de un objeto coloreado, juzgado con relación a la luminosidad de otro objeto que parece blanco (L*=100, luminoso; L*=0, oscuro) (Monagas *et al.* 2007). El valor de L* se incrementó durante el primer año de elaboración pero permaneció casi constante durante el envejecimiento en botella (2004-2006). Un aumento de la luminosidad (L*) durante el añejamiento se correspondió con una disminución del índice de color (IC), resultados también reportados por Pérez-Magariño *et al.* (2006).

C* (croma) es la cromaticidad relativa de un estímulo acromático (blanco o gris) (Monagas *et al.* 2007). La componente cuantitativa del color (C*) decreció en el primer año de almacenamiento como resultado de la pérdida de pigmentos. Los cambios en el croma (C*) en los vinos tintos refleja una predisposición hacia los componentes dominantes del color (a* o b*) (Bakker y Timberlake 1986). Los vinos elaborados en el 2007 fueron los más oscuros (valores menores de L*). Similares resultados fueron reportados previamente por Pérez-Magariño y González-Sanjosé (2001, 2006). Los vinos más oscuros (cosecha 2007) mostraron la mayor intensidad cromática, en concordancia con lo reportado por Bakker *et al.* (1986) y Almela *et al.* (1995).

El valor de H* (tonalidad) es un atributo asociado a la apariencia del vino (Monagas *et al.* 2007). Durante el almacenamiento, el valor de H* se incrementó significativamente de una cosecha a la otra (**Tabla 2**). Cliff *et al*. (2007) encontró una relación entre H* (tonalidad) y el parámetro a* (rojo), ya que estos parámetros tienden a exhibir los valores más bajos y altos, respectivamente, entre las cosechas que también exhiben las más elevadas concentraciones de antocianos totales (Pérez-Magariño y González-Sanjosé 2006). Esta relación también se verificó en este trabajo.

Tabla 2. Media de los parámetros cromáticos de vinos tintos en función del año de elaboración.

Parámetros cromáticos	**Año de elaboración**			
	2004	**2005**	**2006**	**2007**
Índice de Color (IC)	8.05±1.09^{a}	7.71±0.97^{a}	6.86±0.72^{a}	8.38±2.59^{a}
Tinte (T)	1.09±0.07^{c}	1.03±0.02^{c}	0.87±0.04^{b}	0.75±0.09^{a}
Antocianos Totales (AT) (mg L^{-1})	431.91±72.33^{a}	468.58±13.91^{ab}	594.89±161.72^{bc}	697.03±174.54^{c}
Índice de Polifenoles Totales (IPT)	52.17±3.56^{a}	50.43±5.33^{a}	51.36±4.45^{a}	50.73±6.64^{a}
a*	28.92±1.40^{a}	28.10±2.59^{a}	30.42±2.83^{a}	37.68±9.31^{b}
b*	26.21±4.94^{c}	20.37±3.16^{b}	14.15±1.64^{a}	11.32±3.24^{a}
a*/ b*	1.14±0.20^{a}	1.40±0.15^{a}	2.19±0.40^{b}	3.51±1.24^{c}
L* (Luminosidad)	65.65±3.09^{b}	65.75±3.10^{b}	66.71±3.29^{b}	60.58±10.03^{a}
C* (Croma)	38.71±4.21^{ab}	34.37±4.10^{ab}	33.19±2.36^{a}	39.30±9.25^{b}
H* (Tonalidad)	41.76±5.32^{d}	35.96±2.82^{c}	24.82±4.05^{b}	17.12±4.85^{a}
S* (Saturación)	0.60±0.09^{ab}	0.53±0.08^{a}	0.51±0.06^{a}	0.69±0.25^{b}

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

La variable S* (saturación) es una medida de la densidad o pureza del color en el espacio CIELUV, y esta relacionado con la intensidad de color. El valor de S* disminuyó durante el primer año de envejecimiento, pero las subsecuentes variaciones de este parámetro no estuvieron claramente asociadas con el añejamiento de los vinos.

La diferencia total de color (ΔE*) entre dos muestras de vinos elaborados en diferentes años fue calculada: ΔE* (2004-2005) = 5,90; ΔE* (2005-2006) = 6,71 y ΔE* (2006-2007) = 9,91. De acuerdo a Gonnet, (1998) y Negueruela *et al.* (1995), el ojo humano es capaz de discriminar entre dos colores cuando ΔE* ≥ 1. Pero cuando los catadores observaban las muestras de vino a través de un vaso de vidrio, disminuía la capacidad del ojo de discriminar colores, por lo que ΔE* debería ser mayor a cinco (Negueruela *et al.* 1995). Pérez-Magariño y González-Sanjosé (2003) llegaron a discriminar vinos de diferentes cosechas cuando ΔE* ≥ 1,5. Los resultados obtenidos indicarían que los catadores podrían diferenciar los vinos elaborados en diferentes años.

Quimiometría

El análisis discriminante paso a paso (SLDA) permitió diferenciar vinos tintos de cuatro cosechas con 99% de certeza, empleando solo cuatro parámetros: dietilsuccinato (frutas-melón); C* (croma); L* (luminosidad) y H* (tonalidad).

La **Figura 1** muestra los gráficos de cajas del dietilsuccinato y de la tonalidad (H*), demostrando la casi completa discriminación de las muestras de vino con la sola consideración de estos dos parámetros. Pérez-Coello *et al.* (2003) reportó que el dietilsuccinato fue la variable que más discriminaba entre vinos de diferentes cosechas. El parámetro H* (tonalidad) fue utilizado por Mélendez *et al.* (2001) como una de las variables que mejor discriminaban los vinos rosados de los claretes.

En la representación gráfica (**Figura 2**) se observa que los vinos tintos de diferentes cosechas se pueden diferenciar claramente en función del año de añejamiento.

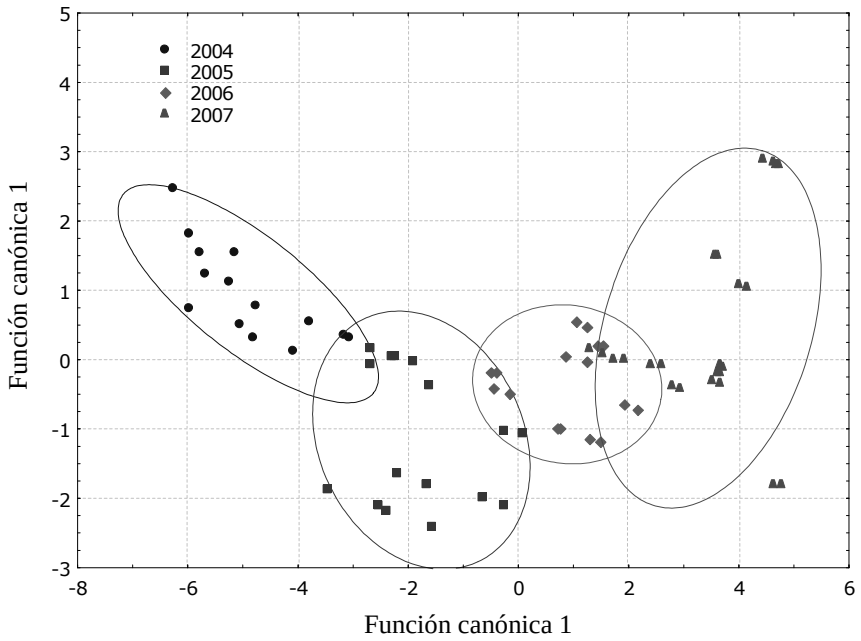


Figura 2.Distribución de los vinos de acuerdo al año de elaboración en el plano definido por las primeras dos funciones canónicas del SLDA.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos concluimos que las diferencias entre cosechas pueden evaluarse considerando el incremento en la concentración de dietil succinato, proveniente de la esterificación química durante el transcurso del añejamiento del vino, como así también evaluando los parámetros de color CieLab, en particular el valor H*. Sugerimos la evaluación de estos parámetros para prevenir fraudes donde se intente vender vinos jóvenes como añejos.

AGRADECIMIENTOS

A la bodega “Augusto Pulenta” (San Juan) por proveernos las muestras de vino y particularmente al enólogo Hugo Torres y a la PhD. María Valeria Amé por su cooperación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almela L, Javaloy S, Fernández-López JA, López-Roca JM. 1995. Comparison between the tristimulus measurements Yxy and L* a* b* to evaluate the colour of young red wines. Food Chemestry, 53: 321-327.

Arthur CL, Killam LM, Buchholz KD, Pawliszyn J. 1992. Automation and optimization of solid-phase microextraction. Analytica Chemistry, 64: 1960-1966.

Ayala F, Echávarri JF, Negueruela AI. 1997. A new simplified method for measuring the colour of wines. I. Red and rosé wines. American Journal of Enological and Viticulture, 48: 357–363.

Bakker J, Timberlake CF. 1986. The mechanism of colour changes in aging Port wine. American Journal of Enology and Viticulture, 37: 288-292.

Bakker J, Piccineli A, Bridle P. 1993. Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. Vitis, 32: 11-18.

Bakker J, Bellworthy SJ, Reader HP, Watkins SJ. 1999. Effect of enzymes during vinification on colour and sensory properties of port wines. American Journal of Enology and Viticulture, 50: 271–276.

Bautista-Ortín AB, Fernández-Fernández J, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. 2004. Wine-making of high coloured wines: extended pomace contact and run-off of juice prior to fermentation. Food Science Technology International, 10: 287-295.

Bulletin de L’OIV 67. 1994, pag 755–756, 763–764.

Cámara JS, Alves MA, Marques JC. 2006. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. Talanta, 68: 1512–1521.

Cliff MA, King MC, Schlosser J. 2007. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. Food Research International, 40: 92–100.

Esparza I, Santamaría C, Fernández JM. 2006. Chromatic characterization of three consecutive vintages of *Vitis vinifera* red wine Effect of dilution and iron addition. Analytica Chimica Acta, 563: 331–337.

García-Puente Rivas E, Alcalde-Eon C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. 2006. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. Analytica Chimica Acta, 563: 215–222.

Gil-Muñoz R, Gómez-Plaza E, Martínez A, López-Roca JM. 1997. Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. Food Research International, 30: 699-705.

Glories Y. 1984. La couleur des vins rouges. Première partie: Les equilibres des anthocyans et des tannins. Connaissance de la Vigne et du vin, 18: 195-217.

Gonnet JF. 1998. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited— 1. A colourimetric definition using CIELAB scale. Food Chemistry, 63: 409–415.

Gonzalez-Viñas MA, Perez-Coello MS, Salvador MD, Cabezudo MD, Martin-Alvarez PJ. 1996. Changes in gas-chromatographic volatiles of young Airen wines during bottle storage. Food Chemistry, 56: 399-403.

Martínez MV, Whitaker JR. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends of Food and Science Technology, 6: 195–200.

Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. 1999. Anthocyanins, phenolics and colour of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. Journal of Agricultural and Food Chemestry, 47: 4009–4017.

Meléndez ME, Sánchez MS, Íñiguez M, Sarabia LA, Ortiz MC. 2001. Psychophysical parameters of colour and the chemometric characterisation of wines of the certified denomination of origin 'Rioja'. Analytica Chimica Acta, 446: 159–169.

Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. (2007). Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. Food Chemistry, 104: 814–823.

Negueruela AI, Echávarri JF, Ayala F, Lomas AM. 1995. Colorimetría en vinos. Zubía monográfico 7: 151–166.

Negueruela AI, Echávarri JF, Ayala F. 2001. Caractéristiques chromatiques. OIV Feuille Verte N°. 1102.

Oberholster, A. 2000. Chemical and sensory properties of grape and wine phenolics. PartI. Wynboer. Available from http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0303chemical.php3.

Pérez-Caballero V, Ayala F, Echávarri JF, Negueruela AI. 2003. Proposal for the new standard OIV method for determination of chromatic characteristics of wine. American Journal of Enological and Viticulture, 54: 59–62.

Pérez-Coello MS, González-Viñas MA, García-Romero E, Díaz-Maroto MC, Cabezudo MD. 2003. Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. Food Control, 14: 301–306

Pérez-Lamela C, García-Falcón MS, Simal-Gándara J, Orriols-Fernández I. 2007. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. Food Chemistry, 101: 601–606.

Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. 2001. Differentiation parameters of ''Ribera del Duero'' D.O. wines from other Spanish D.O. Food Science Technology International, 7: 237–244.

Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. 2003. Application of absorbance values used in wineries for estimating CIELAB parameters in red wines. Food Chemistry, 81: 301-306.

Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. 2004. Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1181–1189.

Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. Food Chemistry, 96: 197–208.

Pérez-Prieto LJ, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. 2003. Differences in major volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. Journal of Food Composition and Analysis, 16: 697–705.

Presa-Owens C, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, Torre-Boronat MC. 1995. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts from Penedes region I. American Journal of Enological and Viticulture, 46: 283–291.

Ribéreau-Gayon P. 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. Bulletin of Society of Chimica, 9: 2649–2652.

Rocha S, Ramalheira V, Barros A, Delgadillo I, Coimbra MA. 2001. Headspace Solid Phase Microextraction (SPME) Analysis of Flavor Compounds in Wines. Effect of the Matrix Volatile Composition in the Relative Response Factors in a Wine Model. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 5142-5151.

Somers TC. 1971. The phenolic nature of wine pigments. Phytochemistry, 10: 2175–2186.

Versari A, Boulton RB, Parpinello GP. 2008. A comparison of analytical methods for measuring the colour components of red wines. Food Chemistry, 106: 397–402.

Influencia del pH y la concentración en la gelificación del caseinoglicomacropéptido

Influence of pH and concentration on casein glycomacropeptide gelation

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, Cuidad Universitaria, 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. Se estudió la influencia del pH, la temperatura y la concentración de GMP en la dinámica de gelificación. También se evaluó la reversibilidad de los geles por pH.

Se analizó la gelificación del GMP (5-20% p/p) a temperaturas entre 25 y 90ºC en el rango de pH entre 2 y 4. La dinámica de gelificación y las propiedades viscoelásticas de los geles se determinaron en un reómetro Paar Physica. Para estudiar la reversibilidad, los geles se diluyeron 1 en 5 y se ajustó el pH a 7. La pH-reversibilidad se determinó por Dynamic Light Scattering con un equipo Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments).

El GMP gelifica a temperatura ambiente y la velocidad de formación de la estructura de gel (V_{gel}) aumentó con la temperatura hasta un máximo a 60ºC. A partir de esta temperatura, V_{gel} se mantuvo constante. Se eligió la temperatura de 70ºC para realizar los ensayos. V_{gel} disminuyó cuando el pH se acercó al pI (≈4). No se observó gelificación a pH > 4. El módulo elástico de los geles aumentó con el pH, mientras que la velocidad de desarrollo de la estructura de gel (K_B) disminuyó. La concentración de GMP aumentó la velocidad de formación del gel a un dado pH.

Los barridos de frecuencia mostraron que G´ y G´´ fueron independientes de la frecuencia y los geles presentaron un alto carácter viscoelástico (tan δ < 0.05).

Los geles obtenidos a pH ácido fueron reversibles al llevar el pH a 7 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.

Se concluye que el GMP tiene únicas propiedades gelificantes por lo cual es un ingrediente altamente promisorio. La gelificación sería establecida por interacciones de tipo hidrofóbico e iónico. Además, por su capacidad de gelificar a pH bajos en frío, puede ser utilizado en alimentos que no requieran cocción previa.

ABSTRACT

The casein glycomacropeptide (GMP) is a bioactive peptide of 64 amino acids released after specific enzymatic cleavage of k-casein during the cheese making. The influence of pH, temperature and concentration of GMP in the dynamics of gelling were studied. The reversibility of the gels by pH were also evaluated.

The gelling properties of GMP (5-20% wt/wt) at temperatures between 25 and 90 º C in the pH range between 2 and 4 were analyzed. The dynamics of gelation and the viscoelastic properties of the gels were determined in a Paar Physica rheometer. To study the reversibility, the gels were diluted 1 in 5 and the pH was adjusted to 7. pH-reversibility was determined by Dynamic Light Scattering with a Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments).

GMP gelled at room temperature and the rate of formation of the gel structure (V_{gel}) as increased with temperature up to 60 º C. From this temperature, V_{gel} remained constant. It was chosen a temperature of 70 º C for running the tests. V_{gel} decreased when the pH approached the pI (≈ 4). No gel was observed at pH> 4. The elastic modulus of the gels increased with pH, but the rate of development of the gel structure (K_B) decreased. The GMP concentration increased the rate of formation of the gel at a given pH.

Frequency sweeps showed that G 'and G" were independent of the frequency. The gels had a strong viscoelastic character (δ<0.05).
The gels obtained at acid pH were reversible when restoring the pH to 7, however, the size distribution of molecular species was different, indicating that the GMP after gel formation was not any more in monomeric form.
It is concluded that the GMP has unique gelling properties which is highly promising ingredient. The gel structure would be established by hydrophobic and ionic interactions. Furthermore, the GMP can be used in foods that require no cooking by its ability for cold gelling.

PALABRAS CLAVE: *caseinomacropeptido, glicomacropéptido, gelificación, pH-reversibilidad, GMP*.

KEYWORDS: *caseinomacropeptide, glycomacropeptide, gelation, pH-reversibility, GMP.*

INTRODUCCIÓN

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 (Ney et al., 2008) Tiene numerosas actividades biológicas, entre ellas: antihipertensivo, antitrombótico, promotor del crecimiento de bifidobacterias, inhibidor de la toxina del cólera (Abd-El Salam et al. 1996; Brody 2000, Dziuba y Minkiewicz, 1996; Thomä-Worringer et al. 2006). Dado que no se reportan en la bibliografía estudios de la gelificación del caseinoglicomacropéptido, en este trabajo se estudió la influencia del pH, la temperatura y la concentración de GMP en la dinámica de gelificación. También se evaluó la reversibilidad de los geles por pH.

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 Milli-Q-ultrapure a temperatura ambiente y almacenadas en la heladera al menos 24 horas antes de su uso. Se agregó 0,02 % p/p de azida sódica para evitar contaminación bacteriana. El pH se ajustó con HCl 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 et al. 1998). Tubos de 4 ml de capacidad con 2 g de solución de GMP fueron observados en el tiempo a temperatura constante (desde 25 a 90 ºC) y el tiempo de gelificación (t_{til}) se asumió como el tiempo donde no hubo deformación en el menisco al inclinar el tubo. Los valores reportados fueron la media de al menos triplicados.

Dinámica de gelificación y propiedades viscoelásticas de los geles

La dinámica de gelificación se determinó mediante un reómetro de stress controlado Paar Physica (MCR 300) con sistema de platos paralelos con un gap de 1 mm. Inmediatamente ajustado el pH, se vertieron 700 µl de solución de GMP en el plato del reómetro. La temperatura fue controlada por un sistema Peltier (Viscotherm VT2, Paar Physica). Se aplicó en la superficie expuesta parafina para evitar la evaporación. La frecuencia fue de 1 Hz y la deformación 0,01%.
Las muestras fueron rápidamente calentadas desde 25ºC hasta alcanzar la temperatura de los ensayos (entre 40 y 90 ºC) en un minuto para simular el ensayo del "tilting test" (tratamiento térmico) y se mantuvo ésta temperatura durante 30 minutos, tiempo suficiente para permitir el equilibrio de G´. Luego se enfrió el sistema a 25 ºC en 10 min. Las propiedades dinámicas del gel formado fueron medidas en función de la frecuencia de oscilación a 25ºC con la misma deformación. Los datos informados son la media de al menos duplicados.

Determinación de la reversibilidad de los geles

Los geles de GMP (10 % p/p) fueron obtenidos a diferentes pHs a 25ºC y almacenados al menos 24 horas 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 con 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-average (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 percentilos 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.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La gelificación del GMP a temperatura ambiente fue pH-dependiente (**Figura 1**). El mayor tiempo de gelificación se obtuvo para pH 4 y disminuyó con el pH. Por encima de pH 4 el GMP no gelificó a ninguna concentración. A pH 3 o 3,5, el GMP gelificó a concentraciones bajas como 3%. Ésta solución, 3 %, a pH 4 no gelificó pero se observó un precipitado con el tiempo. La temperatura no afectó al rango de pH en el que se observó gelificación a temperatura ambiente.

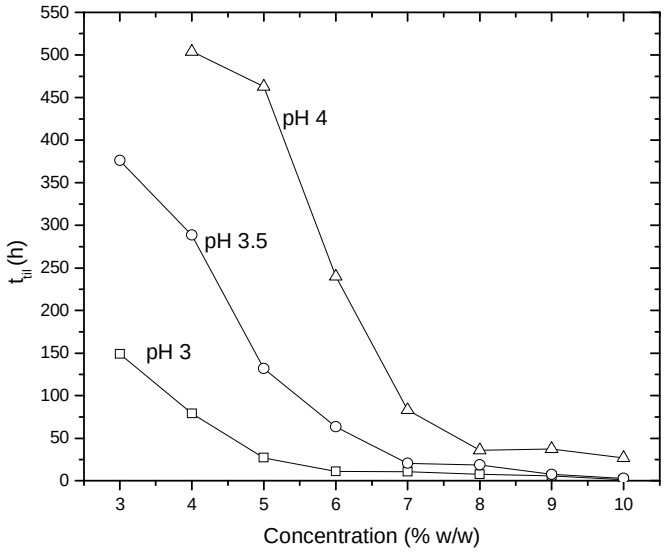


Figura 1. Tiempo de gelificación (t_{tilt}) a 25°C como función de la concentración (3-10% p/p) en un rango de pH de 3 a 4.

La velocidad de gelificación se evaluó por el ensayo del "tiliting test" (V_{til}) y por reología (V_{gel}). V_{til} se obtuvo como $1/t_{til}$. En los ensayos de reología dinámica, el punto de gel (t_{gel}) se determina como el tiempo/temperatura en dónde se cruzan G´ y G´´ o cuando G´ rápidamente comienza a crecer (Stading y Hermansson 1990). El punto de gel es el tiempo en el cual se produce la transición de un líquido

viscoelástico a un sólido viscoelástico, en ese momento se establece rápidamente una estructura de gel (Pérez y Pilosof 2003). Los puntos de gel en los sistemas estudiados siempre se obtuvieron durante el período de temperatura constante. La velocidad de formación de la estructura primaria del gel o velocidad de gelificación (V_{gel}) se obtuvo como $1/t_{gel}$. Para determinar la relación de la temperatura con la gelificación se eligieron dos concentraciones de GMP (8% y 12 % p/p) y se fijó el pH en 3 (**Tabla 1**). La temperatura incrementó la velocidad de formación de la estructura primaria del gel (V_{gel}) hasta 60ºC para 8% p/p de GMP y 50 ºC para 12% p/p de GMP. A partir estas temperaturas, V_{gel} se mantuvo constante hasta los 90º C. La velocidad de gelificación obtenida por el ensayo del "tiliting test" (V_{til}) fue menor a la obtenida por reología (V_{gel}) ya que una estructura más desarrollada de gel se necesita para resistir la deformación impuesta por el "tilting". Esto es razonable ya que t_{til} reúne dos pasos: la formación de la estructura primaria del gel y su posterior desarrollo (Baeza et al. 2003).

Tabla 1.Velocidades de gelificación obtenidas por reología dinámica (V_{gel}) y por "tiling test" (V_{til}) a diferentes temperaturas para 8 y 12% p/p de GMP a pH 3.

		Concentración de GMP (% p/p)		
		8		12
T (ºC)	V_{gel} (min^{-1})	V_{til} (min^{-1})	V_{gel} (min^{-1})	V_{til} (min^{-1})
25	NG	0,002 ± 0,000	NG	0,005 ± 0,000
40	NG	0,015 ± 0,002	0,081 ± 0,019	0,063 ± 0,006
50	0,056 ± 0,003	0,053 ± 0,005	0,279 ± 0,054	0,154 ± 0,000
60	0,077 ± 0,002	0,075 ± 0,002	0,279 ± 0,086	0,196 ± 0,015
70	0,073 ± 0,014	0,071 ± 0,014	0,244 ± 0,049	0,211 ± 0,031
80	0,079 ± 0,023	0,074 ± 0,002	0,281 ± 0,003	0,235 ± 0,025
90	0,073 ± 0,006	0,053 ± 0,005	0,260 ± 0,025	0,218 ± 0,006

NG: No gelificó durante el tiempo del experimento (30 min).

Para estudiar el efecto del pH y la concentración de GMP se eligió la temperatura de 70º C, de manera que los ensayos de reología dinámica pudieran realizarse en un lapso de tiempo de 30 minutos. En la **Figura 2A** se graficó V_{til} en función del pH para diferentes concentraciones de GMP. La mínima velocidad de gelificación se obtuvo a pH 4, valor cercano al pI del GMP (aproximadamente 3,8). V_{til} se incrementó al disminuir el pH. La concentración de GMP influyó considerablemente en V_{til}. Similares resultados se obtuvieron para los ensayos de reología dinámica (**Figura 2B**). En esa figura no está incluido pH 4 debido a que en ésta condición las soluciones de GMP no gelificaron durante el tiempo de medición en el reómetro, pero sí lo hicieron más tarde.

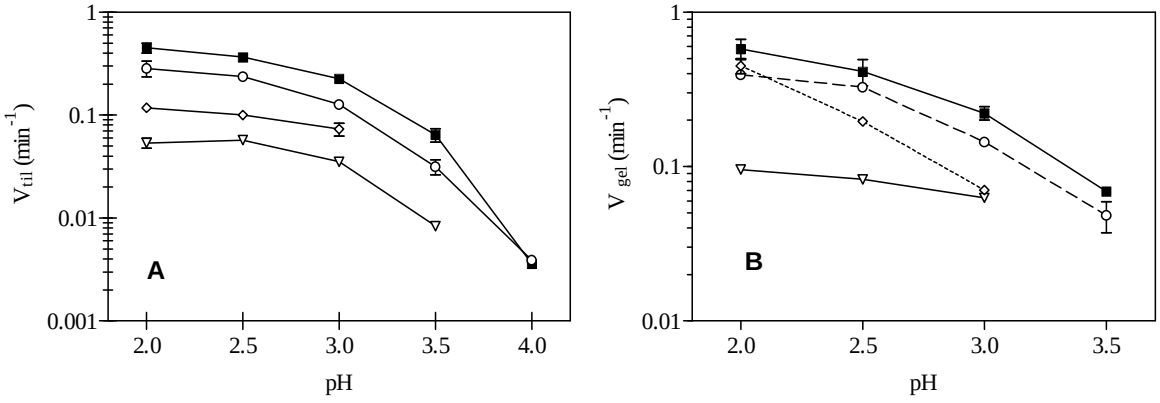


Figura 2. A) Velocidad de gelificación obtenida por "tilting test" (V_{til}) B) Velocidad de gelificación obtenida por reología dinámica (V_{gel}) en un rango de pH entre 2 y 4 a diferentes concentraciones de GMP (∇) 5% p/p, (◊) 8 % p/p, (○) 10 % p/p, (■)12 % p/p. Temperatura 70 ºC.

Una vez alcanzado t_{gel}, G´ se incrementó rápidamente durante el período isotérmico hasta alcanzar un valor plateau. La evolución de G´ en función del tiempo se ajustó con la siguiente ecuación empírica (Carp et al. 1997):

$$G' = G'_{max} \cdot t / (B + t) \qquad (1)$$

Dónde G´max es el valor plateau de G´ en tiempo infinito y B refiere al tiempo necesario para alcanzar la mitad del valor plateau ($G'_{max}/2$).
Se obtuvieron altos valores de coeficientes de regresión (R^2= 88,0-99,0 %). La velocidad de desarrollo de la estructura de gel (K_B) se calculó como 1/B.
La estructura primaria del gel tanto como su futuro desarrollo (después de t_{gel}) ocurre como resultado de la adición del péptido a la matriz gelificada. La concentración de GMP influyó principalmente en la velocidad de desarrollo del gel (K_B) (**Figura 3B**). El péptido que se incorpora a la red puede hacerlo más rápidamente cuando la concentración no es un factor limitante (10-12% de GMP). K_B disminuyó cuando el pH se acercó al pI. La **Figura 3A** muestra que el módulo elástico en el equilibrio (G'_{max}) aumentó principalmente con el crecimiento del pH, indicando que las características viscoelásticas del gel se incrementan al acercarse el pH al pI.

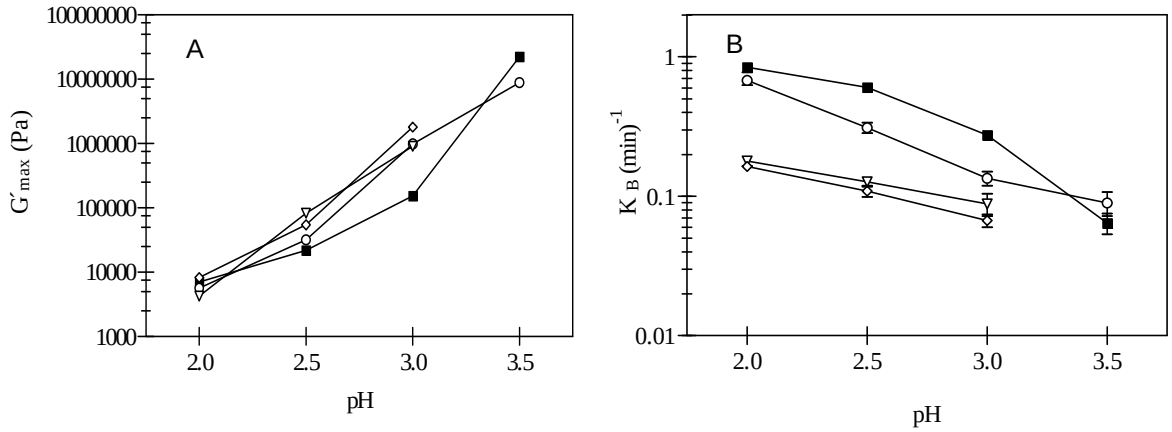


Figura 3. A) G´max B) Velocidad de desarrollo del gel (K_B) en un rango de pH entre 2 y 4 a diferentes concentraciones de GMP: (∇) 5% p/p, (◊) 8 % p/p, (○) 10 % p/p, (■)12 % p/p. Temperatura 70ºC.

Un incremento de G´ durante el enfriamiento de los geles proteicos está reportado en la bibliografía como una reestructuración del gel debido a las interacciones puente hidrógeno en la matriz proteica. Este fenómeno ha sido observado para proteínas, por ejemplo, β-lactoglobulina, seroalbúmina bovina y ovoalbúmina (Foegeding et al. 1995). Asumiendo que la masa de la matriz del gel no cambia durante el enfriamiento, es decir que las moléculas dispersas de proteínas no se adicionan durante el enfriamiento al gel, los cambios reológicos son interpretados como cambios en la densidad de entrecruzamiento. Para los geles de GMP, el módulo de elasticidad (G´) desarrollado durante el calentamiento mantuvo la misma tendencia durante el enfriamiento. Esto indicaría que los puentes hidrógeno no tendrían un rol preponderante en la estabilización de los geles de GMP. El GMP no contiene grupos azufrados por lo que se descartan uniones de tipo covalentes en la matriz gelificada. El GMP prácticamente no tiene estructura secundaria (Ono et al. 1987), es decir, es un péptido intrínsicamente desordenado (Kreuβ et al. 2009). Debajo del pI, las moléculas de GMP pierden la cerga negativa de los residuos Asp-, Glu-, del carboxilo C-terminal y de los residuos de ácido siálico. En contraste, los tres grupos Lis- y el aminoácido N-terminal obtienen carga neta positiva al bajar el pH≤4. Debido a la pérdida de la protección de las cargas negativas, los residuos hidrofóbicos pueden participar de la interacción entre moléculas diferentes, originando agregación y posterior gelificación. Se sugiere a las uniones hidrofóbicas e iónicas como las responsables de la gelificación del GMP.
Los barridos de frecuencia mostraron que G´ y G´´ fueron independientes de la frecuencia y los geles presentaron un alto carácter viscoelástico (tan $\delta < 0.05$). G´ en los barridos de frecuencia aumentó con la concentración (**Figuras 4 A** y **4 B**). Estos resultados concuerdan con el valor de G'_{max} hallado por el ajuste de G´ por el modelo matemático (**Figura 3 A**).

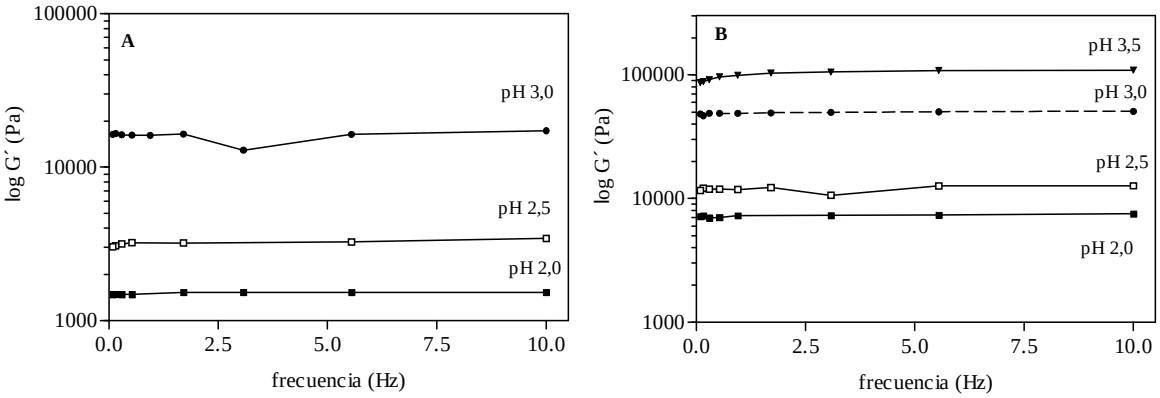


Figura 4. Barridos de frecuencia de geles de GMP obtenidos a diferentes pHs a 70 ºC A) 8 % p/p B) 12 % p/p. Temperatura del ensayo 25 ºC.

Los geles de GMP fueron testeados para analizar su reversibilidad por pH. Luego de ajustar el pH entre 2 y 3,5, el diámetro medio hidrodinámico de las partículas (Z-Ave) creció con el tiempo debido a la agregación espontánea. Resultado de esta agregación, fue la gelificación de las soluciones. La dilución de estos geles al 2% con el pH ajustado a 7 se midió por dispersión dinámica de luz. En la **Figura 5 A** se muestra la distribución de tamaños de partículas por intensidad de una solución de 2% de GMP a pH 7 y de soluciones de GMP previamente gelificadas a la misma concentración. La distribución de tamaños de partículas presentó en todos los casos dos picos. El máximo del pico predominante se ubicó en 2,3 nm para la solución sin gelificación previa y 3,6 nm para las demás independientemente del pH de gelificación. Según el software del Zetasizer Nano-Zs se estimó a estos máximos como las correspondientes a las especies monoméricas y diméricas de GMP respectivamente. En la **Figura 4A** se pueden ver además otros agregados de tamaño entre 60 y 900 nm pero éstos son despreciables en volumen (**Figura 4 B**). En la distribución en volumen puede verse además los desplazamiento de tamaño del pico predominante. Estos resultados indicaron que la reversibilidad de los agregados y geles de GMP fue casi total, aunque la forma monomérica no estuvo más aparente luego de la promover la agregación y la gelificación. Esto señalaría que la forma monomérica del GMP se agrega en una dimérica y que una vez formada ésta no es posible revertirla.

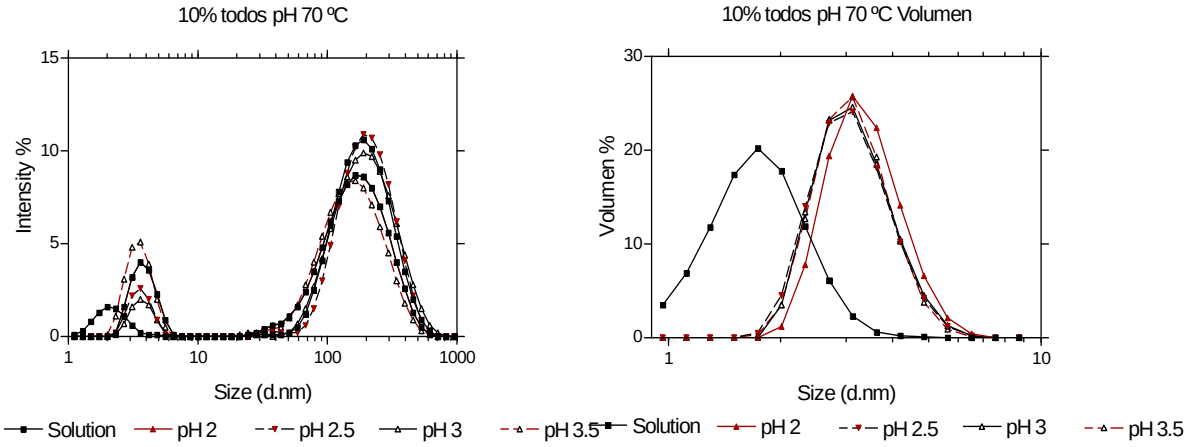


Figura 5. A) Distribución de intensidad y B) distribución en volumen en función del diámetro hidrodinámico de agregados obtenidos a partir de la dilución de geles de GMP formados a pH:

(Δ) 2; (∇) 2,5; (◊) 3 y (○) 3,5 a 25 ºC (■) Solución de GMP sin gelificación previa. (T =25ºC).

CONCLUSIONES

El GMP tiene propiedades gelificantes únicas por lo cual es un ingrediente altamente promisorio. La gelificación estaría establecida principalmente por interacciones de tipo hidrofóbico e iónico. Además, por su capacidad de gelificar a pH bajos en frío, puede ser utilizado en alimentos que no requieran

cocción previa. La reversibilidad por pH es casi total, aunque los dímeros una vez formados parecen ser resistentes a los cambios de pH.

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

Abd El-Salam, M.H.; El-Shibini, S. y Buchheim, W. 1996. Characteristics and potencial uses of the casein macropeptide. International Dairy Journal, 6 ,327-341.

Baeza, R; Gugliotta, L. y Pilosof A.M.R. 2003. Gelation of β-lactoglobulin in the presence of propylene glycol alginate: kinetics and gel properties. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 31 81-93.

Brody, E. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. British Journal of Nutrition 84, Suppl. 1 S39-S46.

Carp D., Bartholomai B. y Pilosof A. 1997. Impact of proteins–κ-carrageenan interactions on foam properties. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 37, 573–580.

Dziuba, J. y Minkiewicz, P. 1996. Influence of glycosilation on micelle-stabilizing ability and biological properties of c-terminal fragments of cow´s k-casein. International Dairy Journal, 6, 1017-1044.

Ney D., Hill A., van Calcar S., Liu X. y 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

Foegeding E., Bowland E. y Hardin C. (1995) Factors that determine the fracture properties and microstructure of globular protein gels. Food Hydrocolloids 9, 237-349.

Kreuβ M., Strikner T. y Kulozik U. 2009. The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. Food Hydrocolloids, doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.011

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

Stading M. y Hermansson A. 1990. Viscoelastic behaviour of β-lactoglobulin gel structures. Food Hydrocolloids 4, 121-135.

Ono, T.; Yada, R.; Yutani, K.; Nakai, S. 1987. Comparison of conformations of κ–casein, para-κ–casein and glycomacropeptide. Biochimica et Biophysica Acta 911, 318-325.

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

Pérez O. y Pilosof A. 2003. Influence of Pulsed Electric Field Processing on the Structure and Gelation of Egg White. En: Eric Dickinson y Ton Van Vliet, editores. Food colloids. Biopolyners and materials. Pág 119-132

Indicadores de cocción en el procesado de *grits* para la producción de laminados de maíz.

Cooking indicators of corn grits processing for the production of corn flakes.

Farroni A. (1,2) Buera M. P. (1)

(1) Dpto. de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
(2) Laboratorio de Calidad de Alimentos. INTA Pergamino.
afarroni@pergamino.inta.gov.ar

RESUMEN

El método clásico de producción de laminados de maíz comienza con el mezclado de *grits* con agua, azúcar y extracto de malta como agentes de formulación. La reacción de Maillard es responsable del desarrollo de color, aromas y sabores durante el proceso de cocción de los *grits*. El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios de color y fluorescencia de superficie que ocurren durante el proceso de cocción al vapor de *grits* de maíz y su uso potencial como indicadores del grado de cocción. Los *grits* comerciales se mezclaron con agua y glucosa (G), extracto de malta (M) o glucosa y extracto de malta (GM) en las proporciones utilizadas en la formulación industrial. Los *grits* se cocinaron al vapor sobrecalentado (121°C) durante diferentes tiempos desde 15 hasta 120 minutos. Se midió el color mediante un sistema de visión computarizada y se expresó en el sistema CIELab. Se midió el espectro de la fluorescencia de superficie mediante retrodispersión excitando a 340nm. La gelatinización del almidón se evaluó por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Luego de un retardo inicial los valores del L* y b* decrecieron significativamente durante el tiempo de cocción en G, M y GM y los valores de a* se incrementaron. Las muestras con glucosa presentaron los valores más bajos de L* y b* mientras que la muestra control no presentó cambios significativos para estos parámetros. El pardeamiento de las muestras se evidenció en un incremento de las componentes roja y azul. El espectro de fluorescencia presentó un pico principal a 488nm con dos hombros a 440 y 520nm respectivamente. Se observó que durante el proceso de cocción la intensidad relativa de emisión de fluorescencia entre 440 y 488nm decreció y entre 520 y 488nm aumentó. Estos cambios relativos fueron más marcados en las muestras que contenían glucosa (G y GM) que en las que contenían sólo malta (M) y no se observaron en la muestra control. Durante los primeros minutos de cocción ocurre la mayor parte de la gelatinización del almidón, siendo mayor al 80% luego de los primeros 5 minutos para C y M y mayor al 70% para G y GM evidenciando la reducción de la disponibilidad de agua producida por los azúcares. Luego de 15 minutos más del 90% del almidón estaba gelatinizado y a los 60m se llegó al 100%. La gelatinización se completó antes del tiempo necesario para desarrollar el pardeamiento (y flavor) característico de estos productos y determinante de la aceptabilidad. La medición del progreso de la reacción de Maillard como indicador del grado de cocción fue complementario a la gelatinización del almidón medida por DSC: mediante este último se pueden determinar cambios a tiempos cortos, mientras que la colorimetría permite establecer una graduación de cocción cuando por DSC ya no se observan cambios. Además las mediciones de color y fluorescencia de superficie son adecuadas y fáciles de implementar en el control de proceso a escala industrial.

ABSTRACT

The classical corn flake production method starts with the mixing of corn grits with water, sugar and malt extract as formulating agents. The Maillard reaction is responsible for the pleasant aroma, taste and colour development during cooking the grits. The aim of this work was to study colour and surface fluorescence changes occurring during the steam cooking process in the production of corn flakes and its use as potential markers of the degree of cooking. Commercial corn “grits” were mixed with water (C) and glucose (G), malt extract (M) or glucose and malt extract (GM) in proportions resembling industrial formulation. The grits were steam cooked up to 120 minutes. Colour was measured using a computer vision system and expressed in the CIELab system. As during Maillard

reaction fluorescent compounds are formed in parallel to brown pigments, surface fluorescence was measured by backscattering, employing an excitation wavelength of 340 nm. Starch gelatinization was evaluated by differential scanning calorimetry (DSC) using 3:1 water/sample ratio. After a lag period L* and b* values decreased significantly during cooking time in G, M and GM samples, while a* values increased. The lowest L* and b* values were found in samples with added glucose. In control samples (C) L* and b* values did not show significant colour changes. The browning of samples resulted in a blue and red components increase. Fluorescence spectra showed a main peak at 488 nm with two shoulders at 440 and 520 nm, respectively. The relative fluorescence intensities at 440 and 488 nm and at 520 and 488 nm were observed to change during cooking time. The fluorescence intensities ratio 440/448 nm decreased, while the fluorescence intensities ratio 520/488 nm increased with cooking time. These relative changes were more marked in glucose containing samples (G and GM) than in M samples and remained constant in C samples. DSC studies indicated that extensive starch gelatinization occurred during the first minutes of cooking, being its degree higher than 80% after 5 minutes in C and M samples, higher than 70% in glucose containing samples, indicating that sugars decreased water availability and slowed starch gelatinization. After 15 minutes cooking time more than 90% starch was gelatinized in all systems. Starch gelatinization was complete before the cooking time necessary to achieve an appreciable degree of visual browning and characteristic flavor, determinant of the product acceptability. Thus, Maillard reaction markers were complementary to DSC measurements in assessing the degree of cooking. By means of DSC measurements short time changes could be determined, whereas Maillard reaction markers allowed to measure changes that occurred further than starch was completely gelatinized. Colour and surface fluorescence measurements were found to be adequate and easy to implement for process control at industrial scale.

PALABRAS CLAVE: *maíz, CDB, fluorescencia, color, reacción de Maillard.*

KEYWORDS: *corn, DSC, fluorescence, color, Maillard reaction.*

INTRODUCCIÓN

La producción de copos de maíz implica la obtención de *grits*, que son trozos grandes de endosperma libres de germen y pericarpio, a partir de los granos de maíz. En el proceso tradicional de laminación los *grits* son mezclados con agua, azúcar y otros agentes de formulación como sal y extracto de malta. La cocción de los mismos se realiza con vapor a presión para gelatinizar el almidón, luego se secan en corriente de aire, se laminan para dar forma a las hojuelas y el proceso termina con un paso de tostado para finalmente obtener los copos (Fast 2000). En estas etapas se producen cambios tanto físicos como químicos que conducen al producto a sus características deseables. Entre los cambios físicos la gelatinización de almidón durante la cocción de los *grits* a presión es uno de los más notables y luego el laminado, la deshidratación y tostado posteriores dan origen al subsiguiente desarrollo de las propiedades físicas y sensoriales adecuadas. Entre las modificaciones químicas, una de las más importantes es la reacción de Maillard, que se produce entre los grupos reductores de los azúcares y grupos amino. En esta reacción se generan una amplia gama de productos de importancia para el valor nutricional de los alimentos y se desarrollan colores aromas característicos (Martins *et al.* 2001). El color es un atributo importante debido a que es un indicador del grado de cocción y contribuye a la aceptabilidad y apreciación de frescura de los alimentos (Valadez-Blanco 2007). En la reacción de Maillard también se forman compuestos fluorescentes que han sido utilizados como marcadores del nivel de modificación de proteínas (Pongor *et al.* 1984, Morales y van Boekel 1997, Obayashi *et al*. 1996, Tessier *et al.* 2002). El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios de color y fluorescencia de superficie que ocurren durante el proceso de cocción al vapor de *grits* de maíz y su uso potencial como indicadores del grado de cocción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se utilizaron *grits* y jarabe de malta gentilmente provistos por una empresa local productora de copos de maíz. Se eligieron tres formulaciones diferentes derivadas de las utilizadas en la fabricación de laminados de maíz, (Fast 2000). Los diferentes ingredientes se utilizaron por separado a fin de

observar su efecto individual. Se mantuvo constante la relación de masas de cada ingrediente con los *grits*. Las formulaciones utilizadas fueron: control (C): 25g *grits*, 15g H_2O; glucosa (G): C + 2g de glucosa; malta (M): C + 0.55g de jarabe de malta; glucosa y malta (GM): C + 2g de glucosa + 0.55g de extracto de malta. La proporción de agua se eligió a fin de lograr un contenido de agua al final de aproximadamente 70 % en base seca (%bs) (Chaunier *et al.* 2007). La cocción se realizó bajo vapor saturado en una olla a presión durante 5, 15, 30, 60 y 120 minutos para todos los sistemas a fin de evaluar los cambios en función del tiempo. Para los estudios de DSC y fluorescencia de superficie se separó una alícuota de cada sistema y se sometió a molienda criogénica y liofilización.

Contenido de agua

El contenido de agua fue determinado por diferencia de masa antes y después del secado hasta peso constante de las muestras en una estufa recirculación forzada a 105ºC. Todos los resultados se expresaron como porcentaje de materia seca (% bs).

Calorimetría diferencial de barrido

Las muestras liofilizadas se pesaron por duplicado (aprox. 10mg) con precisión de 0.01mg, se colocaron en crisoles de aluminio de 40µl de capacidad con una masa de agua tres veces mayor para posibilitar la gelatinización. Luego los crisoles se sellaron herméticamente y se dejaron equilibrar durante 24hs. Se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC 822, Mettler Toledo, Suiza). Como referencia se empleó un crisol vacío y pinchado. Los termogramas fueron obtenidos desde 20ºC a 120°C a una velocidad de calentamiento de 10ºC/min y se analizaron utilizando el software Star^e v6.0 (Mettler Termal Análisis). El porcentaje de gelatinización se calculó como la relación entre la entalpía, expresada en base seca, del pico endotérmico de gelatinización del almidón de la muestra sobre la correspondiente al del *grit* sin procesar.

Análisis de color

Las mediciones se realizaron utilizando análisis de imágenes obtenidas a partir de un sistema de visión computarizada. Esta está compuesto por una cámara digital conectada a una PC equipada con un software de adquisición de imágenes. La muestra fue coloca en una cabina de iluminación difusa cuyo interior está pintado de color gris Munsell 7. Se utilizó un iluminante estándar D65 (6500 K) el cual está diseñado para simular la luz diurna (Lawless & Heymann, 1998). Las muestras se colocaron en un soporte generando una capa de 2 cm de altura de manera que el color no sea afectado por el fondo. Las imágenes se tomaron a 45º ya que a este ángulo es el más apropiado para observar la reflexión difusa responsable del color (Francis & Clydesdale, 1975). Las fotografías se tomaron por triplicado y se analizaron con el software Adobe Photo Shop (Adobe Systems). Este programa posee herramientas permiten el tratamiento de muestras irregulares seleccionando solamente el área de interés para la medición y excluyendo el fondo y áreas con defectos de iluminación o no representativas (sombras, etc.). A partir de los histogramas de distribución de color de las áreas seleccionadas se obtuvieron los parámetros característicos de cada color en la escala CIE Lab (Yam 2004).

Fluorescencia de superficie

Las muestras molidas se conservaron liofilizadas hasta su utilización. Para evitar efectos de superficie, las muestras se comprimieron en pastillas de 1cm de diámetro y 3mm de espesor utilizando una prensa hidráulica. Se determinó el espectro de fluorescencia de superficie utilizando un espectrofluorímetro Ocean Optics con un filtro de excitación de 340nm (Edmund). Esta longitud de onda ha sido usada ampliamente en la determinación de fluorescencia de compuestos de Maillard (Ferrer *et al.* 2000, Matiacevich *et al.* 2005). El haz de excitación se hizo incidir sobre la superficie con un ángulo de 45º y se capturó la emisión por retrodispersión mediante una fibra óptica R400-7-VIS/NIR (Ocean Optics). Esta geometría evita los efectos de reflexión directa del haz de excitación y la reflexión generada por el color de la muestra. Las medidas se realizaron por triplicado y se procesaron con el software OOIBase 32 (Ocean Optics).

Análisis estadístico

En todos los casos los datos se informan como promedios de sus replicados (indicados en cada metodología). Los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 4.00, (GraphPad Software, San Diego California USA) donde las barras de error indican el intervalo de 95% de confianza para el valor representado. Para los datos de porcentaje de gelatinización se realizó análisis de varianza de dos factores y los resultados fueron comparados por el método de la mínima

diferencia significativa de Tukey a un nivel de significación del 95% utilizando el software InfoStat versión 2009 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gelatinización del almidón

La **Tabla 1** muestra el porcentaje de gelatinización del almidón, determinado por DSC, en función del tiempo de cocción para las diferentes formulaciones. El análisis de varianza mostró efecto significativo para el tiempo y para la formulación. Se obtuvo diferencia significativa para las medias de todos los tiempos entre sí: 5, 15, 30 y 60 min ($p<0.05$). Las formulaciones C y M fueron significativamente diferentes de G y GM ($p<0.05$). En los primeros 5 min ocurre una extensa gelatinización siendo mayor que 80% para las muestras C y M y mayor al 70% para G y GM. En las muestras con agregado de glucosa el porcentaje de gelatinización fue menor en los primeros minutos evidenciando la menor disponibilidad de agua por la presencia de azúcares. Luego de 60min los termogramas indicaron que el almidón estaba gelatinizado en un 100% para todas las formulaciones.

Tabla 1. Porcentaje de gelatinización del almidón en función del tratamiento térmico para las distintas formulaciones.

	Formulación			
Tiempo (min)	C	G	M	GM
5	$88,7^{cd}$	$77,7^{ab}$	$81,9^{bc}$	$72,4^{a}$
15	$94,7^{def}$	$91,7^{de}$	$95,8^{def}$	$91,3^{de}$
30	$96,0^{ef}$	$94,1^{def}$	$98,3^{ef}$	$97,9^{ef}$
60	$100,0^{f}$	$100,0^{f}$	$100,0^{f}$	$100,0^{f}$

Letras diferentes indican diferencia significativa para test de Tukey ($p<0.05$)

Desarrollo de color

El valor de L* disminuyó con el tiempo (**Figura 1**) indicando un oscurecimiento de las muestras, el efecto fue más marcado en las muestras que contenían glucosa por el aporte de grupos carbonilo más reactivos que los del extracto de malta que presentó menores diferencias con el control. En la **Figura 2** se observa la variación de la cromaticidad representada por los valores de a* y b*. El valor de a* aumentó indicando un desplazamiento hacia el rojo, mientras que b* disminuyó mostrando un desplazamiento hacia el azul. En las muestras con glucosa, G y GM, este desplazamiento fue mayor que en las otras (C y M). Estas variaciones en las coordenadas cromáticas evidencian el pardeamiento característico de este tipo de alimentos. Las variaciones de color ocurrieron luego de los 15 minutos indicando la existencia de un período inicial de baja velocidad de reacción. Este período de retardo ha sido descripto previamente en sistemas modelo para el desarrollo de la reacción de Maillard (Matiacevich y Buera 2006). Las muestras sin glucosa, C y M, no presentaron cambios significativos en el valor de b*. Estas muestras contienen menor proporción de azúcares reductores que el resto de las muestras, entonces se oscurecen menos. Se ha observado previamente que en las muestras sujetas a las reacciones de pardeamiento, el valor de b* comienza a disminuir cuando el grado de oscurecimiento (L*) alcanza un valor del 50% aproximadamente.

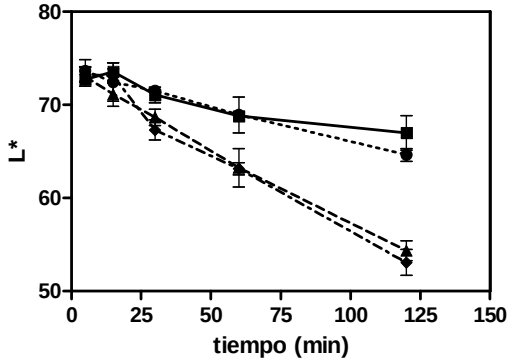


Figura 1. Variación de L* con el tiempo de cocción y la formulación: ■ control, ▲ glucosa, ● malta, ♦ glucosa y malta. Las barras de error representan el intervalo del 95% de confianza para la media.

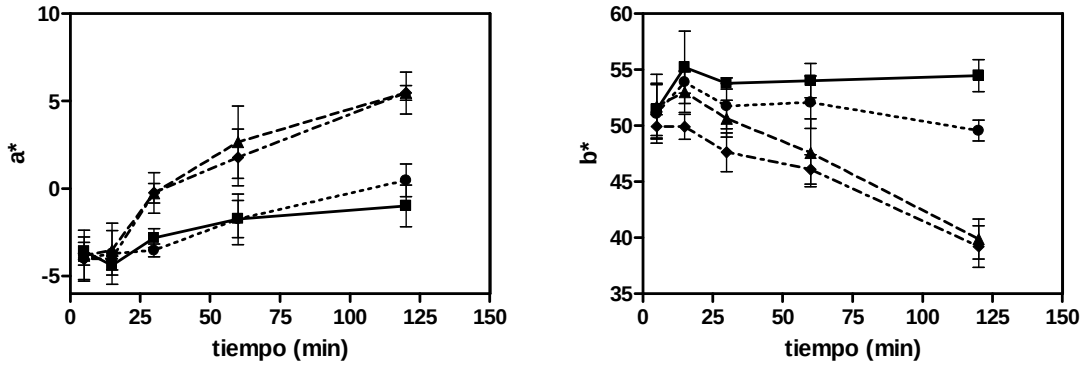


Figura 2. Variación de a* y b* con el tiempo de cocción y la formulación: ■ control, ▲ glucosa, ● malta, ♦ glucosa y malta. Las barras de error representan el intervalo de 95% de confianza para la media.

Fluorescencia de superficie

La **Figura 3** muestra un espectro típico de fluorescencia de superficie de las muestras comprimidas (que presentaban una cara alisada para evitar efectos de superficie). Se indican los picos principales de fluorescencia presentes en todas las muestras. Se analizaron las relaciones de las intensidades de los picos secundarios con el pico más alto: 440/488 y 520/488 para estudiar más sensiblemente la variación relativa de la fluorescencia. La muestra C no presentó variaciones para las relaciones 440/488 y 520/488 al lo largo de los 120min de tratamiento térmico (**Figuras 4** y **5**) y sus valores no difirieron significativamente del *grit* sin tratar. Para las demás formulaciones la relación 440/488 disminuyó con el tiempo de cocción. Esta disminución fue más importante en las muestras con glucosa (G y GM) que en C y M. En el caso de M, se observó que la mayor diferencia apareció a los 120m existiendo una superposición variable de los intervalos de confianza para tiempos menores. La relación 520/488 mostró una tendencia similar pero opuesta en función del tiempo: en este caso su valor aumentó cuando el cociente anteriormente analizado disminuía. Esto indicaría que la presencia de compuestos que emiten a longitudes de onda (λ) mayores (520nm) se hizo más importante frente a los que emiten a λ bajas (440nm). Al contrario que para el desarrollo de color no se observa un retardo inicial claramente marcado. Comparando las curvas de desarrollo de color y cambios en la intensidad relativa de los picos de fluorescencia con los valores de grado de gelatinización del almidón puede conjeturarse que en los primeros minutos la reacción de Maillard es más lenta hasta que el almidón se gelatiniza en un gran porcentaje y pierde su estructura. Es probable que una estructura más laxa en la matriz, luego de la gelatinización, en presencia de contenido de agua adecuado favorezca el desarrollo del pardeamiento no enzimático. En este momento el grado de gelatinización no cambia (o aumenta muy levemente) y comienzan a aumentar sensiblemente los indicadores de la reacción de Maillard.

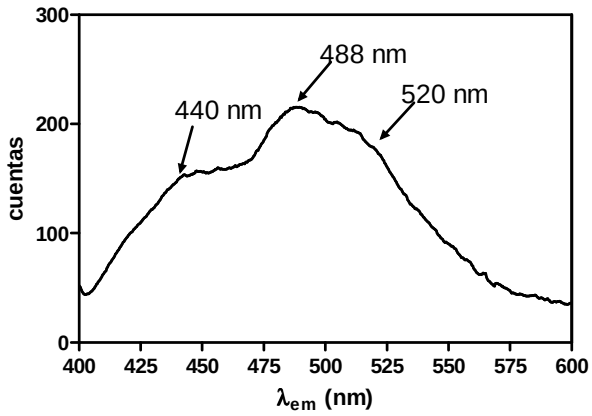


Figura 3. Espectro de emisión de fluorescencia de superficie utilizando una λ_{ex} de 340nm. Las flechas indican los picos y hombros utilizados para la medición.

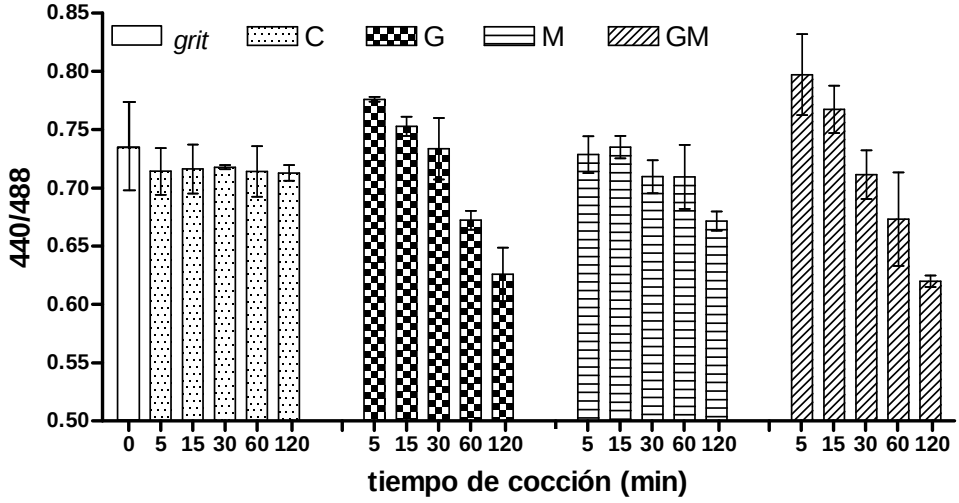


Figura 4. Relación de intensidad de fluorescencia de superficie 440/488nm en función del tiempo para las diferentes formulaciones. Las barras de error representan el intervalo del 95% de confianza.

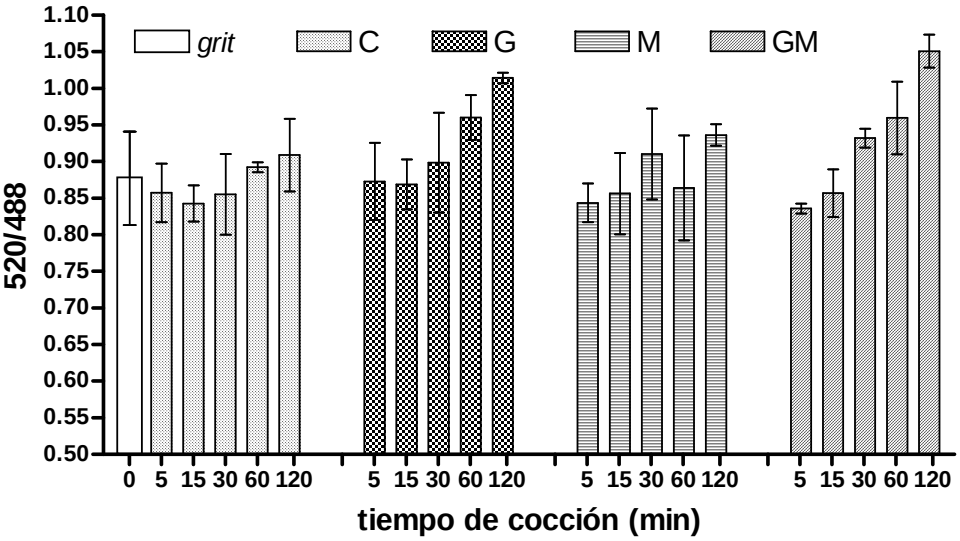


Figura 5. Relación de intensidad de fluorescencia de superficie 520/488nm en función del tiempo para las diferentes formulaciones. Las barras de error representan el intervalo del 95% de confianza.

CONCLUSIONES

La gelatinización del almidón se completó en los primeros 60 minutos, el resto del tiempo de cocción fue necesario para desarrollar el pardeamiento (y flavor) característico determinante de la aceptabilidad de estos productos. La medición del progreso de la reacción de Maillard fue un indicador complementario del grado de cocción al de la gelatinización del almidón medida por DSC: mediante este último se pueden determinar cambios a tiempos cortos, mientras que la colorimetría permite establecer una graduación de los cambios generados durante la cocción cuando por DSC ya no se observan transformaciones (100% de almidón gelatinizado). Además las mediciones de color y fluorescencia de superficie son adecuadas y fáciles de implementar en el control de proceso a escala industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a UBA (UBACyT X226), CONICET (PIP5977), ANPCyT (PICT 20545) e INTA por el financiamiento de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Chaunier L, Della Valle G, Lourdin D. 2007. Relationships between texture, mechanical properties and structure of cornflakes Food Research International: 40, 493–503.

Fast RB, Caldwell EF. 1990. Breakfast cereals and how they are made. St-Paul, MN. American Association of Cereal Chemists. pag. 16–17 y 122–123.

Ferrer E, Alegría A, Farre R. 2000. Advanced glycosilation end products (AGEs) and colour in milk and milk resembling systems. A review. Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry: 4, 269–290.

Francis FJ, Clydesdale FM. 1975. Food colorimetry: theory and applications. Westport, CT: AVI Publishing. pag 73.

Lawless HT, Heymann H. 1998. Sensory evaluation of food: principles and practices. New York: Chapman & Hall. pag. 406–429.

Martins SIFS, Jongen WMF, van Boekel MAJS. 2001. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. Trends in Food Science & Technology: 11, 364–373.

Matiacevich SB, Buera MP. 2006. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. Food Chemistry: 95, 423-430.

Matiacevich, SB, Santagapita PR, Buera MP. 2005. Fluorescence from the Maillard reaction and its potential applications in food science. Critical Reviews in Food Science and Nutrition: 45, 483–495.

Morales FJ, van Boekel, MAJS. 1997. A study on advanced Maillard reaction in heated casein/sugar solutions: fluorescente accumulation. International Dairy Journal, 7, 675–683.

Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M, Fujii M, Kitagawa Y, Nakamura N, Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K, Ohta M, Nishimura M, Fukui I, Kondo M. 1996. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications: 226, 37–41.

Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A. 1984. Aging of proteins: isolation and identification of fluorescent chromophores from the reaction of polypeptides with glucose. Proceedings of the National Academy of Sciences: 81, 2684–2688.

Tessier F, Monnier VM, Kornfield JA. 2002. Characterization of novel chromophores, fluorophores and cross-links from glyceraldehydes, lysine and arginine. International Congress Series: 1245, 303–311.

Valadez-Blanco R, Virdi AIS, Balke ST, Diosady LL. 2007. In-line colour monitoring during food extrusion: Sensitivity and correlation with product colour. Food Research International: 40, 129–1139.

Yam KL, Papadakis SE. 2004. A simple digital imaging method for measuring and analyzing colour of food surfaces Journal of Food Engineering: 61, 137–142.

Brazilian consumer preference for soy-coffee beverage

Preferencias de los consumidores brasileros por bebidas de soja-café

Felberg I (1), Deliza R (1), Farah A (2), Donangelo C M (2), Calado V. (3)

Embrapa Agroindústria de Alimentos. Av. das Américas, 29501 - Guaratiba. Rio de Janeiro, RJ, CEP 23020-470, Brazil. E-mail: ilana@ctaa.embrapa.br
(2) Laboratório de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A - 5° andar - Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-909, Brazil.
(3) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Horácio Macedo, 2030 -Bloco E – Cidade Universitária. Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-909 Brazil.

ABSTRACT

The consumption of soy products has been reported to reduce the risk of several diseases Soy beverages are a new generation of soy products and are a convenient and healthy way to include soy protein in the consumer regular diet. Although Brazil is the second world soybean producer, soymilk is practically unknown to most Brazilian consumers and those who try the product tend to present a negative attitude towards soymilk. On the other hand, Brazil is the second largest coffee consumer market in the world, and coffee is very much liked, among Brazilian people. Furthermore, a number of recent studies have reported beneficial health properties attributed to coffee. Taking into account the current consumer trend for healthier alternatives in food products together with the health benefits of these two important Brazilian commodities and also considering the lack of a similar product available in the market, we decided to study the consumer acceptance of soy-coffee beverages. The objective of this study was to evaluate 18 samples of a new developed soy-coffee beverage in order to identify its acceptability using the Internal Preference Mapping (IPM). Instant coffee (Cia de Café Solúvel), soymilk powder (Olvebra Industrial S.A) and sugar were used as ingredients and their concentration was according to a 2^3 central composite design with six axial points and four central points, totaling 18 samples. Instant coffee, soymilk powder and sugar level concentrations ranged from 1.32 to 5.98%, from 7 to 11.02% and from 6.64 to 13.36%, respectively. Sixty coffee consumers (29 women and 31 men, at least one cup of coffee a day) evaluated the acceptability of each beverage using a 9-point structured hedonic scale varying from “dislike extremely” to “like extremely”. Samples were presented at 8°C (± 2°C). ANOVA, Fisher´s test, IPM and Cluster Analysis were performed. Samples mean acceptability differed significantly ($p<0,05$) and varied from 3.5 to 5.8. The first, second and third components of the IPM accounted for 50% of the total variance. Three clusters were identified for overall acceptance. Cluster 3 was the largest one, with 51.7% of consumers. For this segment the preferred samples were those with low coffee and/or high sugar content. IPM showed that low coffee and/or high sugar content drove the preference of the majority of the Brazilian consumers that participated in the study.

RESUMEN

El consumo de productos de soja ha sido relacionado con reducción del riesgo de diversas enfermedades. Bebidas a base de soja constituyen una nueva generación de productos de soja y representan una forma conveniente y saludable de incluir proteína de soja en la dieta habitual del consumidor. Sin embargo, el extracto de soja es prácticamente desconocido para la mayor parte de los consumidores Brasileños y aquellos que lo han probado tienden a presentar una actitud negativa frente al producto. Por otro lado, Brasil es el segundo mercado mundial consumidor de café, y la bebida de café es muy apreciada por la población Brasileña. Además, varios estudios recientes han atribuido al café diversas propiedades benéficas a la salud. Considerando, la actual tendencia de los consumidores para alimentos alternativos mas saludables, los beneficios para la salud de estas dos importantes *commodities* Brasileñas y la falta de productos similares en su mercado, decidimos estudiar la aceptación por parte del consumidor de bebidas a base de soja y café. El objetivo del estudio fue evaluar 18 muestras de una nueva bebida de soja y café de forma a identificar su aceptabilidad utilizando el Mapa Interno de Preferencia (IPM). Café instantáneo (Cia de Café Solúvel), extracto de

soja en polvo (Olvebra Industrial S.A) y azúcar fueron usados como ingredientes, con concentraciones elegidas de acuerdo a un diseño combinado central de 2^3 con seis puntos axiales y cuatro puntos centrales, totalizando 18 muestras. Las concentraciones de café instantáneo, extracto de soja y azúcar variaron de 1.32 a 5.98%, 7 a 11.02% y 6.64 a 13.36%, respectivamente. Sesenta consumidores de café (29 mujeres y 31 varones, con consumo habitual de por lo menos una taza de café por día) evaluaron la aceptabilidad de cada bebida usando una escala hedónica estructurada de 9 puntos, variando de no gustar extremadamente a gustar extremadamente. Las bebidas fueron presentadas a 8°C (± 2°C). Fueron realizados análisis por ANOVA, Fisher´s test, IPM y de Cluster. La aceptabilidad promedio de las muestras difirió significativamente ($p<0,05$) y varió de 3.5 a 5.8. Los primeros tres componentes combinados del IPM contribuyeron con 50% de la variancia total. Tres *clusters* fueron identificados en la aceptación global. El *cluster* 3 fue el mayor, con 51.7% de los consumidores. Para este segmento, las muestras preferidas fueron aquellas con baja concentración de café y alta de azúcar. El IPM mostró que el bajo contenido de café y/o alto de azúcar direccionó la preferencia de la mayor parte de los consumidores Brasileños que participaron del estudio.

KEYWORDS: *consumer preference, soy; coffee, beverage*.

PALABRAS CLAVE: *Consumidores, preferencias, soja, café, bebida.*

INTRODUCTION

The consumption of soy products has been reported to reduce the risk of several diseases, including breast and prostate cancers, osteoporosis and heart diseases (Messina *et al.*, 2006; Barnes *et al.*, 2006). Among soy derivatives, soymilk is an excellent source of protein and essential fatty acids, cholesterol-free and relatively cheap in comparison with other food protein sources (Lozano *et al.* 2007). Although Brazil is the second world soybean producer, soymilk is practically unknown to most Brazilian consumers and, those who have tried the product tended to present a negative attitude towards it, mainly for its undesirable sensory properties (Tashima and Cardello, 2003; Behrens *et al.*, 2004). On the other hand, Brazil is the first coffee bean producer and the second largest coffee consumer market in the world, and coffee is very much liked among Brazilian people (ABIC, 2009). It is usually consumed mainly for pleasure, taste and aroma of the beverage (Cristovam *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2000). Furthermore, a number of recent studies have found beneficial health properties attributed to coffee (Farah, 2004; Farah and Donangelo, 2006, Higdon and Frei, 2006).

To formulate any successful product the food industry must run consumers test, but usually, acceptability data of samples obtained from hedonic scaling are expressed as mean scores. However, consumer preference responses are usually heterogeneous, and mean scores may not be representative of any individual opinion. The Internal Preference Mapping (IPM) is a statistical technique which examines individual rating by consumers and provides this kind of information (Greenhoff and MacFie, 1994; Yackinous *et al.*, 1999). The main advantage of IPM is that it provides information on the variability of the consumer individual opinions on acceptability of samples and offers the possibility of segmenting them in groups of similar preference criteria. Considering the current consumer trend for healthier alternatives in food products together with the health benefits of these two important Brazilian commodities, and also considering the lack of a similar product available in the market, we decided to study the consumer acceptance of soy-coffee beverages. The objective of this study was to evaluate 18 samples of a new developed soy-coffee beverage in order to identify its acceptability using the Internal Preference Mapping (IPM).

MATERIAL AND METHODS

Soy-coffee beverage samples

The ingredients used to elaborate the soy-coffee beverage samples were Robusta instant coffee (Coffea canephora cv. Conilon) provided by Cocam (Companhia de Café Solúvel, Catanduva - SP, Brazil), soymilk powder provided by Olvebra (Olvebra Industrial S.A, Eldorado do Sul - RS, Brazil), and sugar cane purchased from the local market.

Sample beverages were prepared at different levels of ingredients, as shown in **Table 1**, by mixing them with spring water at room temperature. The prepared beverages were kept refrigerated (8 ± 2°C) until tested by consumers on the next day.

Table 1. Mean acceptability[§] scores of the soy-coffee beverages

Samples	Coffee (g%)*	Soymilk (g%)*	Sugar (g%)*	Acceptability score§	Approval Index (%)**
18	3.00	8.50	13.36	5.8^{a}	65
3	2.00	7.00	12.00	5.7^{ab}	65
11	2.00	10.00	12.00	5.5^{abc}	65
13	1.32	8.50	10.00	5.5^{abc}	58
16	3.00	11.02	10.00	5.3^{abcd}	57
8	3.00	8.50	10.00	5.2^{abcde}	57
2	3.00	8.50	10.00	5.0^{bcde}	53
4	3.00	8.50	10.00	4.9^{cdef}	43
9	4.00	10.00	12.00	4.9^{cdef}	48
5	4.00	7.00	12.00	4.7^{def}	47
10	3.00	8.50	10.00	4.7^{def}	45
12	2.00	10.00	8.00	4.7^{def}	38
15	3.00	5.98	10.00	4.5^{efgh}	38
7	2.00	7.00	8.00	4.1^{fgh}	32
14	4.68	8.50	10.00	3.8^{gh}	25
1	4.00	7.00	8.00	3.7^{h}	22
17	3.00	8.50	6.64	3.7^{h}	20
6	4.00	10.00	8.00	3.5^{h}	25

Values with different superscript letters within the same row are significantly different by Fisher´s test ($p \leq 0.05$).[§] evaluated in a 9-point hedonic scale varying from 1 = *dislike extremely*, 5= *neither like nor dislike*, 9 = like extremely; * g added to 100mL of spring water to prepare the beverage, ** consumer ratings > 5.0

Consumer test to identify the optimum concentration of ingredients for the soy-coffee beverage

A 2^3 central composite design with six axial points and four central points, totaling 18 samples, was used to determine the optimum concentration of instant coffee, soymilk powder and sugar (independent variables) in the soy-coffee beverage. Instant coffee, soymilk powder and sugar level concentration ranges were selected following manufacturers recommendations and previous experiments (Felberg *et al.*, 2008), and varied from 1.32 to 4.68g%, from 5.98 to 11.02g% and from 6.64 to 13.36g%. They wereadded to 100mL of spring water to prepare the beverages (**Table 1**).

The acceptance test was carried out in standardized sensory booths. The study was performed by a group of 60 consumers (29 women and 31 men), habitually consuming one or more cups of coffee per day, recruited among staff, students and visitors at Embrapa Food Technology research center in Rio de Janeiro – RJ. Each consumer evaluated all the 18 formulations using a nine-point structured hedonic scale, where 1 = "dislike extremely" and 9 = "like extremely". Sample beverages were prepared with spring water and presented at 8 ± 2°C in 50mL plastic cups coded with three digit numbers. Samples were presented in a monadic sequential order. A complete randomized design was used, and each assessor evaluated six samples per session throughout three sessions. The order of sample presentation was balanced to prevent carry over effects (MacFie *et al.*1989). Water and unsalted cracker were provided for mouth rinsing between samples.

Statistical analysis

Statistical software STATISTICA™, version 8.0 for windows (StatSoft®), was used for the experimental design and for the hedonic ratings (degree of liking) for response surface methodology (RSM) analysis. ANOVA and Fisher test (LSD) was used to verify significant differences among means ($p<0.05$). The IPM and cluster analyses were performed using XLSTAT-MX (2005) for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

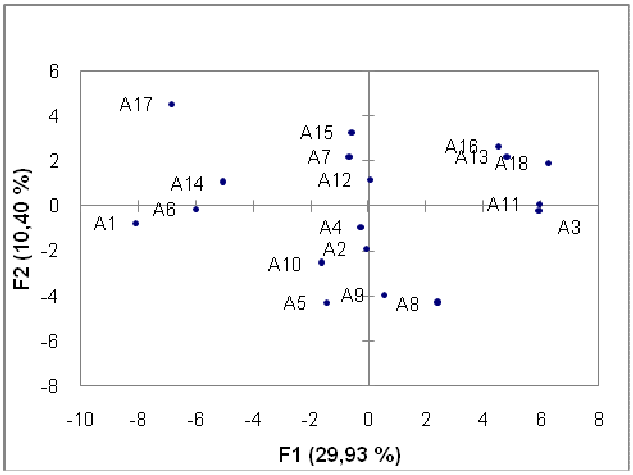
Consumer study to establish optimum concentration of ingredients for the soy-coffee beverage

Table 1 presents the design matrix with the acceptability scores and the approval indexes (consumer ratings > 5.0). Hedonic ratings for the samples were drastically different and the most preferred ones had a consumer mean score ranged from 5.0 ("neither like nor dislike") to 6.0 ("like slightly") on a 9-point hedonic scale. Desphane *et al.* (2008) considered the lower limit of acceptability for optimizing formulations of a chocolate-flavored peanut-soy beverage as having consumer ratings ≥ 5.0, evaluated in a 9-point hedonic scale. When utilizing the same criteria we had seven samples of the 18 ones with consumer ratings ≥ 5.0.

ANOVA results for acceptance data from all consumers revealed that samples differed significantly in terms of acceptability ($p \leq 0.05$), with a range of mean scores from 3.5 to 5.8 (**Table 1**). There was no significant difference among the most preferred samples (18, 3, 11, 13, 16, and 8). The approval index from those samples varied from 65% to 57%. The less accepted samples were 6, 17, 1, 14, 7, and 15. Both samples 1 and 6, had high coffee concentration (4g%) and low sugar levels (8g%), with 7g% and 10g% of soymilk content respectively. Sample 17 had the lowest sugar content studied (6.6g %), and sample 14 presented the highest level of instant coffee (4.68 g%).

Figure 1 presents the Internal Preference Maps derived from the liking scores of the 60 consumers for the 18 soy-coffee beverages samples defined by the first 2 principal dimensions. Samples' position can be seen in Fig. 3(a), consumers' position and the identified clusters in Fig. 3(b).

(a)



(b)

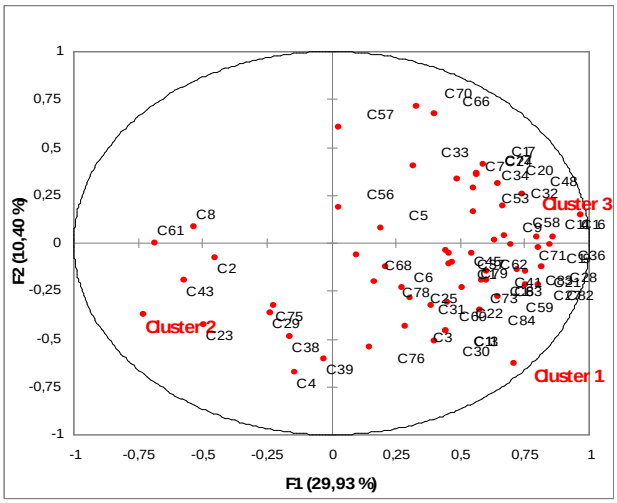


Figure 1. Internal Preference Mapping of 18 soy-coffee beverages, showing: (a) beverage samples and (b) consumers' position (n=60) with the three clusters.

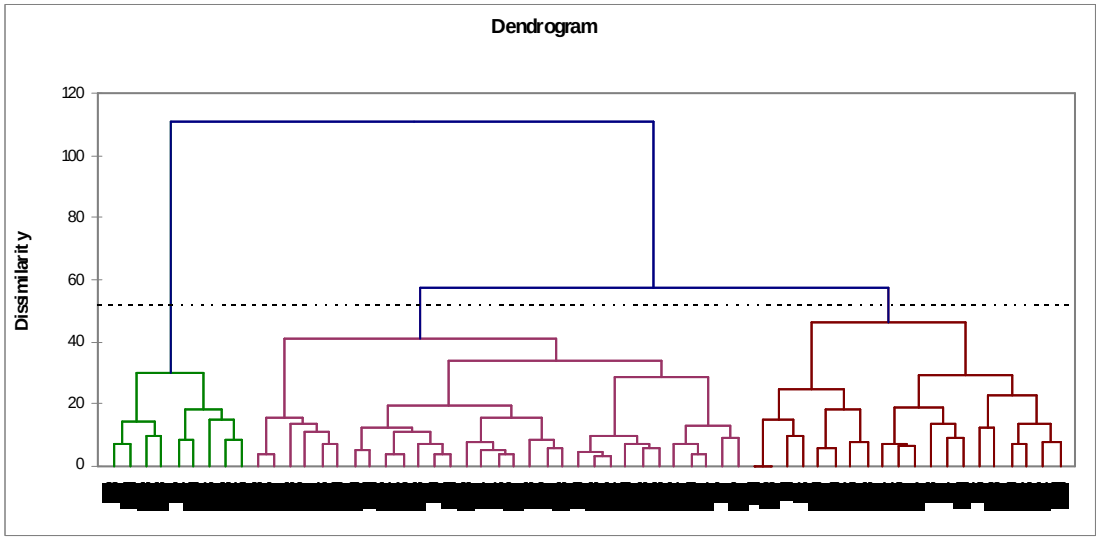


Figure 2. Consumers' clusters according to their overall acceptance scores.

Principal component 1 separated the beverages into three main groups (**Figure 1** (**a**)). The first group was located in the top right quadrant and had samples with low coffee and/or high sugar content, i.e. samples 3, 11, 13, 18, and 16. Samples 15, 7, 12, 4, 2, 10, 9, 5 and 8 were separated in a second group. Samples 2, 4, 8 and 10 were the center point's samples of the design. Samples 17, 14, 6 and 1 comprised the third group and were the least accepted ones.

Figures 1(**b**) revealed the existence of significant differences in preference among consumers. The consumers were segmented and distributed around the various quadrants of the preference space. Cluster analysis were conducted and included later in the Preference Mapping, in order to visualize the group of consumers who liked the samples in similar manner.

Three clusters of consumers were found for overall acceptance (**Figure 2**). Cluster 1, with 20 subjects, (33.3% of consumers), had high acceptability scores for samples that presented high sugar content. For cluster 3, with 31 subjects, (51.7% of participants), the preferred samples were products 18, 3, 11 and 13 and received the highest grade of approval index (**Figure 1** and **Table 2**). These results indicate that the majority of consumers was in cluster 3, suggesting that the preference of this cluster might be considered when selecting the soy-coffee beverage sample.

CONCLUSIONS

Soy beverage samples differed in their average acceptability data ($p < 0.05$) with a range of mean scores from 3.5 to 5.8.

The most preferred samples had the lowest instant coffee content and the highest sugar content.

Internal Preference Mapping showed that low coffee and/or high sugar content drove the preference of the majority of the Brazilian consumers that participated in the study.

Cluster Analysis revealed three segments of consumers based on their liking similarities for the analyzed samples.

The results indicate that the majority of consumers (52%) was in cluster 3, suggesting that the preference of this cluster might be considered when selecting the soy-coffee beverage sample.

AKNOWLEDGMENT

Olvebra Industrial S.A and Cocam Cia de Café Solúvel e Derivados, for kindly providing the ingredients and CBP&D Café/EMBRAPA for the financial support.

REFERENCES

ABIC, 2009. Available at: http://www.abic.com.br. Accessed on: January, 2009.

Barnes, S, Prasain, J, D'alessandro, T, Wang, C, Zhang, H, Kim, H. Soy Isoflavones. Nutritional oncology, pp. 559-571. Heber, D, Blackburn, G. L, Go, V. L. W, Milner, J, Eds, 2ª ed., Academic Press: St. Louis Chapter 32.

Behrens, JH.; Silva, MAAP. 2004. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 24: 431–439.

Cristovam, E, Russell, C, Paterson, A, Reid, E. 2000.Gender preference in hedonic ratings for espresso and espresso-milk coffees. Food Quality and Preference 11(6): 437-444.

Deshpande, RP, Chinnan, MS, McWatters, KH. 2008.Optimization of a chocolate-flavored, peanut-soy beverage using response surface methodology (RSM) as applied to consumer acceptability data. LWT Food Science and Technology 41 (8): 1485-1492.

Farah A. 2004. Distribuição nos grãos, importância na qualidade da bebida e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café [dissertation]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Farah, A; Donangelo, C. M. Phenolic compounds in coffee. 2006. Braz. J. Plant Physiol., Londrina, 18 (1): 23–36.

Felberg, I., Deliza, R.; Farah, A, Sundfeld, E, Calado, V, Donangelo CM. 2008. Coffee-soy based beverage: Product formulation and consumer acceptance. In: 22nd International Conference on Coffee Science/ ASIC in 14 -19 sept. 2008.Campinas, SP, Brazil.

Greenhoff, K, MacFIE, HJH. 1994. Preference mapping in practice. Measurement of Food Preferences, 137-166.

Higdon, J.V., Frei, B. 2006.Coffee and health: A review of recent human research. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 46 (2): 101-123.

Lozano, PR, Drake, M, Benitez, D, Cadwallader, KR. 2007. Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (8): 3018-3026.

MacFIE, HJH, Bratchell, N, Greenhoff, K, Vallis, LV. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. Journal of Sensory Studies, 4: 129-148.
MacFie, 2007. Consumer Led Food Product Development. MacFie Training Services. CRC Press, UK. 279 p.

Messina, M, McCaskill-Stevens, W, Lampe, JW. 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: Review, commentary, and workshop proceedings. Journal of the National Cancer Institute, 98 (18): 1275-1284.

Moreira, RFA, Trugo, LC, De Maria, CAB. 2000.Volatile components in roasted coffee. Part II. Aliphatic, alicyclic and aromatic compounds. Química Nova, 23 (2): 195-203.

STATISTICA™, version 8.0 for windows. StatSoft®, Tulsa. 2008

Tashima, EH, Cardello, HMAB. 2003. Perfil sensorial de extrato hidrossolúvel de soja (Glicine Max L. Merril) comercial adoçado com sacarose e com sucralose. B.CEPPA, Curitiba, 21(2): 409-428.

XLSTAT-PRO User's Guide, version 7.5.3. Addinsoft Inst Inc, NY,USA. 2005.

Yackinous, C, Wee, C, Guinard, J-X. 1999. Internal preference mapping of hedonic ratings for Ranch salad dressings varying in fat and garlic flavor. Food Quality and Preference 10 (4-5): 401-409.

Efecto de la concentración de polifenoles en la percepción de la acidez y la astringencia en sistemas modelo agua/vino tinto

Effect of polyphenols concentration on the perception of acidity and astringent character in model systems water/ red wine

Goldner, M C y Zamora, M C

CONICET – Fac. Ciencias Agrarias UCA, Argentina.
Cap. Gral Ramón Freire 183 (C1426AVC) Ciudad de Buenos Aires
cristigol@gmail.com

RESUMEN

El vino tinto contiene muchos componentes como ácidos orgánicos, azúcares, etanol y polifenoles que influyen en la percepción de la astringencia, sensación oral definida como de sequedad y rugosidad, producto de la precipitación de los compuestos polifenólicos al interactuar con las proteínas salivares.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la concentración de polifenoles en la percepción de las sensaciones de astringencia y acidez en medio acuoso y en vino tinto; y determinar los parámetros temporales más importantes en su percepción.

Con un panel entrenado -10 evaluadores- se realizaron mediciones de acidez y astringencia por el método de intensidad-tiempo en soluciones modelo a base de vino y agua. En vino, se utilizaron dos niveles de azúcares reductores –3,60 y 5,80 g/l- dos niveles de acidez titulable –5,10 y 6,50 g/l- y tres niveles de ácido gálico –1,40, 4,30 g/l y 7,20 g/l-, usando un vino base (13,5% etanol). En medio acuoso, el modelo consistió en dos niveles de azúcares reductores –3,60 y 5,80 g/l- dos niveles de acidez titulable –5,10 y 6,50 g/l- y cuatro niveles de ácido gálico –0,50-1,40- 4,30 g/l y 7,20 g/l- con 13,5 % de etanol.

Se obtuvieron medidas de intensidad máxima (Imax), tiempo para alcanzar la intensidad máxima (Timax), tiempo en alcanzar la mitad de la intensidad máxima (T50max), duración total (Tdur), tiempo de duración de la intensidad máxima (Tpla) y área bajo la curva (ABC).

La Imax de astringencia -en el rango de ácido gálico evaluado- fue afectada por los componentes del vino que modulan su percepción; se necesitó incrementar casi nueve veces la concentración de ácido gálico en vino para igualar la intensidad astringente en agua. Este efecto no se vio reflejado en las variables TImax, Tpla, T50max y Tdur, donde ni el aumento de la concentración de ácido gálico ni el cambio de contexto los modificó.

La Imax de acidez percibida en vino resultó 1,6 veces mayor cuando la concentración de ácido gálico aumentó de 1,4 a 4,3 g EAG/l (equivalentes de ácido gálico).

En el balance astringencia/acidez, los componentes minoritarios del vino cumplen un rol importantísimo. Dentro de la máxima concentración de polifenoles del vino comercial (5,0 g EAG/l), las intensidades máximas de acidez y astringencia fueron similares y se duplicaron al aumentar de 1,4 a 4,3 g EAG/l. Este incremento también aumentó la duración de la sensación de acidez, pero no tuvo efecto en la duración de la astringencia donde es más importante la forma en que se desvanece esta sensación.

Las soluciones más ácidas también resultadon más astringentes, indicando un efecto potenciador de ambas sensaciones. El resto de los compuestos del vino actúan moderando las sensaciones percibidas; la acidez y la astringencia fueron menos intensos en vino que en agua o a lo sumo resultaron isointensas.

ABSTRACT

Wines contain multiples components such us organic acids, sugars, ethanol, and polyphenols that affect astringency perception, oral sensation defined us drying and roughing, result of polyphenols precipitation when they interact with salivary proteins.

The aim of this work was to study the effect of polyphenols concentration in astringency and sourness perception in water and wine media; and to determine the most important temporal parameters involved in their perception.
Sourness and astringency were measured by a trained panel -10 assessors- with time-intensity method in wine and water model solutions. In wine, two levels of reducing sugars -3.60 and 5.80 g/l- two levels of tritatable acidity -5.10 and 6.50 g/l- and three levels of gallic acid -1.40, 4.30 and 7.20 g/l- with a base wine (13.5%) were used. In water, model consisted of in two levels of reducing sugars -3.60 and 5.80 g/l- two levels of tritatable acidity -5.10 and 6.50 g/l- and four levels of gallic acid -0.50, 1.40, 4.30 and 7.20- with ethanol 13.5%.
It was obtained measures of maximum intensity (Imax), time to rich maximum intensity (Timax), time to rich half of maximum intensity (T50max), total duration (Tdur), duration of maximum intensity (Tpla) and area under the curve (AUC).
Astringency Imax –in the evaluated range of gallic acid- was affected by wine components that module its perception; it was necessary to increment nine times gallic acid concentration in wine to match astringency intensity in water. This effect was not observed in variables Timax, Tpla, T50max and Tdur, where neither the gallic acid increasing nor context change modified them.
Sourness Imax resulted 1.6 times higher when gallic acid concentration increased from 1.4 to 4.3 g GAE/l.
Minority wine components meet a very important role in astringency/sourness balance. Within the highest polyphenols concentration in commercial wines (5.0 g GAE/l), sourness and astringency Imax were similar and duplicated when increasing gallic acid from 1.4 to 4.3 g GAE/l. This increase has also raised sourness Tdur, but it did not affect astringency Tdur, where it was more important the fading of sensation.
Most acid solutions were also the most astringent, indicating an enhancing effect pf both sensations. The rest of wine components act as moderator of perceived sensations; sourness and astringency were less astringent in wine than in water, at best there were isointence.

PALABRAS CLAVE: *polifenoles totales, intensidad tiempo, vino tinto.*

KEYWORDS: *total polyphenols, time intensity, red wine.*

INTRODUCCIÓN

La astringencia ha sido establecida como la característica más importante del vino tinto (Guinard *et al.* 1986a). Es una sensación oral definida como de sequedad y rugosidad que resulta del incremento de la fricción entre la lengua y las superficies dentro de la boca, producto de la precipitación de los compuestos polifenólicos al interactuar con las proteínas salivares (Gawel 1998). Se sabe que los vinos tintos de alta calidad son ampliamente reconocidos y asociados a una astringencia balanceada; el exceso desvaloriza al resto de los componentes y la falta provoca vinos insípidos (Gawel 1998). En este balance cuanto menos astringente es un vino, mayor acidez puede soportar; cuanta más astringencia menor debe ser su acidez; la combinación de alta acidez y alta astringencia produce vinos duros (Peynaud 1996).
El vino tinto contiene muchos componentes como ácidos orgánicos, azúcares, etanol y polifenoles que influyen en la percepción de la astringencia; es un proceso altamente dinámico que cambia continuamente durante la ingestión y luego de ser escupido o bebido el vino (Noble 1995). El contenido total de fenoles en el vino comercial puede alcanzar un máximo de 5,0 g EAG/l (Singleton *et al.* 1999). Arnold *et al.* (1978) investigaron la intensidad de astringencia en soluciones de vino modelo encontrando que los valores de intensidad aumentaron con el incremento de la concentración de polifenoles. Guinard *et al.* (1986b) también estudiaron la intensidad de astringencia en sistemas modelo con un panel entrenado, y afirmaron que la intensidad de astringencia aumenta con el incremento del nivel de ácido tartárico.
El análisis descriptivo permite evaluar cómo los cambios en la composición del vino afectan la percepción de los atributos sensoriales, pero esto solo no es suficiente para describir todos los aspectos relevantes de un proceso tan dependiente del tiempo. François *et al.* (2006) estudiaron la astringencia en cerveza a través del análisis descriptivo cuantitativo y del método intensidad-tiempo, destacando la importancia de poder estudiar la dinámica de esta sensación por medio de este último método.

Valentová *et al.* (2002) evaluaron la astringencia en sistemas modelo por el método de intensidad-tiempo, encontrando que eran más astringentes aquellas preparadas en agua respecto de las preparadas en vino. Kallithraka *et al.* (1997) observaron que el agregado de ácidos aumentó la intensidad máxima y el tiempo de duración en la percepción de la astringencia y la acidez en soluciones modelo y en vino tinto.
El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la concentración de polifenoles en la percepción de las sensaciones de astringencia y acidez en medio acuoso y en vino tinto; y determinar las variables temporales más importantes en su percepción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Medio vino tinto. Se utilizó un vino tinto 100% Malbec con las siguientes características: 3,60 g/l de azúcares reductores, 5,10 g/l de acidez titulable, 1,4 g/l de polifenoles totales expresados en equivalentes de ácido gálico – g EAG/l- y 13,5 % v/v de etanol. A partir de este vino base se prepararon soluciones modelo modificando las concentraciones de azúcares reductores (fructosa grado analítico, Lab. Ciccarelli), acidez titulable (ácido tartárico grado analítico Alcor, Buenos Aires, Argentina) y fenoles (ácido gálico grado analítico Anedra, Pcia. Buenos Aires, Argentina).
Las soluciones modelo se prepararon con dos niveles de azúcares reductores –3,60 y 5,80 g/l- dos niveles de acidez titulable –5,10 y 6,50 g/l- y tres niveles de ácido gálico –1,40, 4,30 g/l y 7,20 g/l-. Las concentraciones máximas utilizadas se seleccionaron en base a las halladas en la muestra de 56 vinos Malbec analizadas en los trabajos previos.
Medio agua/agua 13,5% etanol. El modelo consistió en dos niveles de azúcares reductores –3,60 y 5,80 g/l- dos niveles de acidez titulable –5,10 y 6,50 g/l- y cuatro niveles de ácido gálico –0,5-1,40-4,30 g/l y 7,20 g/l- con el agregado de 13,5 % v/v de etanol (96% v/v, Fradealco SA., Buenos Aires, Argentina). Se utilizó una solución control con 0,5 g/l de ácido gálico sin etanol.

Panel

El panel estuvo formado por 10 evaluadores voluntarios (6 mujeres, 4 hombres; 24-55 años), todos tenían alguna experiencia en análisis sensorial de vinos: estudiantes de la carrera de *sommeliers* del Colegio de Cocineros Gato Dumas, miembros de la Facultad de Ciencias Agrarias (UCA) y miembros de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA).

Comparación por pares

En este trabajo se realizó la prueba de comparación por pares (ASTM, 1977) para investigar las diferencias de astringencia y acidez entre las soluciones modelo (**Tabla 1**), con el fin de seleccionar las muestras distintas para luego ser evaluadas por el método intensidad-tiempo (IT). Se utilizó el método de sorber y escupir, y el enjuague se realizó con carboximetilcelulosa 0,55% para eliminar el efecto residual de la astringencia de acuerdo a lo publicado por Brannan *et al.* (2001), y agua mineral.
Los evaluadores recibieron un entrenamiento previo (2hs.) para reconocer el gusto ácido y la sensación de astringencia en los distintos medios utilizados (vino, agua y agua con 13,5% de etanol). Las muestras (10 ml) se sirvieron en vasos plásticos codificados con tres dígitos al azar a temperatura ambiente; las evaluaciones se realizaron en cabinas individuales iluminadas con luz blanca (IRAM 20003 1995). Las combinaciones posibles de las soluciones modelo (**Tabla 1**) se evaluaron progresivamente hasta hallar diferencias entre ellas; por ejemplo se comenzó con el par 1-2 (ver **Tabla 1**) y en caso de que las muestras no fueran diferentes, el siguiente par a evaluar sería el 1-3 y así sucesivamente.

Método dinámico: Curvas de intensidad-tiempo (IT)

Muestras. Las soluciones modelo se seleccionaron en base a los resultados de la prueba de comparación por pares. De esta manera, las curvas IT se realizaron sobre las soluciones nº 1, 5 (ambas en vino) y 13 (en agua 13,5% etanol) para astringencia; y las soluciones nº 1, 5 (ambas en vino), 13 (en agua y en agua 13,5% etanol) para las mediciones de acidez.
Entrenamiento del panel. El panel ya estaba entrenado en el reconocimiento de la sensación de acidez y astringencia dado que previamente realizó la comparación por pares. Por lo tanto el entrenamiento se enfocó en el uso de escalas y manejo del programa IT. Durante este período (3 sesiones, 1 hora cada una), los evaluadores realizaron las siguientes pruebas: 1) ordenamiento en escala ascendente de astringencia (1,4 – 4,3 y 7,2 g/l ácido gálico) y acidez (0,2 – 0,4 y 0,6 % ácido

tartárico) de soluciones en vino, agua y agua con 13,5% de etanol, 2) Uso de escala no estructurada sobre el monitor.

Tabla 1. Composición de las soluciones modelo estudiadas.

nº	EAG (g/l)	Az. red. (g/l)	Acidez tit. (g/l)
Medio vino tinto/agua 13,5% etanol			
1 (vino base)	1,40	3,60	5,10
2	1,40	3,60	6,50
3	1,40	5,80	5,10
4	1,40	5,80	6,50
5	4,30	3,60	5,10
6	4,30	3,60	6,50
7	4,30	5,80	5,10
8	4,30	5,80	6,50
9	7,20	3,60	5,10
10	7,20	3,60	6,50
11	7,20	5,80	5,10
12	7,20	5,80	6,50
Medio agua/agua 13,5% etanol			
13	0,50	3,60	5,10

Cada evaluador realizó curvas de astringencia y de acidez con el programa IT con las soluciones nº 1 y 5 sin ninguna restricción; a partir de allí, se calcularon valores promedio para los parámetros de intensidad y tiempo de duración de las sensaciones percibidas en ambas soluciones; y estos valores se usaron como estándares para reducir las diferencias entre los evaluadores. El panel también se entrenó en el manejo del *mouse* y la coordinación del proceso de "sorber la muestra-*clikear el mouse*-escupir la muestra-continuando con la medición".

Procedimiento. Las muestras (10 ml) se presentaron al azar -3 para astringencia y 4 para acidez- en vasos plásticos con un código de tres dígitos. Primero, se les indicó que las ordenen en escala ascendente, y luego de corroborar que lo hayan hecho bien, se les indicó los valores de intensidad y tiempo de la solución estándar nº 5 (**Tabla 1**) y luego realizar las curvas. Las soluciones se sirvieron a temperatura ambiente, se utilizó el método de sorber y escupir y, nuevamente, se les proveyó de CMC 0,55% y agua mineral para el enjuague. Las pruebas (3 sesiones, 1,5 hs. cada una) se realizaron por triplicado y entre cada muestra tuvieron dos minutos de pausa.

Se utilizó un programa de tiempo-intensidad especialmente diseñado para este estudio donde la intensidad se registra sobre una escala no estructurada con un rango de 0 (ausencia de sensación) a 100 (máxima intensidad). Luego de sorber la muestra, el evaluador debía apretar el botón izquierdo del *mouse* para empezar la medición e ir desplazándolo sobre la escala según el progreso de la sensación. Luego de 10 segundos, un sonido le indicaba que escupa la muestra sin dejar de medir sobre la pantalla hasta que la sensación termine. El programa registraba los datos de intensidad cada 0,25 segundos.

Análisis de datos

Para calcular el nivel de significancia estadística del método de comparación por pares se utilizó la distribución Binomial basada en el número de respuestas correctas. La normalidad de los datos IT originales se estudió con la prueba de Shapiro-Wilks y la variabilidad entre evaluadores con diagramas de caja, y de tallo y hoja. Luego estos datos se transformaron por medio de un análisis de componentes

principales no centrado (Unscrambler, versión Demo) y se calcularon estimadores de los parámetros IT. Se realizó un ANAVA de las variables IT utilizando como único factor las soluciones (Infostat v. profesional; Córdoba, Argentina). La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey y se calculó el error estándar de la medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparación por pares

El número de respuestas totales de cada par fue 20 que corresponde a 10 evaluadores por duplicado, necesitándose 15 respuestas correctas para obtener significancia estadística ($p<0,05$). En vino, las diferencias en la percepción de la astringencia y la acidez fueron percibidas cuando el nivel de ácido gálico aumentó de 1,40 a 4,30 g EAG/l y las concentraciones de azúcares reductores y acidez titulable no fueron modificadas respecto del vino base (**Tabla 1**). En agua con 0,5 g EAG/l, sólo se observó diferencia en la acidez entre las soluciones con y sin etanol, y los niveles de azúcares reductores y acidez titulable del vino base.

A partir de estos resultados, se seleccionaron las siguientes muestras a ser evaluadas por el método IT: para astringencia, las soluciones 1 y 5 (ambas en vino); para acidez, la nº 1 y la nº 5 (ambas en vino) y la nº 13 en agua y agua 13,5% alcohol. Como en astringencia la diferencia del par 13 (agua-agua 13,5% etanol) no fue significativa, solo se incorporó la solución en alcohol por ser similar al vino.

Curvas de tiempo-intensidad

Se registraron 90 curvas (10 evaluadores x 3 soluciones x 3 repeticiones) para astringencia y 120 curvas (10 evaluadores x 4 soluciones x 3 repeticiones) de acidez, de las cuales se extrajeron medidas de Imax, Timax, T50max, Tdur, Tpla y ABC. Del análisis de los datos con pruebas *"a priori"*, surgió que los valores de las variables temporales tenían comportamiento Normal, pero en las medidas del Tpla de las mediciones de acidez, y el Tmax y el Tpla de las de astringencia se observó mayor dispersión en los datos indicando que estos parámetros no fueron similares en todos los evaluadores.

Para reducir estas diferencias, el análisis de las curvas se realizó siguiendo los lineamientos de Piggott *et al.* (2000) donde los datos de cada repetición se analizaron separadamente a través de un análisis de componentes principales no centrado. Se tomaron los valores del primer componente principal para cada instante como valores de intensidad del estímulo. El cálculo de los parámetros IT se realizó promediando las tres replicaciones de los valores obtenidos del ACP.

Astringencia. El ANAVA de las variables temporales de las curvas promedio de astringencia mostró diferencias ($p<0,05$) en la intensidad máxima (Imax) y el área bajo la curva (ABC).

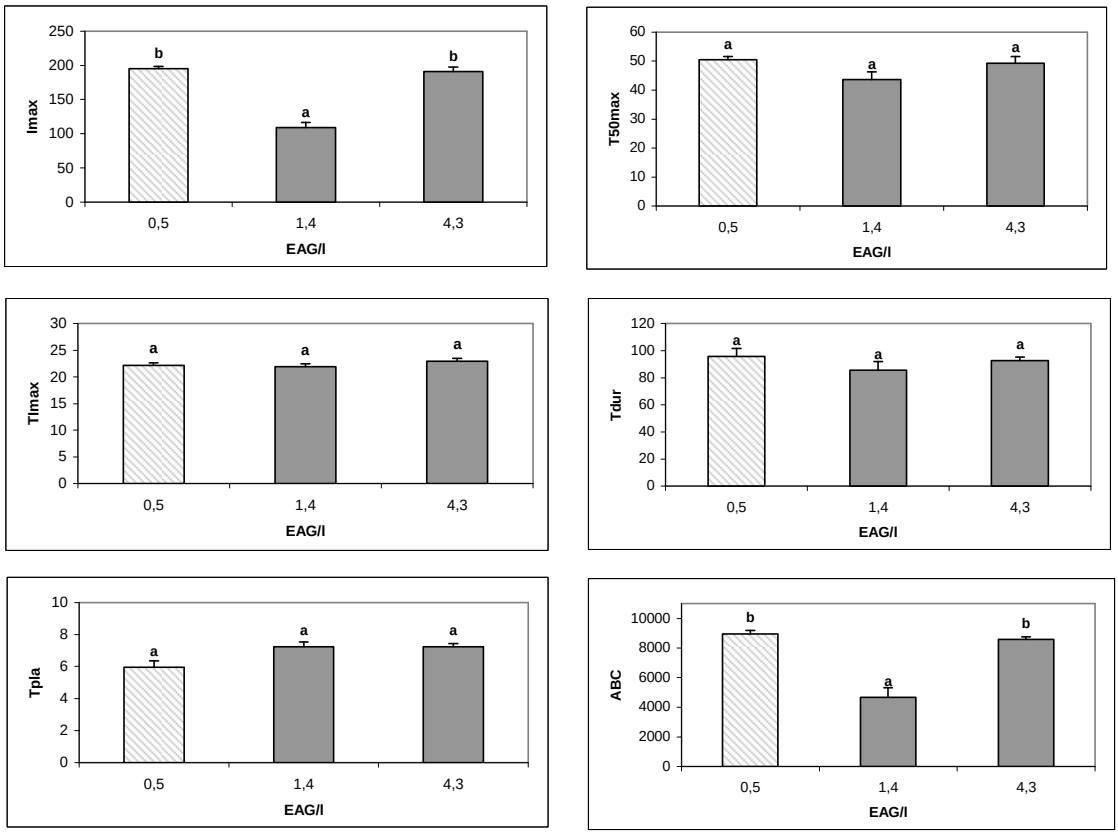
En la **Figura 1** se grafican los valores promedio de las variables medidas para el contexto agua y vino. Como puede observarse, la Imax de astringencia en vino aumenta ($p<0,05$) con el aumento de la concentración de ácido gálico. En este caso, el incremento de 1,4 a 4,3 g EAG/l de ácido gálico eleva la Imax a aproximadamente el doble. Este resultado confirma las conclusiones de Landon *et al.* (2008) quienes afirmaron que la concentración de compuestos fenólicos está relacionada positivamente con la percepción de la astringencia.

Cabe destacar, que las mezclas 0,5 EAG/l en agua y 4,3 EAG/l en vino resultaron isointensas dado que la Imax de astringencia percibida no difirió entre ellas a un nivel de alcohol del 13,5%. Comparando las mezclas de 0,5 EAG/l en agua y 1,4 EAG/l en vino puede observase que en vino la Imax disminuye con el aumento del nivel de ácido gálico.

Sin embargo, el tiempo en alcanzar esta intensidad (Tmax), el tiempo de duración de la intensidad máxima (Tpla) y el tiempo en alcanzar la mitad de la misma (T50max) fueron similares para las tres mezclas.

Por lo tanto, se puede decir que la intensidad máxima de astringencia -en el rango de ácido gálico evaluado- es afectada por los componentes del vino que modulan su percepción; en este estudio se necesitó casi nueve veces más concentración de ácido gálico en vino para igualar la intensidad astringente en agua (**Figura 1**). Sin embargo este efecto no se vio reflejado en los parámetros de tiempo (TImax, Tpla, T50max y Tdur) donde ni el aumento de la concentración de ácido gálico ni el cambio de contexto los modificó.

Con respecto a la sensación global en el tiempo que representa el área bajo la curva (ABC), se puede ver que sigue el mismo comportamiento descripto con la Imax.



Fi

g. 1. Imax, Timax, Tpla, T50max, Tdur y ABC de las curvas promedio de astringencia para un 13,5% de etanol en agua y vino (+1 E.E.M.; prueba de Tukey, letras diferentes corresponden a diferencias significativas p<0,05).

En la **Figura 2**, se grafican las curvas promedio luego del ACP donde puede observarse la diferencia de intensidad en la percepción de la astringencia de las soluciones. Cabe destacar la inflexión de las tres curvas a los 10 segundos, momento en que sonaba el aviso de escupir la muestra; previo a ese instante, la velocidad de aumento de la intensidad –pendiente de la curva- se hizo más lenta, y posteriormente aumentó. Esto concuerda con Guinard *et al.* (1986a) quienes afirmaron que la astringencia no se percibe inmediatamente, sino que evoluciona continuamente en la boca luego de escupir.

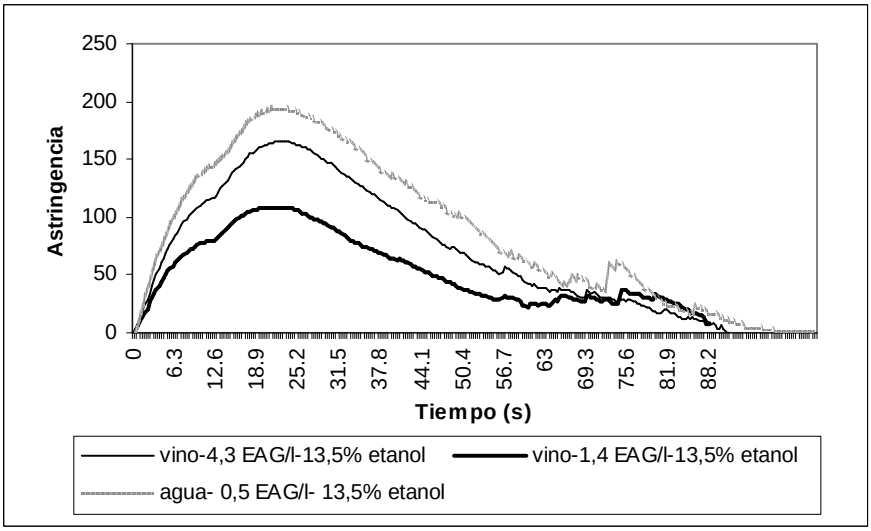


Figura 2. Curvas IT promedio de astringencia de las mezclas estudiadas por 10 evaluadores entrenados.

Se puede observar (**Figura 2**) que en las soluciones que se percibieron más astringentes el desvanecimiento de la sensación fue más rápido (pendientes más pronunciadas). Esto fue así porque la cinética de las curvas fue diferente: a igual Tdur, la curva que alcanza mayor altura, cae más rápido.
Acidez. El ANAVA de las variables temporales de las curvas promedio de acidez mostró diferencias ($p<0,05$) en la intensidad máxima (Imáx), el tiempo en alcanzar la mitad de la intensidad máxima (T50max), el tiempo de duración o persistencia (Tdur) y el área bajo la curva (ABC).
En la **Figura 3** se muestran los valores promedio de las variables para las muestras evaluadas. Se observa que con el aumento de la concentración de ácido gálico aumenta la Imax de acidez percibida en vino ($p<0,05$). En este caso, el aumento de 1,4 a 4,3 EAG/l elevó la acidez 1,6 veces más.

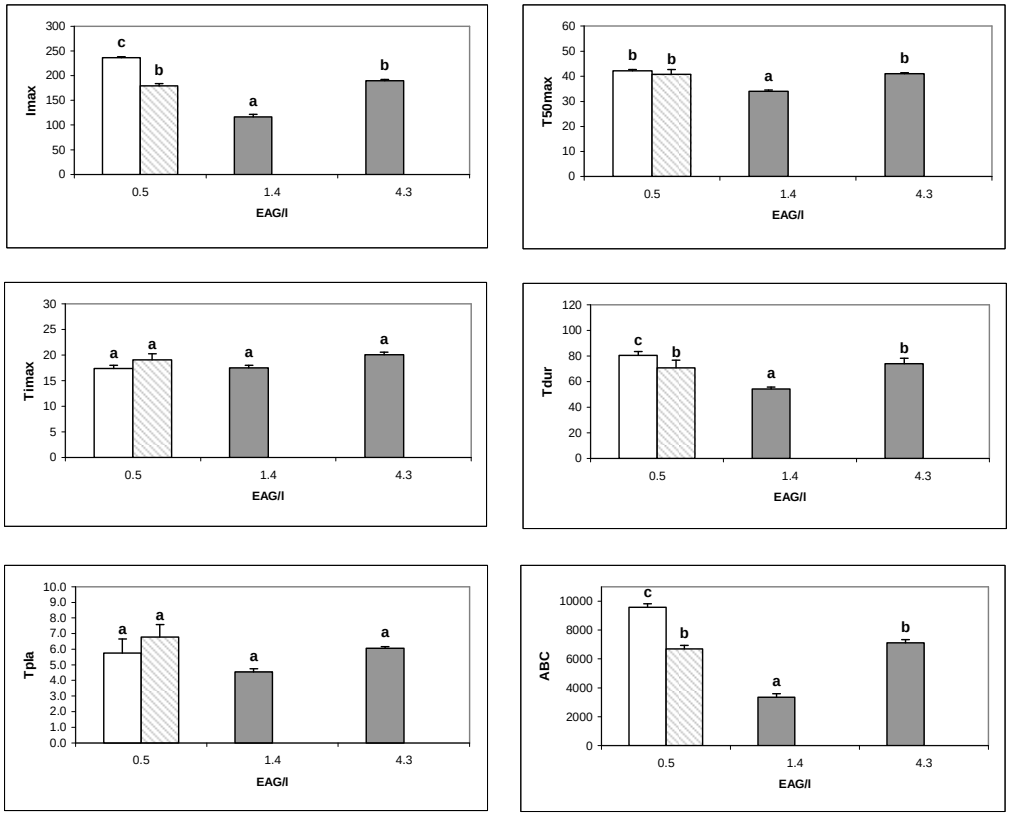


Fig. 3. Imax, Timax, Tpla, T50max, Tdur y ABC de las curvas promedio de acidez en ☐ agua, ▨ agua con 13,5% de etanol y ■ vino. (+1 E.E.M.; prueba de Tukey, letras diferentes corresponden a diferencias significativas $p<0,05$).

Por otra parte, las soluciones de 0,5 EAG/l en agua y 1,4 EAG/l en vino resultaron isointensas; por lo tanto el aumento de esta concentración, a un 13,5% etanol, no produce cambios en la intensidad de la acidez percibida en vino respecto de agua. Se destaca la menor ($p<0,05$) Imax en mezclas de vino respecto del agua -13,5% etanol- con del aumento de la concentración de ácido gálico de 0,5 a 1,4 EAG/l.
La ausencia de etanol con 0,5 EAG/l en agua aumentó la Imax respecto de las soluciones del resto de las soluciones estudiadas. Sin embargo, el tiempo en alcanzar esta intensidad (Timax) y el tiempo de duración de dicha intensidad (Tpla) fueron similares en los cuatro sistemas estudiados.
Respecto del tiempo en alcanzar la mitad de la intensidad máxima; solo fue menor en soluciones con 1,4 EAG/l y 13,5% de etanol en vino. No se observó efecto del contexto cuando se incrementó la concentración de ácido gálico (0,5 a 4,3 EAG/L, 13,5% etanol), ni efecto de la presencia de 13,5% de etanol con 0,5 EAG/l en agua.
El tiempo de duración de la sensación (**Figura 3**) tiene un comportamiento similar a la Imax, siendo más largo, y por lo tanto más persistente, en soluciones con 0,5 EAG/l en agua sin alcohol respecto de

soluciones 0,5 EAG/l y 13,5% etanol en el mismo solvente, y respecto de soluciones 1,4 y 4,3 EAG/l y 13,5% etanol en vino.
Tanto a una concentración de 0,5 EAG/l en agua como a 4,3 EAG/l en vino, al mismo nivel de etanol, la duración de la sensación es similar y con tiempos intermedios entre las soluciones de 0,5 EAG/l en agua y 1,4 EAG/l en vino.
Con respecto al área bajo la curva medio (ABC) puede observarse que este parámetro acompaña el comportamiento descrito anteriormente para la Imax, y el Tdur poniendo de manifiesto el efecto de las interacciones de los componentes del vino.
La Imax de acidez percibida y el Tdur fueron afectados por el resto de los componentes del vino que actúan como moduladores; esto no se observó con el tiempo en que se tarda en alcanzar esta intensidad y su duración. El T50max sólo fue menor ($p<0,05$) cuando el vino base no fue modificado.
El efecto moderador del alcohol se puso de manifiesto tanto en agua como en vino, siendo la Imax siempre mayor en ausencia del mismo independientemente de la concentración de ácido gálico.
La **Figura 4** muestra las curvas promedio de acidez luego del ACP. Se puede observar la diferencia en la pendiente de subida, las intensidades máximas alcanzadas, como así también el menor tiempo de duración de la sensación en el vino base estudiado. De manera parecida que en la astringencia, la cinética de las curvas fue diferente.

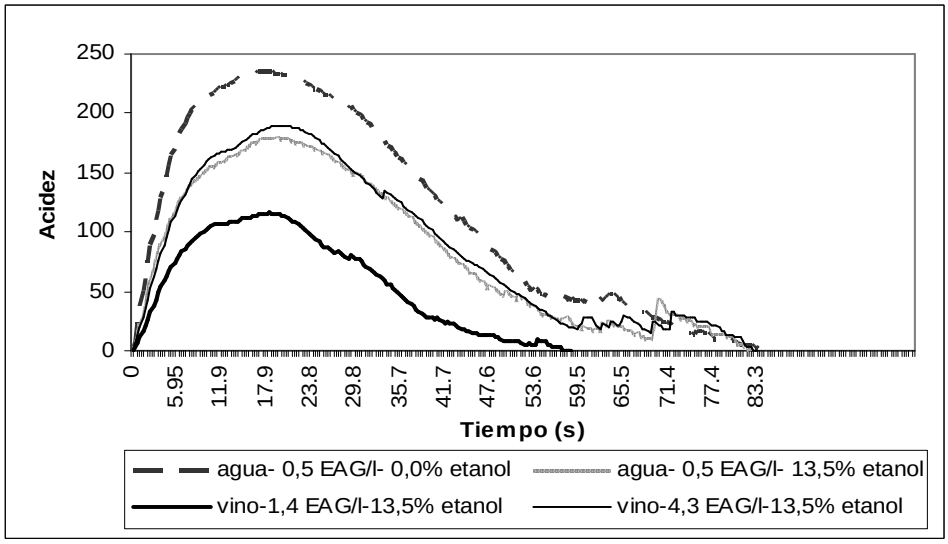


Fig. 4. Curvas IT promedio de acidez de las mezclas estudiadas por 10 evaluadores entrenados.

Relación acidez/astringencia. La relación entre la acidez y la astringencia permite estudiar la acción de los componentes ácidos y fenólicos en el llamado balance acidez/astringencia. En este trabajo, las soluciones más ácidas también resultadon más astringentes, indicando un efecto potenciador de ambas sensaciones (**Figuras 1** y **3**). Esto puede explicarse por lo estudiado por Guinard *et al.* (1986b) quienes sugirieron que los ácidos contribuyen a la formación del complejo proteína-taninos, y por lo expresado por Landon *et al.* (2008) quienes afirmaron que la concentración de taninos no es un factor independiente en la influencia de la percepción de la astringencia.
En forma indirecta, el resto de los compuestos también actúan moderando las sensaciones percibidas. En este estudio, la acidez y la astringencia fueron menos intensos en vino que en agua (**Figuras 2** y **4**) o a lo sumo resultaron isointensas. Valentová *et al.* (2001) afirmaron que el incremento de la concentración de una sustancia astringente aumenta la percepción de la astringencia pero este efecto es mayor en soluciones modelo.
La forma en que interactúan los componentes del vino al momento de beberlo es distinto en cada intervalo de tiempo. Los perfiles de las curvas promedio (**Figuras 2** y **4**) muestran el comportamiento diferente de ambas sensaciones a lo largo de la variable temporal. En las curvas de astringencia se puede observar una inflexión característica al momento de escupir la muestra, el Tdur no se pudo diferenciar entre las soluciones poniendo de manifiesto la característica de permanencia de esta sensación, de acuerdo con la expresado por Noble (1995). Por otro lado, Naish *et al.* (1998) afirmaron

que una de las principales contribuciones a la diferenciación de la astringencia está en la forma en que la respuesta desaparece. Esto último también se puede observar en las menores pendientes de las curvas de astringencia respecto de las de acidez, más pronunciadas.

CONCLUSIONES

En el balance astringencia/acidez, los componentes minoritarios del vino cumplen un rol importantísimo. Estos componentes ejercen un efecto moderador de la intensidad máxima en la percepción de la astringencia y de la intensidad máxima y del tiempo de duración en la percepción de la acidez, dentro del rango de 1,4 a 4,3 EAG/l estudiado y un nivel de alcohol del 13,5%.

Dentro de la máxima concentración de polifenoles del vino comercial (5,0 g EAG/l), las intensidades máximas de acidez y astringencia fueron similares y se duplicaron al aumentar de 1,4 a 4,3 EAG/l. Este incremento también aumentó la duración de la sensación de acidez, pero no tuvo efecto en la duración de la sensación astringente siendo más importante la forma en que se desvanece dicha sensación.

El efecto moderador del alcohol en la percepción de la acidez, se observó tanto en agua como en vino, siendo la intensidad máxima siempre mayor en ausencia del mismo independientemente de la concentración de ácido gálico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de un Proyecto de Investigación Plurianual (PIP nº6539) – CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD RA, NOBLE AC. 1978. Astringency of grape seed phenolics in a model wine solution. Am. J. Enol. Vitic. 29, 150-152.

American Society for Testing and Materials. 1977. Manual on Sensory Testing and Methods, STP 434. 6º ed. Philadelphia, PA. ASTM publications. pag 77.

BRANNAN GD, SETSER CS, KEMP KE. 2001. Effectiveness of rinses in altering bitterness and astringency residuals in model solutions. J. Sens. Studies, 16, 261-275.

FRANCOIS N, GUYOT-DECLERCK C, HUG B, CALLEMIEN D, GOVAERTS B, COLLIN S. 2006. Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: influence of pH and accelerated aging. Food Qual. and Pref. 17, 445-452.

GAWEL R. 1998. Red wine astringency: a review. Austr. J. Grape and Wine Res. 4, 74-95.

GUINARD JX,PANGBORN R M, LEWIS MJ. 1986a. The time couse of astringency in wine upon repeated ingestion. Am. J. Enol. Vitic. 37, 184-189.

GUINARD JX, PANGBORN RM, LEWIS MJ. 1986b. Preliminay studies on acidity-astringency interactions in model solutions and solutions. J. Sci. Food and Agric. 37, 811-817.

IRAM.1995. Análisis sensorial. Guía para la instalación de locales de ensayo. Norma 20003, Instituto Argentino de Normalización, Buenos Aires, Argentina.

KALLITHRAKA S, BAKKER, J, CLIFFORD MN. 1997. Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. J. Food Sci. 62, 416-420.

LANDON JL, WELLER K, HARBERTSON JF, ROSS CF. 2008. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. Am. J. Enol. Vitic. 59, 153-158.

MEILGAARD M, CIVILLE GV, CARR BT.1999. Sensory evaluation techniques. 3rd Ed. CRC Press LLC. p 61.

NAISH M, CLIFFORD, MN, BIRCH GG. 1998. Effect of gelatin (a model for salivary PRP) on the sensory astringnecy of 5-O-caffeoylquinic acid and tannic acid. Annals of the New York Academy of Sciences 855, 823-827.

NOBLE AC. 1995. Application of time-intensity procedures for the evaluation of taste and mouthfeel. Am. J. Enol. Vitic. 46, 128-133.

PEYNAUD E.1996. The taste of wine. 2º Ed. New York, USA. John Wiley & Sons, Inc. pag 346.

PIGGOTT JR, HUNTER EA, MARGOMENOU L. 2000. Comparison of methods of analysis of time-intensity data: application to Scoth malt whisky. *Food Chem. 71, 319-326.*

SINGLETON VL, ORTHOFER R, LAMUELA-RAVENTÓS RM. 1999. Análisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by jeans of Foli-Ciocalteu reagent. En Methods in enzymology, vol. 299, 152-178.

VALENTOVÁ H, SKROVÁNKOVÁ S, PANOVSKÁ Z, POKORNÝ J. 2001. Determination of astringent taste in model solutions and beverages. Czech. J. Food Sci. 19, 196-200.

VALENTOVÁ H, SKROVÁNKOVÁ S, PANOVSKÁ Z, POKORNÝ J. 2002. Time-intensity studies of astringent taste. Food Chem. 78, 29-37.

Efecto de diferentes procesamientos de la semilla de chía sobre los parámetros sensoriales de la carne de pollo

Effect of chia seeds with different processes on sensory parameters of broiler meat

Iglesias BF (1), Picallo AB (3) Azcona JO (1), Gallinger CI (2), Cossu ME (3), Coste EB (3)

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)
(1) EEA Pergamino, CC31 (B2700WAA) Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
(2) EEA Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina
(3) Área Calidad de Productos Pecuarios y Estudios del Consumidor, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos aires, Argentina. biglesias@pergamino.inta.gov.

RESUMEN

La semilla de chía (Salvia hispánica) es una fuente de origen vegetal rica en ácido linolénico (Omega-3) utilizada en la alimentación de aves para incrementar el contenido de este ácido graso tanto en carne como en huevos. No es recomendable incluirla entera en el alimento si se desea un mejor aprovechamiento de sus nutrientes. Por este motivo se realizó un ensayo con el objetivo de evaluar el efecto de distintos procesos tendientes a mejorar el valor nutricional de la chía sobre la calidad sensorial de la carne de pollo. Se compararon 4 tratamientos con 6 réplicas de 18 pollos cada una. T1, Control Maíz-Soja; T2, Semilla de Chía molida (5,8%); T3, Semilla de Chía extrusada (8,3%) y T4, Expeller de Chía (12,3%). Las dietas fueron suministradas desde los 21 días de vida hasta los 49 días, se formularon isonutritivas y los tratamientos con chía aportaron 1,5% de ácido linolénico. Todos los tratamientos alcanzaron un peso semejante. Se faenaron 6 aves por tratamiento para realizar el análisis sensorial sobre muestras frescas de los cortes pechuga, muslo y pata. Dicha evaluación se reiteró en pechuga luego de mantener las muestras congeladas (-18ºC) durante 6 meses. Las distintas muestras fueron cocinadas en horno hasta lograr 73°C en el centro geométrico de la muestra, monitoreado por medio de una termocupla. Un panel analítico de ocho evaluadores, seleccionados y entrenados de acuerdo a las normas internacionales (ISO 8586-1:1993 – IRAM 20005-1:1996) ubicados en cabinas individuales realizaron un análisis descriptivo cuantitativo utilizando una escala lineal no estructurada de 10cm. En la evaluación sensorial sobre muestras frescas, sólo las pechugas de T4 presentaron diferencias significativas respecto de T1 con un marcado olor y flavor a chía (5,1 vs. 2,3 y 5,5 vs. 2,7, respectivamente). T4 se diferenció de T2 en el parámetro retrogusto (5,3 vs. 2,3) sin ser diferente de T1. En todos los casos, las diferencias se podrían explicar por el mayor porcentaje de inclusión en la dieta del Expeller de Chía necesario para alcanzar 1,5% de ácido linolénico. Cuando se analizaron las pechugas luego de 6 meses de congelado, bajaron los valores de olor y flavor a chía en T4, por lo que las diferencias no fueron significativas respecto de T1. Las pechugas de T4 presentaron un color global más claro que las de los demás tratamientos (2,8 vs. 7,7 promedio de los tres tratamientos restantes). A su vez, las pechugas conservadas, independientemente del tratamiento, comparado con las frescas resultaron ser más brillosas, de mayor homogeneidad de color, mayor intensidad de olor, más olor a rancio, mayor flavor hígado-sangre-metálico y menor número de masticaciones. En función de los resultados obtenidos se puede concluir que el uso de chía en cantidades necesarias para alcanzar 1,5% de ácido linolénico en la dieta de pollos bajo las formas de semilla molida o semilla extrusada no produjo diferencias perceptibles en la evaluación sensorial de la carne de pollo. El tiempo de conservación determinó la presencia de off olores y off flavores sin distinción del tratamiento aplicado.

ABSTRACT

Although chia seed (Salvia hispanica) is a vegetal source of linolenic acid (Omega-3) used in poultry feeding to increase the linolenic acid content in both meat and eggs. The use of whole chia seeds is not recommended if optimum nutrient utilization is desired. A trial was performed to evaluate the effect of different processes utilized to improve the nutritional value of these seeds on sensorial properties of broiler meat. Four treatments with 6 replicates of 18 birds each where compared. T1, Control Corn-

Soybean; T2, Ground Chia Seeds (5.8%); T3, Extruded Chia Seeds (8.3%) and T4, Chia Meal (12.3%). Diets were offered from 21 to 49 days. All experimental diets were isonutritives and chia treatments provided 1.5% of linolenic acid. All treatments reached similar weights at the end of the trial. Six birds per treatment were slaughtered to perform sensory analysis of fresh samples of breast, leg and thigh. This evaluation was repeated on breasts conserved during 6 months at -18°C. Samples were cooked in an oven up to 73°C in the geometric center of the sample. Eight assessors selected and trained according to international sensory standards (ISO 8586-1:1993 – IRAM 20005-1:1996), placed in individual boxes performed a quantitative descriptive analysis (QDA) using a 10cm non structured lineal scale. In fresh samples, only T4 breasts showed significant differences, compared to T1, in chia odor and flavor (5.1 vs. 2.3 y 5.5 vs. 2.7, respectively). T4 was different from T2 in aftertaste (5.3 vs. 2.3) but did not differ from T1. In all cases the differences could be explained by the higher percentage of dietary chia expeller inclusion necessary to reach 1.5% of linolenic acid. When breasts were analyzed after 6 months of freezer conservation, chia odor and flavor scores in T4 were lower and did not differ from T1. Breasts from T4 showed lighter color compared with the others treatments (2.8 vs. 7.7 average for the remaining treatments). Conserved breasts compared to the fresh ones were more shining, had higher color homogeneity, higher odor intensity, higher rancid odor, higher metallic flavor and lower mastication number. According to these results we conclude that no differences in sensory evaluation were detected with the use of ground chia seeds or extruded chia seeds. Independently of the treatment considered, conservation at -18°C during 6 month originated the presence of off odors and off flavors in breast.

PALABRAS CLAVE: *carne de pollo, omega-3, chía, análisis sensorial.*

KEYWORDS: *Chicken meat, omega-3. chia, sensorial analysis.*

INTRODUCCIÓN

La calidad es una propiedad relativa al grado de satisfacción del consumidor, quien busca estar más informado sobre los alimentos que adquiere, siendo relevante su naturaleza, origen, sistemas y procesos de producción, método de preservación y aseguramiento de sus características específicas. El consumidor actual muestra interés por la calidad y el valor dietético de los alimentos, originando una demanda selectiva y una necesidad creciente de diferenciación. La dieta urbana actual es pobre en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y de baja relación omega-6/omega-3 (n-6/n-3) en contraposición con la dieta tradicional de la población rural (Simopoulos 2002). El consumo de AGPI Omega-3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, inhibe el crecimiento de tumores y es necesario para el mantenimiento de las funciones inmunológicas y el normal desarrollo del cerebro del feto (Simopoulos 2006).

La semilla de chía (Salvia hispánica) es una fuente de origen vegetal rica en ácido linolénico (Omega-3) utilizada en épocas precolombinas por los aztecas. Actualmente se está revalorizando este cultivo y se la ha comenzado a utilizar en la alimentación de aves para incrementar el contenido de ácido linolénico en carne (Ayerza *et al.* 2002) o huevos.

Estudios de digestibilidad realizados en INTA mostraron que al suministrar semilla de chía entera a gallos se perdía gran parte del aprovechamiento de la energía bruta (11,3% en semilla entera vs 66,4% en semilla molida). Por este motivo es necesario suministrar estas semillas molidas o sometidas a procesos que permitan mejorar su utilización por parte de las aves como sería la extrusión (conserva el aceite) o la extracción parcial del aceite por prensa.

Los factores de producción como el sistema de crianza y las dietas tienen influencia directa sobre los atributos sensoriales (Sauver 1997), y por lo tanto, un aspecto a considerar es la calidad sensorial de la carne (Hernández 2005). El análisis sensorial es una herramienta aplicada en el control de calidad, ya que permite estimar el grado de aceptación o rechazo por parte del consumidor. La necesidad de estudiar los hábitos alimenticios se ha acentuado a partir de la evolución de los mercados. El correcto conocimiento de las prácticas de consumo y la valoración alimentaria (salud y nutrición), resulta crucial en un país como la Argentina, donde la producción agroalimentaria constituye la base de su economía (Ábalo 1998).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes procesamientos de la semilla de chía sobre los parámetros sensoriales de la carne de pollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aves y dietas

Se utilizaron 432 pollos de la línea Cobb's de un día de edad, criados a piso sobre viruta de madera con alimentación y agua "ad libitum" y una densidad de 10 aves/m^2.

Los pollos fueron alimentados con una misma dieta hasta los 21 días, momento en el que se suministraron las dietas experimentales hasta los 49 días de vida.

Los tratamientos evaluados fueron T1: Control Maíz-Soja, T2: Semilla de Chía molida, T3: Semilla de Chía extrusada y T4: Expeller de Chía. Cada tratamiento contó con 6 réplicas de 18 aves cada una. Las dietas utilizadas fueron formuladas isonutritivas. Las dietas correspondientes a los tratamientos 2, 3 y 4 se formularon de forma tal que el contenido de AGPI Omega-3 (por la inclusión de chía tratada con diferentes procesamientos) sea de 1,5% en base tal cual de la dieta (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición de las dietas suministradas.

Materias Primas (%)	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
Maíz semidentado	53,53	51,05	48,89	47,29
Soja Poroto Vapor	20,00	10,75	11,48	11,95
Soja Harina (40)	18,52	23,82	22,90	19,79
Carne Harina <50 Gr '07	4,66	4,58	4,55	4,54
Girasol Aceite	1,88	2,61	2,46	2,80
Chía Semilla		5,78		
Chía Semilla Extrusada			8,34	
Chía Expeller				12,26
Conchilla	0,46	0,42	0,39	0,33
Sal	0,32	0,32	0,32	0,32
DL-Metionina	0,22	0,22	0,22	0,21
Premix	0,20	0,20	0,20	0,20
Lisina	0,10	0,13	0,13	0,17
Coccidiostato	0,05	0,05	0,05	0,05
Colina	0,05	0,05	0,05	0,05
Treonina	0,01	0,02	0,02	0,04
Nutrientes (%)				
Proteína	21,00	21,00	21,00	21,50
Lípidos	8,45	9,55	9,47	9,77
Ca	0,90	0,90	0,90	0,90
P Total	0,65	0,67	0,69	0,71
P Disponible	0,40	0,40	0,40	0,40
Na	0,18	0,18	0,18	0,18
EMV (Mcal/kg)	3,450	3,450	3,450	3,450
Lisina	1,22	1,23	1,24	1,27
Metionina	0,56	0,57	0,58	0,60
Met+Cis	0,88	0,90	0,91	0,95
Triptofano	0,24	0,24	0,25	0,25
Treonina	0,81	0,82	0,83	0,84
Lisina Dig.	1,10	1,10	1,10	1,10
Metionina Dig.	0,52	0,52	0,52	0,52
Met+Cis Dig.	0,80	0,80	0,80	0,80
Triptofano Dig.	0,22	0,21	0,21	0,21
Treonina Dig.	0,70	0,70	0,70	0,70
16:0 Ac. Palmítico	0,93	0,88	0,89	0,90
18:0 Ac. Esteárico	0,38	0,39	0,41	0,42
18:1 Ac. Oleico	2,49	3,74	3,64	3,91
18:2 Ac. Linoleico	4,27	4,18	4,11	4,27
18:3 Ac. Linolénico	0,34	1,50	1,50	1,50
18:2/18:3	12,52	2,79	2,74	2,84

Acondicionamiento de las muestras

Al finalizar el ciclo los pollos fueron faenados por procedimientos convencionales y las muestras correspondientes a los cortes pechuga, muslo y pata fueron remitidas al laboratorio de carnes de la Facultad de Agronomía (UBA) envasadas y congeladas (-18°C) hasta su análisis. Para la evaluación sensorial, las muestras fueron descongeladas (24hs en heladera 5ºC ± 1) y cocidas en horno hasta una temperatura interna de 73ºC (centro frío de la muestra), monitoreada con termocupla. El análisis sensorial se reiteró en el corte pechuga luego de mantener las muestras congeladas durante 6 meses. Todos los músculos más representativos de las media pechuga, del muslo y la pata fueron extraídos y cortados en cubos de aproximadamente $1cm^3$.

Análisis sensorial

El análisis sensorial se llevó a cabo en cabinas individuales estandarizadas (IRAM 20003:1995 (ISO 8589:2006)), de forma aislada, sin interferencias, en sesiones de una hora y media.

Un panel analítico de ocho evaluadores, seleccionados y entrenados de acuerdo a las normas internacionales (IRAM 20001:1995 (ISO 5492:1992); IRAM 20002:1995 (ISO 6658:1985); IRAM 20004:1996 (ISO 3972:1991); IRAM 20005-1:1996 (ISO 8586-1:1993); IRAM 20014:1998 (ISO 4121:1987); IRAM 20022:2004 (ISO 11037:1999)) y con experiencia en análisis sensorial de carne, realizaron un análisis descriptivo cuantitativo utilizando una escala lineal no estructurada de 10cm con extremos correspondientes al máximo y mínimo de percepción de la intensidad y con referencias específicas para cada descriptor. Las muestras fueron presentadas al panel en recipientes cerrados codificados con números aleatorios de tres dígitos. Se analizaron atributos de apariencia (Color Global, Brillo Superficial, Uniformidad del Color), olfato-gustativos (olor y flavor: Intensidad de Olor a Pollo, Intensidad de Flavor (característico) a Pollo, Rancio, Aceite, Maní, Chía, Grasa, Hígado/Sangre/Metálico, Dulce, Amargo, Salado) y textura (Jugosidad Inicial, Terneza, Fibrosidad, Untuosidad, Cantidad de Masticaciones, Jugosidad Final, Persistencia, Retrogusto). Los extremos de las escalas correspondieron a la intensidad del atributo: extremadamente suave, duro, seco, heterogéneo, baja persistencia, nada dulce, amargo o salado, no untuoso, pocas masticaciones (tierno) (límite inferior: 0) y extremadamente fuerte (intenso), tierno, jugoso, homogéneo, muy dulce, amargo o salado, untuoso, muchas masticaciones (correoso) (límite superior: 10).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por procedimiento GLM (SAS) y las medias fueron comparadas por el test de Tukey ($\alpha = 0.05$)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los 49 días todos los tratamientos alcanzaron un peso semejante, siendo estos de T1: 3,549kg; T2: 3,534kg; T3: 3,552kg y T4: 3,479kg. En la evaluación sensorial sobre muestras frescas (**Tabla 2**), sólo las pechugas de T4 presentaron diferencias significativas respecto de T1 con un marcado olor y flavor a chía (5,1 vs. 2,3 y 5,5 vs. 2,7, respectivamente) (**Figura 1**). T4 se diferenció de T2 en el parámetro retrogusto (5,3 vs. 2,3) sin ser diferente de T1. En todos los casos, las diferencias se podrían explicar por el mayor porcentaje de inclusión en la dieta del expeller de Chía necesario para alcanzar 1,5% de ácido linolénico. Sin embargo, ni en muslo, ni en pata se observaron diferencias significativas en los parámetros sensoriales entre tratamientos, debido probablemente, a la mayor heterogeneidad de los músculos involucrados en cada porción. La porción pata, de mayor heterogeneidad, presentó menor olor y flavor a chía respecto de la pechuga y el muslo.

Cuando se analizaron las pechugas luego de 6 meses de congelado (**Tabla 3**) se evidenció olor y flavor a chía y retrogusto más marcados en T3 y T4 sin llegar a ser estadísticamente diferentes, tal como ocurría con las muestras frescas. Las pechugas de T4 presentaron un color global más claro que las de los demás tratamientos.

El tiempo de conservación influyó significativamente sobre el aspecto, la aparición de off olores y off flavores y la terneza. Las pechugas conservadas, independientemente del tratamiento resultaron, más brillosas presentando un color mas uniforme, mayor intensidad de olor, olor a rancio más acentuado, mayor flavor hígado-sangre-metálico y a pesar de que la terneza fue similar, se necesitó menor número de masticaciones para lograr deglutir el bocado (**Figura 2**).

Tabla 2. Efecto de la inclusión de chía en la alimentación de pollos sobre las características organolépticas de Pechuga (media pechuga), Muslo y Pata.

	PECHUGA				Prob.	MUSLO				Prob.	PATA				Prob.
	T1	T2	T3	T4	Pech.	T1	T2	T3	T4	Muslo	T1	T2	T3	T4	Pata
Color Global	7,46	7,18	6,18	5,40	0,28	6,06	7,24	6,91	6,97	0,77	6,00	6,51	5,68	6,05	0,92
Brillo superficial	2,75	2,07	2,61	2,33	0,74	5,19	5,26	6,77	6,56	0,55	4,58	4,38	6,98	4,53	0,22
Uniformidad Color	2,60	2,90	2,70	3,23	0,93	5,31	5,81	6,03	6,67	0,80	7,03	6,88	6,06	7,10	0,59
Intensidad del Olor	4,91	5,04	4,16	4,54	0,71	4,50	3,19	2,83	2,36	0,18	5,03	5,78	3,75	5,98	0,43
Olor Rancio	1,40	1,87	1,53	2,67	0,29	1,81	2,31	2,80	2,33	0,84	0,98	1,38	1,00	0,73	0,84
Olor Grasa	1,56	2,20	1,96	2,95	0,34	2,69	5,26	4,03	3,21	0,22	1,58	1,43	1,25	1,98	0,59
Olor Aceite	3,06	2,91	2,82	3,80	0,70	3,44	5,03	3,99	3,74	0,52	0,60	1,20	1,58	1,66	0,61
Olor Maní	2,51	1,97	2,31	2,30	0,93	1,49	2,20	2,29	1,44	0,53	0,63	0,79	1,15	0,50	0,70
Olor Chía	2,26a	3,34ab	2,93ab	5,14b	0.03	2,15	3,97	3,26	3,57	0,54	0,98	0,80	1,93	1,53	0,69
Int. Aroma Pollo	4,51	4,47	4,49	3,78	0,84	4,50	3,20	3,30	2,30	0,27	4,60	3,25	3,18	4,35	0,75
Flavor Rancio	1,61	1,72	0,99	1,69	0,66	1,29	1,60	2,13	1,14	0,57	0,83	3,28	2,78	2,86	0,21
Fl.hígado, sangre, met.	1,64	2,77	1,76	2,54	0,50	1,93	3,48	1,81	2,64	0,56	0,98	2,20	2,83	2,80	0,36
Flavor Grasa	2,21	2,08	2,68	2,88	0,86	3,56	5,55	4,38	5,11	0,56	4,40	3,08	2,80	2,72	0,64
Flavor Herbáceo	1,99	3,10	2,00	1,63	0,43	1,91	2,90	2,66	1,81	0,65	1,20	2,23	2,60	1,43	0,56
Flavor Chía	2,66a	3,05ab	3,16ab	5,50b	0,05	2,39	4,27	4,30	3,77	0,49	1,33	2,85	5,18	3,00	0,34
Gusto Dulce	1,41	1,65	2,71	2,53	0,37	3,17	3,90	3,53	3,37	0,85	2,56	2,08	2,73	2,83	0,95
Amargo	1,73	1,73	2,26	1,94	0,89	1,50	1,77	1,96	1,54	0,95	1,00	3,52	3,28	3,08	0,29
Salado	1,57	1,74	2,16	2,61	0,43	1,90	1,87	2,61	1,54	0,66	2,28	2,11	2,58	3,43	0,48
Jugosidad Inicial	4,84	4,39	4,85	5,26	0,89	5,21	5,41	6,03	5,60	0,92	5,16	4,50	3,10	5,53	0,49
Terneza	7,00	6,83	7,33	7,18	0,95	7,09	6,16	7,58	7,61	0,42	5,50	5,58	5,78	5,03	0,95
Fibrosidad	4,25	3,93	3,98	2,45	0,42	4,57	4,51	4,09	4,23	0,97	3,78	3,05	3,88	3,25	0,91
Untuosidad	2,59	2,61	2,60	3,78	0,49	3,36	3,50	4,81	4,51	0,43	5,53	5,61	4,95	3,90	0,58
Masticabilidad	4,74	4,78	4,26	4,09	0,79	4,72	5,04	4,60	3,97	0,84	4,30	4,28	5,24	3,68	0,72
Num.Masticaciones	14,3	14,3	12,9	11,4	0,67	14,3	15,1	13,7	12,1	0,86	13	13	15,8	11	0,71
Jugosidad Final	3,46	3,61	4,71	4,89	0,52	5,79	4,48	5,48	4,54	0,60	5,98	4,18	2,40	3,75	0,12
Persistencia	3,61	4,11	4,58	4,71	0,79	4,63	5,03	4,97	3,89	0,79	5,13	3,78	5,38	4,33	0,89
Retrogusto	3,10ab	2,30a	4,89ab	5,34b	0,04	1,89	2,46	2,66	2,33	0,92	3,78	3,88	4,10	4,08	0,99

Medias en una misma fila y grupo con diferente letra difieren significativamente ($p \leq 0,05$)

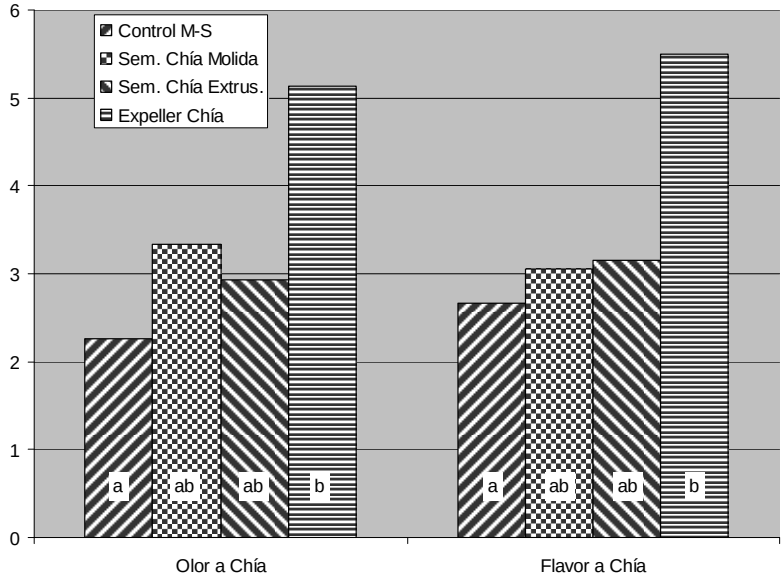


Figura 1. Diferencias entre tratamientos sobre olor y flavor a chía en carne fresca de pechuga.

Tabla 3. Efecto de la inclusión de chía en la alimentación de pollos sobre las características organolépticas de la Pechuga fresca o conservada por congelación durante 6 meses.

	PECHUGA fresca				Prob. Pech. Fresca	PECHUGA 6meses				Prob. Pech. 6 meses	Prob. Fresca vs 6 meses		Vcia. error
	T1	T2	T3	T4		T1	T2	T3	T4		Tratam.	Conserv.	
Color Global	7,46	7,18	6,18	5,40	0,28	8,38a	8,02a	6,68ab	2,78b	0,00	0,00	0,88	2.3
Brillo superficial	2,75	2,07	2,61	2,33	0,74	5,26	5,00	6,03	6,08	0,70	0,62	0,00	1.6
Uniformidad Color	2,60	2,90	2,70	3,23	0,93	4,28	5,28	4,72	4,25	0,79	0,88	0,00	2.0
Intensidad del Olor	4,91	5,04	4,16	4,54	0,71	5,62	5,22	4,75	6,63	0,35	0,42	0,05	1.7
Olor Rancio	1,40	1,87	1,53	2,67	0,29	2,15	3,18	3,48	2,67	0,72	0,53	0,04	1.7
Olor Grasa	1,56	2,20	1,96	2,95	0,34	1,33	3,13	2,89	2,48	0,58	0,29	0,59	1.9
Olor Aceite	3,06	2,91	2,82	3,80	0,70	2,33	2,40	3,27	2,45	0,89	0,90	0,33	2.0
Olor Maní	2,51	1,97	2,31	2,30	0,93	1,83	1,55	2,53	1,23	0,79	0,80	0,35	1.9
Olor Chía	2,26a	3,34ab	2,93ab	5,14b	0.03	2,17	2,58	4,93	4,73	0,11	0,01	0,73	2.1
Int.Aroma Pollo	4,51	4,47	4,49	3,78	0,84	3,78	4,32	3,28	4,48	0,68	0,94	0,50	1.9
Flavor Rancio	1,61	1,72	0,99	1,69	0,66	1,57	1,94	2,52	1,32	0,42	0,95	0,36	1.3
Fl.hígado, sangre, met.	1,64	2,77	1,76	2,54	0,50	3,67	3,85	5,90	3,50	0,15	0,53	0,00	1.9
Flavor Grasa	2,21	2,08	2,68	2,88	0,86	1,97	2,05	2,77	2,17	0,89	0,77	0,67	2.0
Flavor Herbáceo	1,99	3,10	2,00	1,63	0,43	1,55	1,75	2,25	2,12	0,92	0,76	0,63	1.9
Flavor Chía	2,66a	3,05ab	3,16ab	5,50b	0,05	1,95	2,83	4,20	3,60	0,14	0,02	0,44	2.0
Gusto Dulce	1,41	1,65	2,71	2,53	0,37	3,03	2,52	1,52	2,67	0,23	0,79	0,44	1.6
Amargo	1,73	1,73	2,26	1,94	0,89	1,12	1,02	2,42	1,70	0,08	0,27	0,35	1.3
Salado	1,57	1,74	2,16	2,61	0,43	1,92	0,82	1,83	1,38	0,30	0,42	0,13	1.2
Jugosidad Inicial	4,84	4,39	4,85	5,26	0,89	5,52	5,38	4,37	4,53	0,36	0,91	0,86	1.9
Terneza	7,00	6,83	7,33	7,18	0,95	6,78	7,22	6,28	7,03	0,54	0,98	0,53	1.6
Fibrosidad	4,25	3,93	3,98	2,45	0,42	4,43	4,00	4,58	4,00	0,91	0,40	0,28	2.1
Untuosidad	2,59	2,61	2,60	3,78	0,49	3,68	3,76	3,92	3,03	0,70	0,92	0,13	1.7
Masticabilidad	4,74	4,78	4,26	4,09	0,79	2,93	4,64	3,78	3,57	0,50	0,60	0,11	1.7
Num.Masticaciones	14,3	14,3	12,9	11,4	0,67	8,83	8,80	11,3	10,7	0,58	0,93	0,01	4.7
Jugosidad Final	3,46	3,61	4,71	4,89	0,52	4,67	4,74	3,72	3,47	0,62	0,98	0,93	2.3
Persistencia	3,61	4,11	4,58	4,71	0,79	4,38	4,54	6,23	5,02	0,33	0,37	0,17	2.1
Retrogusto	3,10ab	2,30a	4,89ab	5,34b	0,04	2,10a	2,06a	3,40b	3,47b	0,33	0,02	0,10	2.1

Medias en una misma fila y grupo con diferente letra difieren significativamente ($p \leq 0,05$)

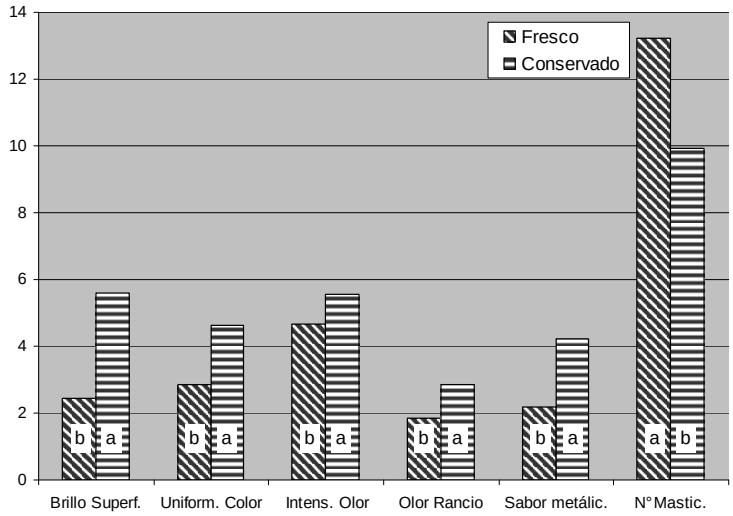


Figura 2. Diferencias entre pechuga fresca y conservada.

CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que, en general, el uso de chía en cantidades necesarias para alcanzar 1,5% de ácido linolénico en la dieta de pollos bajo las formas de semilla molida o semilla extrusada no produjo diferencias perceptibles en el análisis sensorial de la carne de pollo. En carne fresca, sólo la pechuga evidenció mayor olor y flavor a chía para la presentación como expeller debido a la mayor inclusión de la misma en la dieta de las aves. Independientemente del tratamiento, las pechugas congeladas resultaron más oscuras, brillosas y uniformes respecto a las muestras frescas. El tiempo de conservación determinó la presencia de off olores y off flavores sin distinción del tratamiento aplicado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ábalo C. 1998. Especialización agroalimentaria y diversificación industrial en la Argentina, Buenos Aires, Colección La Argentina que viene. Fundación Argentina para la revolución de los alimentos.

Ayerza R, Coates W, Lauria M. 2002. Chia seed (Salvia hispanica L.) as an ω-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. Poultry Science, 81:826-837.

Hernández JM. 2005. Sensory perception of quality of products across Europe: a case study on poultry quality. En *Sensory evaluation - more than just food*, ESN Conference, AINIA, Madrid.

IRAM 20001:1995 (ISO 5492:1992) Análisis sensorial – Vocabulario.

IRAM 20002:1995 (ISO 6658:1985) Análisis sensorial – Directivas generales para la metodología.

IRAM 20003:1995 (ISO 8589:1988*) Análisis sensorial - Guía para la instalación de locales de ensayo.

IRAM 20004:1996 (ISO 3972:1991) Análisis sensorial – Determinación de la sensibilidad del gusto.

IRAM 20005-1:1996 (ISO 8586-1:1993) Análisis sensorial – Guía general para la selección, entrenamiento y monitoreo de evaluadores – Evaluadores seleccionados

IRAM 20005-2:1996 (ISO 8586-2:1994) Análisis sensorial – Guía general para la selección, entrenamiento y monitoreo de los evaluadores – Parte 2: Expertos.

IRAM 20006:1996 (ISO 5496:1992) Análisis sensorial – Metodología – Iniciación y entrenamiento de evaluadores en la detección y reconocimiento de olores.

IRAM 20014:1998 (ISO 4121:1987) Análisis sensorial – Evaluación de productos alimenticios por métodos usando escalas. (ISO Draft 1996).

IRAM 20018:2002 (ISO 11056) Análisis sensorial – Metodología – Estimación de la magnitud.

IRAM 20019 (ISO 13299:2003) Análisis sensorial – Metodología – Guía general para establecer un perfil sensorial.
IRAM 20022 (ISO 11037:1999) Análisis sensorial – Guía general y método de ensayo para la evaluación del color de los alimentos.

Sauver, B. 1997. Les critères et facteurs de la qualité des poulets Label Rouge. INRA Production Animale, 10: 219-226

Simopoulos, A. P. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomedicine & Pharmacotherapy, 56: 365-379.

Simopoulos A. P. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. Biomedicine & Pharmacotherapy, 60: 502-507.

Estabilidad oxidativa y caracterización de antioxidantes en aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) extraído mediante CO_2 supercrítico

Oxidative stability. Characterization of antioxidants in chía (*Salvia hispanica* L.) oil extracted by supercritical CO_2

Ixtaina V [1, 2], Spotorno V [3], Cardarelli D [4], Mattea M [4], Mateo C [2], Nolasco S [2], Tomás M[1]

[1] Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET La Plata, UNLP), 47 Y 116 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina
[2] Facultad de Ingeniería, Dto. de Ing. Química (TECSE), UNCPBA, Olavarría, Argentina
[3] Instituto Tecnología de Alimentos, CIA (INTA), Hurlingham, Argentina
[4] Facultad de Ingeniería, UNRC, Río Cuarto, Argentina
vanesaix@hotmail.com

RESUMEN

Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) contienen cantidades de aceite que varían entre 32 y 39%, el cual presenta el mayor tenor natural de ácido α-linolénico conocido hasta el momento (61 – 70%). Es reconocida la importancia nutricional de los ácidos grasos ω-3, pero su elevada susceptibilidad a la oxidación limita su utilización en la industria alimenticia. Las semillas oleaginosas, principalmente aquellas que contienen elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), poseen antioxidantes naturales que ejercen un marcado efecto protector contra la oxidación lipídica. La extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) utilizando CO_2 resulta una alternativa interesante para la extracción de aceites vegetales ya que no presenta los inconvenientes de las metodologías convencionales (prensa y extracción con solventes orgánicos) y mejora la calidad del producto obtenido. El objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad oxidativa e identificar antioxidantes naturales presentes en el aceite de chía obtenido mediante CO_2 supercrítico a distintas condiciones de presión y temperatura. Se utilizó semilla de chía proveniente de la provincia de Salta (Argentina), la cual fue secada a 50ºC por 2 h inmediatamente antes del proceso de extracción. La obtención de aceite fue llevada a cabo a presiones operativas de 250 y 450 bar, temperaturas 40 y 60 ºC, con una velocidad de flujo de fluido supercrítico de 8 kg h^{-1}. La estabilidad oxidativa se evaluó mediante un ensayo acelerado (Rancimat 98ºC, flujo de aire 20 L h^{-1}). La determinación de antioxidantes fenólicos (ácidos clorogénico y cafeico, quercetina, miricetina y kaempferol) y de tocoferoles se realizó mediante HPLC – fluorescencia con columnas C_{18} y fase – normal, respectivamente. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante ANOVA y test de Tukey para la comparación de medias, realizándose el análisis de correlación entre las variables. Los resultados indican tiempos de inducción ≤ 1,3 h, no encontrándose diferencias significativas ($p>0,05$) entre las diversas condiciones operativas citadas. Los principales antioxidantes fenólicos fueron: ácido cafeico ($3,37x10^{-5} \pm 1,7x10^{-5}$ mol kg^{-1}) > miricetina ($1,66x10^{-5} \pm 6,7x10^{-6}$ mol kg^{-1}) ≈ ácido clorogénico ($1,47x10^{-5} \pm 7,5x10^{-6}$ mol kg^{-1}) ≈ quercetina ($1,37x10^{-5} \pm 6,5x10^{-6}$ mol kg^{-1}) > kaempferol ($4,04x10^{-6} \pm 2,1x10^{-6}$ mol kg^{-1}), no detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las condiciones ensayadas. Por otra parte, se encontró gamma tocoferol en todas los aceites extraídos, mientras que sólo se detectó delta tocoferol en el aceite extraído a 250 bar - 40º C. El contenido total de tocoferoles varió en el rango 36 – 95 μg g^{-1}. Se encontró una correlación positiva altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre todos los antioxidantes fenólicos. No obstante, si bien el aceite de chía extraído mediante fluidos supercríticos presenta antioxidantes naturales tales como compuestos fenólicos y tocoferoles, su estabilidad oxidativa es muy baja, debido a su elevado contenido de PUFAs.

ABSTRACT

Chia (*Salvia hispanica* L.) seeds have about 32 % to 39 % oil by weight, which contains the highest proportion of α-linolenic acid (61 – 70%) of any known natural source. It is recognized the nutritional

importance of ω-3 fatty acids, but its high susceptibility to the oxidation limits its use in food industry. The oilseeds, mainly those with high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), possess natural antioxidants which have a protective effect against the lipid oxidation. The extraction with supercritical fluids (EFSC) using CO_2 results an interesting alternative to the vegetable oil extraction because this process does not present the disadvantages of the conventional methodologies (pressing and extraction with organic solvents) and improves the quality of the final product. The objective of this work was to determine the oxidative stability and to identify natural antioxidants present in chia seed oil obtained by EFSC under different conditions of pressure and temperature. Chia seeds were obtained from commercial sources in Salta (Argentina), which was dried up to 50 ºC for 2 h immediately before of the extraction process. The extraction experiments were carried out at 40 and 60 ºC at 250 and 450 bar, with a flow rate of 8 kg CO_2 h^{-1}. The oxidative stability was evaluated by an accelerated test (Rancimat 98ºC, air flow: 20 L h^{-1}). The determination of phenolic antioxidants (chlorogenic and caffeic acids, quercetin, myricetin and kaempferol) and tocopherols was made by HPLC – fluorescence with C_{18} columns and normal phase, respectively. The statistical analysis was made with ANOVA and multiple comparisons of the means were performed by a Tukey test. Also a correlation analysis between the variables was made. The results obtained show an induction time ≤ 1.3 h, without significant differences ($p>0,05$) between the operative conditions assayed. The main Phenolic antioxidants were: caffeic acid ($3,37x10^{-5} \pm 1,7x10^{-5}$ mol kg^{-1}) > myricetin ($1,66x10^{-5} \pm 6,7x10^{-6}$ mol kg^{-1}) ≈ chlorogenic acid ($1,47x10^{-5} \pm 7,5x10^{-6}$ mol kg^{-1}) ≈ quercetin ($1,37x10^{-5} \pm 6,5x10^{-6}$ mol kg^{-1}) > kaempferol ($4,04x10^{-6} \pm 2,1x10^{-6}$ mol kg^{-1}), without statistically significant differences ($p>0,05$) between the extraction conditions. By other hand, gamma tocopherol was found in all samples extracted, whereas delta tocopherol only was detected in 250 bar - 40º C extracted oil. The total tocopherol content varied in the range 36 – 95 μg g^{-1}. A highly significant positive correlation ($p \leq 0,01$) between all phenolic antioxidants was found. However, while the oil extracted by supercritical fluids presents natural antioxidants such as phenolic compounds and tocopherols, its oxidative stability is very low, due to the high PUFAs content.

PALABRAS CLAVE: *tocoferoles, compuestos fenólicos, antioxidantes, chía, extracción supercrítica.*

KEYWORDS: *tocopherols, phenolic compounds, antioxidants chia, supercritical extraction.*

INTRODUCCIÓN

Las semillas de chía (*Salvia hispanica* L.), planta herbácea anual estival perteneciente a la familia *Lamiaceae,* contienen cantidades de aceite que varían entre 32 y 39%. Dicho aceite presenta el mayor tenor natural de ácido α-linolénico conocido hasta el momento (61 – 70%) (Ayerza 1995). Es reconocida la importancia nutricional de los ácidos grasos ω-3, pero su elevada susceptibilidad a la oxidación limita su utilización en la industria alimentaria.

Las semillas oleaginosas, principalmente aquellas que contienen un elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), poseen antioxidantes naturales que ejercen efecto protector contra la oxidación lipídica. En el aceite de chía se ha encontrado la presencia de antioxidantes naturales, tales como flavonoles y polifenoles (ácidos clorogénico y cafeico), pero en menor proporción que en sus semillas (Taga *et al.* 1984). También se han detectado fracciones de δ y γ- tocoferol en el aceite de chía extraído por solvente y prensado (Ixtaina *et al*. 2007a, 2007b).

Estos componentes presentes en la semilla de chía pueden intervenir como ingredientes multifuncionales de excelentes propiedades para la formulación de alimentos, brindar un aporte interesante desde el punto de vista fisiológico (especialmente a nivel cardiovascular, hepático y de metabolismo cerebral) y ejercer actividad antioxidante frente a su acción ante diversas sustancias reactivas al oxígeno (ROS).

La obtención de aceite de semillas oleaginosas a nivel industrial habitualmente se realiza mediante prensado o extracción por solventes, principalmente hexano. En general, el método de prensado está asociado a bajos rendimientos en aceite, mientras que la extracción con hexano está cuestionada por sus posibles daños al medio ambiente y a la salud humana, lo que ha impulsado la búsqueda de métodos de procesamiento alternativos tales como la extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) (Reverchon y Osseo 1996). El dióxido de carbono (CO_2) es el fluido más utilizado en condiciones

supercríticas, debido a que presenta la ventaja de no ser tóxico, corrosivo o inflamable, tener una alta disponibilidad con elevado grado de pureza y bajo costo (Taniguchi *et al* 1985). Asimismo, el CO_2 posee una temperatura crítica de 31,1ºC, lo que lo convierte en un solvente ideal para la extracción de productos naturales, ya que los mismos no sufren degradación térmica durante el proceso (Molero Gómez *et al*. 1996).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad oxidativa e identificar los antioxidantes naturales presentes en el aceite de chía obtenido mediante CO_2 supercrítico a distintas condiciones de proceso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de chía (*Salvia hispanica* L.) provenientes de la provincia de Salta, Argentina, como materia prima para el proceso de extracción. Luego de su limpieza manual para eliminar material extraño y semillas dañadas, las mismas fueron deshidratadas hasta peso constante en estufa a 40ºC. Posteriormente, fueron molidas con un molino de cuchillas ajustando su granulometría mediante el pasaje por un tamiz de 1 mm de abertura (ASTM # 18).

Extracción por fluidos supercríticos (EFSC)

Las experiencias de extracción supercrítica con CO_2 se realizaron en una planta de extracción a escala piloto funcionando en ciclo cerrado, con una única etapa de separación por descompresión (**Figura 1**). La cantidad de material utilizado para cada condición de trabajo, fue de aproximadamente 500 – 550 g de sólido. El proceso de extracción fue llevado a cabo con un flujo de CO_2 de 8 Kg/h, bajo dos condiciones de presión (250 y 450bar) y de temperatura (40 y 60ºC). El aceite obtenido para cada una de las condiciones operativas fue almacenado bajo atmósfera de nitrógeno a 4ºC, para evitar la ocurrencia de posibles procesos de deterioro.

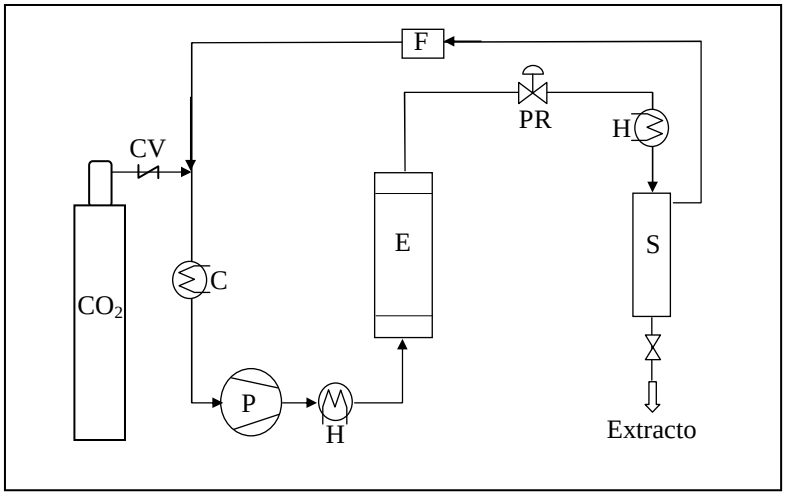


Figura 1. Diagrama del equipamiento utilizado. E: Extractor (2.5 litros); PR: válvula reguladora de presión, S: Separador; F: caudalímetro; P: bomba de diafragma; H,C: intercambiador de calor; CV: válvula de retención; CO_2: cilindro de CO_2.

Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa

Las muestras de aceite se sometieron a un ensayo de oxidación acelerada en un equipo Rancimat (679 Metrohm) (AOCS Cd 12b-92, 1993). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 5 g de aceite, 98ºC, flujo de aire (20 L/h).

Flavonoides y ácidos fenólicos

Se diluyeron 2 g de aceite en 5 ml de n-hexano y se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetonitrilo:ácido acético 10% (50:50 v/v). El extracto fue concentrado bajo atmósfera de nitrógeno y analizado por HPLC-UV. Se utilizó una columna C18, 5µm (Vydac, 25 x 0,45 m), y un gradiente de acetonitrilo: acético 10% según: (90:10 v/v) 0 a 5 min; gradiente lineal hasta (60:40 v/v) a 15 min; y (80:20 v/v) de 16 a 18 min. Este gradiente de polaridad de la fase móvil, permitió la elución en primer lugar de los

ácidos fenólicos y luego de los flavonoles. La detección se realizó por absorbancia a 255nm hasta los 5 minutos y luego a 375nm.

Tocoferoles

El contenido de tocoferoles en el aceite de chía fue determinado mediante una técnica cromatográfica basada en las normas IUPAC 2.432 (1992) y AOCS Ce 8-89 (1998). Las muestras de aceite fueron disueltas en hexano para su posterior cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia (λ exc.: 290 nm, λ emis.: 330 nm). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Hewlett Packard Serie 1050, columna fase normal Lichrosob Si-60 (25 x 0,4 cm; 5 μm de tamaño de partícula), fase móvil isopropanol:hexano (0,5:99,5 v/v, filtrado y desgasificado) a una velocidad de flujo de 1,5 ml/min y 20 μl de volumen de inyección.

Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA y test de Tukey para realizar el correspondiente análisis estadístico, realizándose además el análisis de correlación entre las variables estudiadas. Se utilizó el programa informático Statgraphic Plus 4.0. Manugistics Inc., USA (1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Tabla 1** muestra los tiempos de inducción resultantes del ensayo acelerado de estabilidad oxidativa de aceites de chía extraídos a diferentes condiciones de temperatura y presión estudiadas. Los resultados evidenciaron tiempos de inducción ≤ 1,3 h, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las diversas condiciones operativas citadas. La estabilidad oxidativa de los aceites obtenidos mediante EFSC resultaron menores que las informadas para el aceite extraído con hexano (2,4 h) (Ixtaina *et al*. 2007a) y prensa (2,5 h) (Ixtaina *et al*. 2007b). Resultados similares fueron encontrados en aceite de girasol, asociando la menor estabilidad oxidativa de los aceites extraídos por EFSC a la presencia de trazas de oxígeno en el solvente de extracción, CO_2, aún siendo este fluido de elevada calidad (Calvo *et al*. 1994).

Tabla 1. Ensayo acelerado de estabilidad oxidativa de aceites de chía (*S. hispanica* L.*)* extraídos mediante CO_2 supercrítico a diferentes condiciones operativas.

Temperatura (ºC)	Presión (bar)	Tiempo de inducción (h)
40	250	0,97 ± 0,07 [a]
	450	0,67 ± 0,10 [a]
60	250	0,93 ± 0,33 [a]
	450	1,30 ± 0,42 [a]

Se indica el valor medio correspondiente a 2 repeticiones ± desvío standard.
Letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencia significativas ($p \leq 0,05$)

Los principales antioxidantes polifenólicos presentes en el aceite de semilla de chía fueron: ácido cafeico > miricetina ≈ ácido clorogénico ≈ quercetina > kaempferol, no detectándose diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre las distintas condiciones ensayadas (**Tabla 2**). Esta información es similar a la proporcionada por Taga *et al*. (1984) en semillas de chía, donde se registró la presencia de estos antioxidantes con mayores niveles de concentración (≈ 2 órdenes de magnitud superior al contenido en aceite). Este hecho puede atribuirse a la naturaleza hidrofílica de estos compuestos, la cual no favorece su solubilidad en el aceite. Asimismo, el contenido total de estos antioxidantes fue similar al encontrado en los aceites de chía extraídos por solvente ($2,04 \times 10^{-5}$ mol kg^{-1}) y prensa ($1,4 \times 10^{-5}$ mol kg^{-1}) (Ixtaina *et al.* 2007a, 2007b).

El contenido total de tocoferoles varió en el rango 36 – 95 μg g^{-1}, presentando este parámetro diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre las condiciones operativas ensayadas. La contribución principal al tenor de los tocoferoles totales en chía es la del gama tocoferol, el cual presenta la misma tendencia de concentración en el aceite que los tocoferoles totales en función de las distintas condiciones operativas. Así, el mayor contenido de tocoferoles se observó en el aceite extraído a 450 bar – 40ºC, mientras que los menores valores se presentaron en el aceite obtenido a 250 bar- 60ºC (**Figura 2**). Ahora bien, para una determinada presión, la obtención de una menor

concentración de tocoferoles en el aceite a la temperatura más elevada de proceso puede ser explicada debido a una mayor extracción de aceite (Ixtaina *et al.*, 2007a), lo cual puede traducirse en una dilución de dichos compuestos. No obstante, otros factores también podrían afectar la concentración de tocoferoles, tales como el efecto co-solvente del aceite (Jachmanián *et al.*, 2006), degradación térmica (Bostyn *et al.*, 2008), siendo necesario realizar mayores investigaciones al respecto. Si bien se encontró gamma tocoferol en todos los aceites obtenidos por EFSC (**Figura 2**), el delta tocoferol solamente se detectó en muy bajas concentraciones (4,17 mg/kg aceite) a 250 bar y 40ºC condiciones donde se obtuvo el menor rendimiento del aceite (Ixtaina *et al*., 2007a), por ende pudo haber una menor dilución y así detectarse el delta tocoferol. No obstante, el contenido de tocoferoles de los aceites obtenidos mediante EFSC fue menor que el informado para el aceite de chía obtenido por solvente (295 mg/kg aceite) y por prensado (230 mg/kg aceite) a partir de la misma materia prima (Ixtaina et al. 2007b, 2007c). Este hecho se relaciona con la menor estabilidad oxidativa registrada para aceites de chía obtenidos por EFSC en comparación con la informada en el caso de las metodologías tradicionales.

Tabla 2. Composición de antioxidantes polifenólicos en aceite de semilla de chía (*S. hispanica* L., obtenido mediante EFSC a diferentes condiciones operativas.

T (ºC)	P (bar)	Antioxidante (mol kg^{-1})					
		Ác. clorogénico	**Ác. cafeico**	**Miricetina**	**Quercetina**	**Kaempferol**	**Total**
40	**250**	$1{,}31x10^{-5} \pm 2{,}17x10^{-6a}$	$3{,}01x10^{-5} \pm 4{,}61x10^{-6a}$	$1{,}35x10^{-5} \pm 6{,}33x10^{-7a}$	$1{,}23x10^{-5} \pm 1{,}76x10^{-6a}$	$3{,}48x10^{-6} \pm 5{,}35x10^{-7a}$	$7{,}25x10^{-5} \pm 1{,}94x10^{-6a}$
	450	$9{,}55x10^{-6} \pm 1{,}42x10^{-9a}$	$2{,}15x10^{-5} \pm 4{,}47x10^{-7a}$	$1{,}00x10^{-5} \pm 6{,}97x10^{-8a}$	$9{,}38x10^{-6} \pm 2{,}02x10^{-7a}$	$2{,}63x10^{-6} \pm 1{,}56x10^{-8a}$	$5{,}30x10^{-5} \pm 1{,}47x10^{-7a}$
60	**250**	$1{,}05x10^{-5} \pm 5{,}95x10^{-8a}$	$2{,}44x10^{-5} \pm 2{,}57x10^{-7a}$	$1{,}75x10^{-5} \pm 2{,}31x10^{-6a}$	$9{,}73x10^{-6} \pm 3{,}48x10^{-7a}$	$2{,}89x10^{-6} \pm 1{,}85x10^{-8a}$	$6{,}50x10^{-5} \pm 5{,}99x10^{-7a}$
	450	$2{,}58x10^{-5} \pm 2{,}00x10^{-5a}$	$5{,}92x10^{-5} \pm 4{,}59x10^{-5a}$	$2{,}57x10^{-5} \pm 2{,}32x10^{-6a}$	$2{,}34x10^{-5} \pm 1{,}83x10^{-5a}$	$7{,}16x10^{-6} \pm 5{,}77x10^{-6a}$	$1{,}41x10^{-4} \pm 1{,}85x10^{-5a}$

Se indica media y desvío standard de tres determinaciones.
Letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencias significativas ($p \leq 0{,}05$)

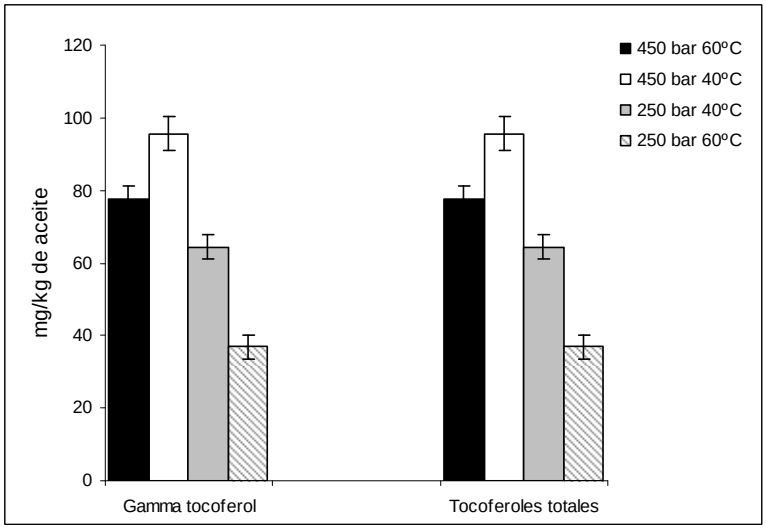


Figura 2. Tocoferoles presentes en aceites de semillas de chía (*S. hispanica* L.*)* obtenido mediante EFSC a diferentes condiciones operativas.

En síntesis, si bien el aceite de chía extraído mediante fluidos supercríticos contiene antioxidantes naturales tales como compuestos fenólicos y tocoferoles, su estabilidad oxidativa es muy baja, debido a su elevado contenido de PUFAs (85,3 %) (Ixtaina *et al*., 2007b).

CONCLUSIONES

El proceso de EFSC llevado a cabo bajo distintas condiciones operativas permitió la obtención de aceites de chía de similar estabilidad oxidativa y contenido de antioxidantes fenólicos aunque de distinto tenor en el contenido de tocoferoles totales. Si bien se han detectado compuestos con actividad antioxidante en el aceite de chía, el elevado contenido de PUFAs prevalece sobre los mismos, contribuyendo de esta manera a una alta susceptibilidad de deterioro oxidativo de este aceite.

AGRADECIMIENTOS

La extracción de aceite mediante fluidos supercríticos fue realizada en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Río Cuarto, en conjunto con los Dres. Miguel Mattea y Damián Cardarelli, víctimas del accidente ocurrido en diciembre pasado en la mencionada Universidad. A ellos, excelentes personas y reconocidos profesionales, nuestro más profundo agradecimiento y sincero homenaje.

Los autores agradecen a:

- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). PICT 2002-0910768 y UNLP (11/X390).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS (1998). Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists'Society, 15th Edition, *AOCS Press*, Champaign, Illinois.

Ayerza R. 1995. Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica*) from Five Northwestern Locations in Argentina. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72: 1079-1081.

Bostyn S., Duval-Onen F,, Porte C., Coïc J.P., Fauduet H. 2008. Kinetic modelling of the degradation of the α-tocopherol in biodiesel-rape methyl ester, Bioresource Technology, 99: 6439-6445.

Calvo L, Cocero MJ, Díez JM. 1994. Oxidative Stability of Sunflower Oil Extracted with Supercritical Carbon Dioxide**.** Journal of the American Oil Chemists' Society, 71: 1251-1254.

IUPAC. 1992. International Union of Pure and Applied Chemistry- Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivates. 7th ed. Paquot,C. y Hautffene , A., Blackwell Scientfic Publications, Inc., Oxford

Ixtaina V.Y., Cardarelli, D.A., Mattea M.A., Nolasco S., Tomás M.C. 2007a. Extracción de aceite de Chía (*Salvia hispanica* L.) mediante CO2. XII Congresso Latino-americano de Oleos e Gorduras – Sección Latinoamericana de la American Oil Chemist´s Society, Florianópolis, Brasil.

Ixtaina VY, Martínez M, Maestri D, Spotorno V, Mateo C, Nolasco SM, Tomás MC. 2007b. Antioxidantes en aceite de chía (*Salvia hispanica* L.) obtenido mediante prensado. Proceeding VI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Ambato (Ecuador).

Ixtaina VY, Martínez M, Mateo C, Nolasco SM, Tomás MC. 2007c. Oxidative stability and characterization of antioxidants in chia seed oils**.** 98th AOCS Annual Meeting & Expo, Quebec, Canadá.

Jachmanián I, Margenat L., Torres A., Grompone M.A. 2006. Estabilidad oxidativa y contenido de tocoferoles en el aceite de canola extraídocon CO_2 supercrítico. Grasas y Aceites, 57: 155 - 159.

Molero Gómez A, Pereyra López C, Martínez de la Ossa E. 1996. Recovery of grape seed oil by liquid supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with convention solvent extraction. Chemical Engineering Journal, 61: 227-231.

Reverchon E, Osseo LS. 1996. Process alternatives for soybean oil supercritical extraction: Comparison of processes of supercritical CO_2 extraction from soybean oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, 71: 1007.

Statgraphics Plus 4.0. 1999. Statistical Graphic Corporation. Manugistics Inc., Rockville, USA.
Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 61: 928- 931.

Taniguchi M, Kamihira M, Tsuji T, Kobayashi T. 1985. Extraction of oils from wheat germ with supercritical carbon dioxide. Agricultural and Biological Chemistry 49: 2367-2372.

Efecto de las condiciones operativas de extracción supercrítica sobre el perfil de olor en aceite de chía

Effect of diverse supercritical extraction procedures on the odour profile of chía (*Salvia hispanica* L.) oil

Ixtaina V (1, 2), Langman L (3), Grigioni G (3,4), Cardarelli D (5)†, Mattea M (5)†, Nolasco S (2), Tomás M (1)

1 Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET La Plata, UNLP), La Plata, Argentina. 47 Y 116 (1900), La Plata, Buenos Aires, Argentina
2 Facultad de Ingeniería, Dto. de Ing. Química (TECSE), UNCPBA, Olavarría, Argentina
3 Instituto Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA, Morón, Buenos Aires, Argentina
4 CONICET, Buenos Aires, Argentina
5 Facultad de Ingeniería, UNRC, Río Cuarto, Argentina
vanesaix@hotmail.com

RESUMEN

La semilla (*Salvia hispanica* L.) de chía contiene alrededor de 32-39% de aceite, con un alto contenido de ácido α-linolénico (C18:3) (61–70%). La extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) utilizando CO_2 es una alternativa interesante para la extracción de aceites vegetales ya que no presenta los inconvenientes asociados al empleo de disolventes orgánicos logrando un producto de mayor calidad. Por ello, es importante la determinación de las condiciones de presión y temperatura operativas óptimas de este proceso. Así, los valores aplicados de estos parámetros pueden afectar el perfil de olor (atributo de calidad organoléptica) del producto obtenido. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil de olor de aceite de chía obtenido por EFSC en función de las condiciones de extracción empleadas. La EFSC fue llevada cabo a presiones operativas de 250 y 450 bar, temperaturas de 40 y 60ºC, con y sin la adición de etanol como co-solvente, flujo másico de fluido supercrítico de 8 kg/h. El perfil de olor se analizó mediante una Nariz Electrónica acoplada a un Espectrómetro de Masa (NE-MS) (α-Prometheus, Alpha MOS, Francia) utilizando la metodología de espacio de cabeza estático y 18 sensores semiselectivos frente a los distintos grupos de compuestos volátiles pertenecientes al alimento. La señal generada en cada sensor es el valor de la resistencia eléctrica causada por adsorción de los compuestos volátiles. El conjunto de respuestas obtenidas en cada sensor produce un patrón característico del perfil de olor de la matriz alimenticia en estudio. Se analizaron 2,0±0,1ml de muestra previamente incubada a 35ºC durante 90s. Para el análisis, se consideró la relación entre el máximo de la variación en la resistencia de cada sensor y su resistencia base El rango de relaciones masa/carga analizados con el MS fue 50-200amu, utilizando impacto electrónico como técnica de ionización y un cuadrupolo como analizador. Los perfiles de olor determinados por NE-MS se analizaron mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) con selección de variables (Alphasoft V8®), obteniéndose 2 componentes, los cuales explicaron el 50,3 y el 43,1% de la varianza total, respectivamente. Se observó que la tecnología NE-MS es capaz de discriminar los aceites provenientes en función de sus respectivos tratamientos, por lo que las condiciones operativas de obtención de aceite por EFSC pueden ejercer su influencia sobre el olor de un producto. A través de la tecnología NE-MS es posible diferenciar el perfil de olor de los aceites de chía obtenidos bajo diferentes condiciones operativas por lo que resulta primordial la selección y el control de las variables aplicadas al proceso.

ABSTRACT

Chia seed (*Salvia hispanica* L.) contains about 32-39% of oil by weight, with a high content of α-linolenic acid (C18:3) (61–70%). The extraction with supercritical fluids (EFSC) using CO_2 results an interesting alternative to the extraction of vegetable oils because it does not present the problems associated with the use of organic solvents, obtaining a high quality product. Therefore, the selection of the optimum pressure and temperature conditions of this process is important. Thus, the values of

these parameters can affect the smell profile (organoleptic quality parameter) of the final product. The objective of this work was to evaluate the smell profile of the chia oil obtained by EFSC depending on the extraction conditions used. The EFSC was carried out under the following operative conditions: pressure (250 and 450 bar), temperatures (40 and 60ºC), with and without the use of ethanol as co-solvent, with a flow rate of 8 kg/h CO_2. The smell profile was analyzed with an Electronic Nose coupled with a Mass Spectrometer (NE-MS) (α-Prometheus, Alpha MOS, France) using the methodology of the static head space and 18 semi selective sensors against to the different groups of volatile compounds of the food. The signal generated in each sensor is the value of the electric resistance caused by adsorption of the volatile compounds. The set of responses obtained in each sensor produces a characteristic pattern of the smell profile of the food matrix assayed. Samples of 2.0 ± 0.1 ml previously incubated at 35 ºC for 90 s were analyzed. For the study, the ratio between the maximum variation of the resistance of each sensor and its base resistance was considered. Mass/charge ratio assayed with the MS was 50-200 amu, using electronic impact as ionization technique and a quadrupole analyzer. The smell profiles determined by NE-MS were analyzed by Principal Component Analyses (PCA) with a selection of variables (Alphasoft V8®), obtaining 2 components that explained 50.3 and 43.1% of total variance, respectively. It was observed that NE-MS technology could discriminate the oils according to the different treatments, so the operative conditions of the oil extraction by EFSC influence the smell of the product. Therefore, the selection and control of the applied variables in the EFSC is very relevant.

PALABRAS CLAVE: *chia, nariz electrónica, extracción supercrítica.*

KEYWORDS: *chia, electronic nose, supercritical extraction.*

INTRODUCCIÓN

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una planta herbácea anual estival, perteneciente a la familia *Lamiaceae* cuyo origen geográfico se circunscribe a las áreas montañosas de México y norte de Guatemala (Ayerza y Mealla 1993). En Argentina su cultivo se distribuye principalmente en la región noroeste, constituyendo una alternativa económicamente factible lo cual permitiría diversificar la producción agrícola de esta región con el consecuente impacto socio - económico para los productores locales (Coates y Ayerza 1996).

Las semillas de chía fueron utilizadas por las sociedades precolombinas como materia prima en la elaboración de medicinas, compuestos nutricionales y pinturas (Sahagún 1579 citado por Ayerza y Coates 2005). Dichas semillas presentan alrededor del 25 a 39% de aceite, el cual contiene el mayor contenido de ácido alfa-linolénico (61–70 %) proveniente de especies vegetales (Palma *et al.* 1947, Ayerza 1995, Coates y Ayerza 1998), con la ventaja adicional de poseer antioxidantes naturales que posibilitan una mejor preservación manteniendo su aceptabilidad por parte del consumidor (Taga *et al.* 1984).

La obtención de aceite de semillas oleaginosas a nivel industrial habitualmente se realiza mediante prensado o extracción por solventes, principalmente hexano. En general, el método de prensado está asociado a bajos rendimientos en aceite, mientras que la extracción con hexano es cuestionada por sus posibles daños al medio ambiente y a la salud humana. Estos hechos han impulsado la búsqueda de métodos de procesamiento alternativos tales como la extracción mediante fluidos supercríticos (EFSC) (Reverchon y Osseo 1996). El dióxido de carbono (CO_2) es el fluido más utilizado en condiciones supercríticas, debido a que presenta la ventaja de no ser tóxico, corrosivo e inflamable, tener alta disponibilidad con elevado grado de pureza y bajo costo (Taniguchi *et al.* 1985). Asimismo, el CO_2 posee una temperatura crítica de 31,1ºC, lo que lo convierte en un solvente ideal para la extracción de productos naturales, debido a que los mismos no sufren degradación térmica durante el proceso (Molero Gómez *et al*. 1996).

El análisis de olores es de particular importancia en la industria de alimentos, donde el olor, color y sabor son atributos organolépticos que definen la calidad de un producto. Sin embargo, la evaluación del olor de un producto es dificultosa debido a que las percepciones olfativas humanas son claramente subjetivas, ya que están influenciadas por distintos factores, como la edad, sexo, estado de salud (Rodríguez Méndez 2001).

Tradicionalmente, el olor de los alimentos ha sido analizado mediante evaluación sensorial y/o técnicas cromatográficas con sistemas de detección universal como la espectrometría de masas (MS) o la ionización de llama (FID). El análisis del perfil de olor mediante la nariz electrónica es una técnica relativamente nueva, rápida y no destructiva, que procesa la fracción volátil del alimento de forma global y similar a la realizada por la nariz humana, permitiendo clasificar los diferentes alimentos en función de su similitud aromática, e identificando a éstos sin determinar su composición. Su objetivo, al igual que el sistema olfativo humano, es relacionar el olor percibido con una respuesta que, tras ser almacenada en la memoria, servirá como modelo para ulteriores análisis (Busto 2009). La señal generada en cada sensor de la nariz electrónica es la variación de la resistencia eléctrica causada por adsorción de los compuestos volátiles. Esta variación será dependiente de la naturaleza de cada sensor y de la composición de compuestos volátiles pertenecientes al espacio de cabeza en estudio. El conjunto de respuestas obtenidas a partir del total de los sensores produce un patrón característico del perfil de olor de la matriz alimenticia, denominándose este patrón "huella digital".
Los valores iniciales de humedad de la semilla, el uso de co-solvente (etanol), así como la presión y temperatura operativas aplicados en la extracción de aceite de chía mediante fluidos supercríticos, pueden afectar el perfil de olor (atributo de calidad organoléptica) del producto obtenido.
El objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil de olor de aceite de chía obtenido por EFSC en función de las diversas condiciones de extracción empleadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de chía provenientes de la provincia de Salta (Argentina) fueron empleadas como materia prima para el proceso de extracción del aceite. Para ello se utilizaron semillas sin (8,2% b.s. Hº) y con previa deshidratación a 40ºC en estufa hasta 4,7% b.s. y 0,5 % de Hº. Posteriormente las mismas fueron molidas en un molino de cuchillas, ajustando su granulometría mediante el pasaje por un tamiz de 1 mm de abertura (ASTM # 18).

Extracción por fluidos supercríticos

Las experiencias de extracción supercrítica con CO_2 se realizaron en una planta de extracción a escala piloto funcionando en ciclo cerrado, con una única etapa de separación por descompresión (**Figura 1**). La cantidad de material utilizado para cada condición de trabajo fue de aproximadamente 500 – 550 g de sólido. La EFSC fue llevada cabo a presiones operativas de 250 y 450 bar, temperaturas de 40 y 60º C, con y sin adición de etanol como co-solvente, y flujo másico de fluido supercrítico de 8 kg/h.

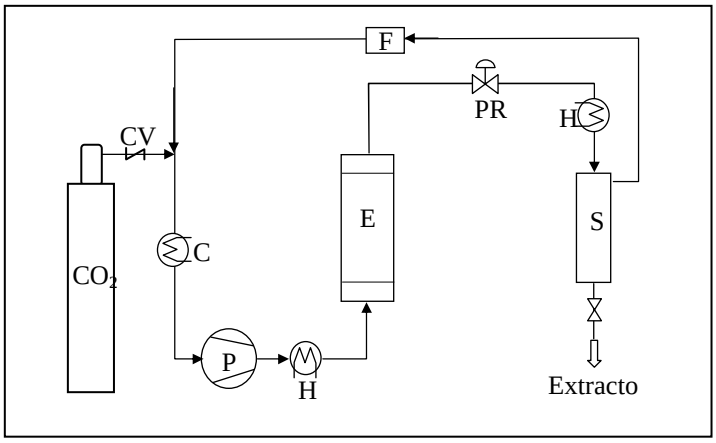


Figura 1. Diagrama del equipamiento utilizado. E: Extractor (2.5 litros); PR: válvula reguladora de presión, S: Separador; F: caudalímetro; P: bomba de diafragma; H,C: intercambiador de calor; CV: válvula de retención; CO_2: cilindro de CO_2.

Determinación del perfil de olor

El perfil de olor se analizó mediante una Nariz Electrónica acoplada a un Espectrómetro de Masa (NE-MS α-Prometheus, Alpha MOS, Francia) utilizando la metodología de espacio de cabeza estático y 18 sensores de óxido metálico (sensores MOS), semiselectivos frente a los distintos grupos de

compuestos volátiles pertenecientes al alimento. La señal generada en cada sensor es el valor de la resistencia eléctrica causada por adsorción de los compuestos volátiles. El conjunto de respuestas obtenidas en cada sensor produce un patrón característico del perfil de olor de la matriz alimenticia en estudio. Se analizaron 2,0 ± 0,1ml de muestra previamente incubada a 35ºC durante 90 s y una agitación de 250 rpm para obtener el equilibrio del espacio de cabeza. Para el análisis, se consideró la relación entre el máximo de la variación en la resistencia de cada sensor y su resistencia base. El tiempo de adquisición fue de 120s con una frecuencia de 0,5s. El gas transportador utilizado en la NE fue aire cromatográfico N35 (Air Liquide®). El rango de relaciones masa/carga analizados con el MS fue 50-200amu, utilizando impacto electrónico a 70eV como técnica de ionización y un cuadrupolo como analizador. La adquisición del MS se obtuvo a partir de un promedio de 90 registros obtenidos para cada muestra. El gas transportador utilizado en esta técnica fue nitrógeno N55 (Air Liquide ®).

Análisis estadístico

Los perfiles de olor fueron determinados mediante NE-MS por quintuplicado habiendo sido analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) con selección de variables (Alphasoft V8®).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A modo descriptivo, la adquisición de datos proveniente del perfil de olor realizada mediante las técnicas NE y MS puede observarse en la **Figura 2**. Por un lado, puede apreciarse la variación de la resistencia de cada uno de los 18 sensores en la adquisición de datos de la nariz electrónica debido a la interacción entre compuestos volátiles y los sensores y, por otro, la huella digital "finger print" obtenida al aplicar la técnica MS sobre el espacio cabeza, mostrando las abundancias relativas de cada relación masa/carga (m/z).

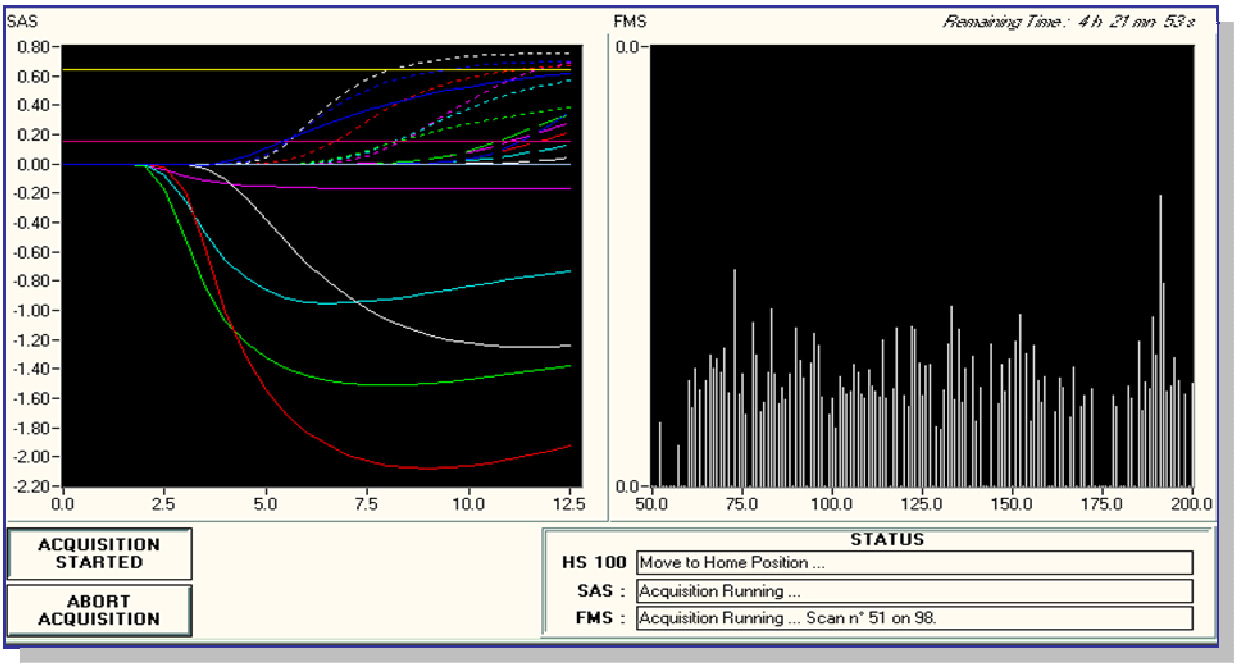


Figura 2. Adquisición de datos del perfil de olor en el espacio de cabeza.

El análisis de los resultados del perfil de olor mediante el análisis de componentes principales (PCA) aplicado al perfil de olor (**Figura 3**) de las muestras agrupadas por tratamiento de extracción, permitió observar una clara diferenciación entre los tratamientos**.** A partir de la aplicación de este método estadístico multivariado, se obtuvieron 2 componentes principales (CP) que permitieron explicar el 50,3 y el 43,1% de la varianza total, respectivamente.

El aceite extraído a partir de las semillas de chía con mayor contenido de humedad (8,2% b.s.) a 250 bar -60ºC y sin uso de co-solvente fue el que presentó mayores diferencias con respecto a los restantes, principalmente en el CP 1. Estos resultados sugieren que este factor sería el responsable de la diferenciación en el perfil de olor.

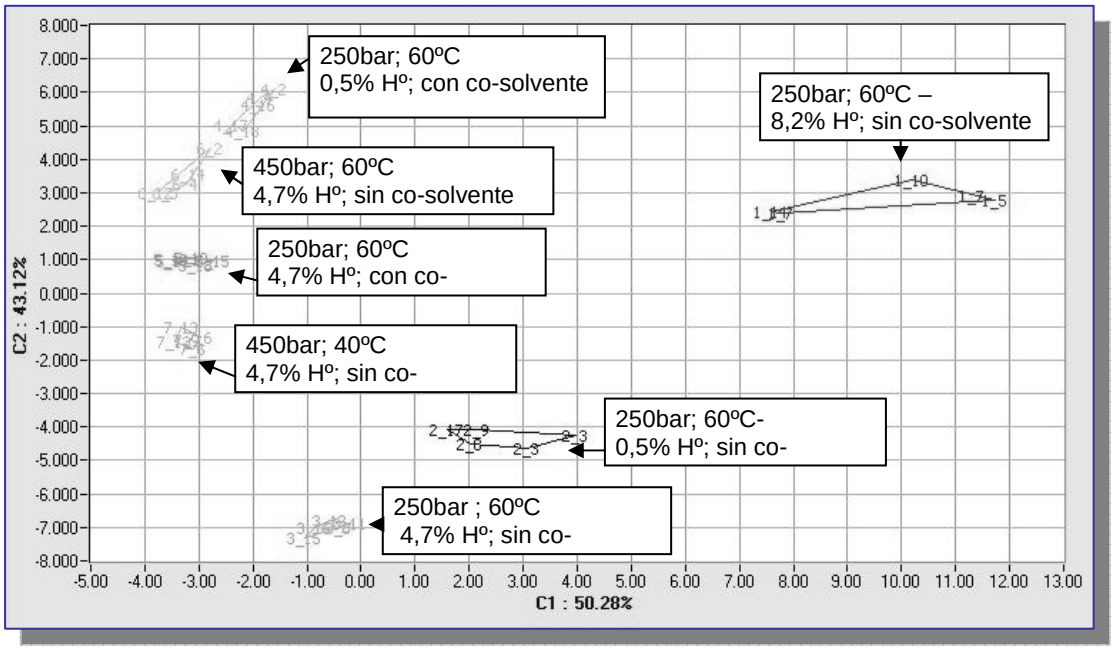


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) aplicado al perfil de olor de las muestras agrupadas por tratamiento de extracción

Se observó una clara diferenciación entre los aceites de chía provenientes de los diversos tratamientos, evidenciando el efecto asociado a la EFSC con respecto a este indicador de calidad sensorial.
Como se mencionó previamente, las muestras de aceite que presentaron una mayor diferenciación en su perfil de olor con respecto al resto de los grupos fueron aquellas provenientes de semillas de chía con un mayor nivel de humedad inicial, por lo que cabe resaltar que no sólo las condiciones tecnológicas de extracción son relevantes en el olor del aceite obtenido, sino que las características de la materia prima (en este caso el nivel de humedad inicial de las semillas) tienen una gran incidencia sobre el perfil de olor del producto obtenido.
La tecnología NE-MS fue capaz de diferenciar los aceites provenientes de los distintos tratamientos, por lo que las condiciones operativas de obtención de aceite por EFSC pueden afectar el olor del producto. De este modo, es posible realizar la caracterización del aceite de chía obtenido de acuerdo al tratamiento de obtención aplicado. Por tal motivo, resulta de gran importancia la selección y el control de las variables aplicadas en dicho proceso.

CONCLUSIONES

La tecnología NE-MS fue capaz de discriminar los aceites de chía provenientes en función de los distintos tratamientos, por lo que las condiciones operativas de obtención de aceite por EFSC ejercen su influencia sobre el perfil de olor de un producto. La composición de la materia prima utilizada tiene influencia sobre este indicador de calidad sensorial. En este estudio, se evidenció además el efecto del nivel de humedad inicial de las semillas de chía.
Por tal motivo, resulta primordial la selección y el control de las variables aplicadas en la EFSC de aceites de chía.

AGRADECIMIENTOS

La extracción de aceite mediante fluidos supercríticos fue realizada en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Río Cuarto, en conjunto con los Dres. Miguel Mattea y Damián Cardarelli, víctimas del accidente ocurrido en diciembre pasado en la mencionada Universidad. A ellos, excelentes personas y reconocidos profesionales, nuestro más profundo agradecimiento y sincero homenaje.
Los autores agradecen a:
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT). PICT 2002-0910768 y UNLP (11/X390).

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayerza R. 1995. Oil Content and Fatty Acid Composition of Chia (*Salvia hispanica*) from Five Northwestern Locations in Argentina. Journal of the American Oil Chemists' Society, 72: 1079-1081.
Ayerza R, Coates W. 2005. Chia. Rediscovering a Forgotten Crop of the Aztecs.University of Arizona. U.S.A.

Ayerza R (h), Mealla AM. 1993. El cultivo de la chia en México, Agropecuaria El Valle S.A., Buenos Aires.

Busto O. 2009. La nariz electrónica: una nueva herramienta para analizar el olor. ACE Revista de Enología 103.

Coates W, Ayerza R (h). 1996. Production potential of chia in northwestern Argentina. Industrial Crops and Products, 5: 229-33.

Coates W , Ayerza R (h) 1998. Commercial production of chia in northwestern Argentina. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75 (10): 1417-1420.

Molero Gómez A, Pereyra López C, Martínez de la Ossa E. 1996. Chemical. Engineering Journal, 61: 227-231.

Palma F, Donde M, Lloyd WR. 1947. Fixed oils of Mexico: I. Oil of chia – Salvia hispanica. Journal of the American Oil Chemists' Society, 24: 27 – 28.

Reverchon E, Osseo LS 1996. Process alternatives for soybean oil supercritical extraction: Comparison of processes of supercritical CO_2 extraction from soybean oil, Journal of the American Oil Chemists' Society, 71: 1007.

Rodríguez Méndez ML. 2001. Análisis sensorial de alimentos. Nariz electrónica. Anales de la Sociedad Española de Química: 9 – 18.

Sahagún B. 1579. Historia general de las cosas de Nueva España (Codex Florentino). Ed. A.M. Garibay, 1989. Editorial Porrua. México City

Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists´ Society, 61: 928- 931

Taniguchi M, Kamihira M, Tsuji T, Kobayashi T. 1985. Agricultural and Biological Chemistry, 49: 2367-2372.

Aromas y precursores aromáticos en las variedades de uva tinta Syrah y Tempranillo.

Flavours and aromatic precursors in red grapes Syrah and Tempranillo

Lasanta C, Caro I, Pérez L.

Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Cádiz. Campus Río San Pedro. Apartado 40. 11510. Puerto Real. Cádiz (España).
e-mail: cristina.lasanta@uca.es

RESUMEN

El perfil aromático de un vino es uno de los parámetros fundamentales a la hora de definir su calidad. En el mercado actual, existe una creciente demanda de vinos jóvenes de marcado carácter varietal. Los compuestos que contribuyen en mayor medida a este carácter varietal son los terpenos, norisoprenoides y fenoles volátiles. La identidad y cantidad en que se pueden encontrar estos compuestos en los mostos puede ser diferente según la variedad de uva estudiada. Los compuestos aromáticos están presentes normalmente en dos formas: en estado libre, contribuyendo directamente al aroma, o bien combinados en forma de glicósidos no aromáticos, que pueden ser liberados naturalmente, y pasar entonces a formar parte del aroma del vino. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar y cuantificar los aromas varietales libres y los precursores aromáticos presentes en dos variedades de uva tinta en la zona del "Marco de Jerez" (Jerez de la Frontera, España), con el fin de conocer el potencial aromático de cada una de ellas. Las muestras de uva, recogidas en el momento de la vendimia, fueron molturadas y maceradas en el propio mosto, ajustado a 12 % de alcohol y pH 3,5, durante 12 h, para simular la extracción que ocurre durante la vinificación en tinto tradicional. Los aromas fueron extraídos con diclorometano y analizados mediante cromatografía gaseosa. En total, se han determinado quince compuestos aromáticos distintos. De todos ellos, siete aparecen en las dos variedades, tanto en forma libre como conjugada, ocho son característicos de una sola de ellas, y de estos últimos, cuatro de ellos aparecen solo en forma conjugada. La relación entre compuestos libres y conjugados es variable según la familia aromática y la variedad estudiadas. Además, el contenido total de cada una de las familias es distinto para cada variedad, destacando el alto contenido en compuestos norisoprenoides que presenta la variedad Syrah en relación a los que presenta la variedad Tempranillo. En resumen, resulta muy interesante el estudio aromático de cada variedad de uva para determinar cuáles son los compuestos característicos de cada una de ellas y en qué proporción se encuentran. Esta información puede ser empleada a la hora de decidir entre vinificar cada variedad por separado o realizar una mezcla ("coupage"). Además, es importante conocer el potencial aromático de cada variedad, ya que muchos de los compuestos varietales aparecen fundamentalmente o exclusivamente en forma conjugada, y su liberación puede significar un aumento de la intensidad aromática del vino.

ABSTRACT

The aromatic profile of a wine is one of the fundamental characteristics that are analyzed when defining its quality. Nowadays a growing demand of young wines, with high varietal character, is been introduced in markets. Some of the major components of the varietal aroma of the wines that contribute to the variety character are terpenes, norisoprenoids and volatile phenols. The kind and quantity of these compounds that can be found in musts differentiates between varieties of grape. Aroma molecules are usually presents into two fractions: a free one that contributes directly to the aroma of the musts, and another bound one, forming non aromatic glycosides, although later they can liberate their aromatic load. The aim of this work was to determinate and to cuantify free and bound aroma compounds in two varietys of red grape in the in the Sherry region (Jerez de la Frontera, Spain), in order to know the aromatic potential of each type of grape. Grape samples collected at harvest were crushed and macerated with the must, adjusted to 12 % alcohol degree and pH 3.5, for 12 h, in order to simulate the extraction that takes place in the traditional red winemaking. Aroma were extracted with dicloromethane and analiced by gas chromatography. In short, 15 different compounds have been

determined. Seven of them are common in the two varieties, both free and conjugated form. Eight of them are characteristic of one variety, and four of these appear only in conjugated form. The relationship between free and conjugated compounds is variable depending on the family and the aromatic variety studied. In addition, the total content of each family is different for each variety, highlighting the high content of norisoprenoid compounds in the Syrah variety in relation to Tempranillo grape. In conclusion, is very interesting to determine the aromatic potential of each variety in order to determine the characteristic aroma componds and the cuantity in wich they can be found. This information can be employed to decide between the winemaking of each variety alone or the making of a blend or "coupage". Furthermore, is important to know the aromatic potential of each variety, because some of the aroma compounds are present basically or only in bound form, and to release them can suppose an increase the wine aroma.

PALABRAS CLAVE: *uva tinta, vino, precursores aromáticos.*

KEYWORDS: *red grape, wine, aroma precursors.*

INTRODUCCIÓN

El aroma varietal que caracteriza a un vino, en especial si se trata de un vino joven, se debe a una serie de compuestos que se encuentran de manera natural en la uva. Estos compuestos pueden encontrarse en forma libre, percibiéndose por el olfato tal y como se encuentran en la uva, o en forma combinada generalmente unidos a moléculas de azúcares, y que se encuentran normalmente en mayor proporción que los primeros aunque son inodoros.

Los denominados precursores aromáticos pueden transformarse en aromas libres, pasando de esta manera a formar parte del aroma del vino. (Ferreira 2001, Hidalgo 2006). Así, pueden liberarse naturalmente por acción de las enzimas y la acidez del vino, o bien como resultado de algún proceso tecnológico específico, como puede ser la adición de determinados preparados enzimáticos, y pasar entonces a su forma aromática. Sin embargo, es necesario también tener en cuenta que no todas las sustancias aromáticas libres producen olor, es decir, no todas alcanzan la concentración suficiente como para producir olor. Para ello deben superar una concentración umbral, que es la cantidad mínima de un compuesto que puede ser directamente reconocido por su olor, y que se denomina umbral de percepción.

Los compuestos responsables del aroma varietal de las uvas y vinos, suelen agruparse en tres familias de compuestos, como son los terpenos, los norisoprenoides y los derivados fenólicos.

Los terpenos (monoterpenos, C10 y sesquiterpenos, C15) se encuentran en forma de aldehídos, ácidos, ésteres, hidrocarburos simples y alcoholes, siendo estos últimos los más odorantes. Son los principales responsables de los aromas florales y frutales característicos de ciertas variedades de uva, aunque están presentes en casi todas ellas. Su concentración varía según la variedad de uva, sin embargo, en muchos casos se encuentran en su mayor parte como precursores en forma de glicósidos en proporciones combinado/libre que pueden oscilar de 2/1 a 24/1 (Hidalgo 2006). Estos compuestos se localizan fundamentalmente en las últimas capas de células del hollejo, muy cerca de la pulpa, aunque en variedades muy aromáticas pueden encontrarse también en la pulpa.

En cuanto a los derivados norisoprenoides presentes en la uva, existen moléculas de 9, 10, 11 y 13 átomos de carbono, siendo estos últimos los más aromáticos, como la β-damascenona, β-ionona, ionol y vitispirano, presentando olores característicos y muy apreciados en ciertos vinos. Al igual que los monoterpenos, también pueden encontrarse en forma de glicósidos inodoros. Su origen está ligado a la existencia y degradación de ciertos carotenoides, como β-caroteno, luteína, neoxantina y violaxantina (Razungles et al. 1993, Kanasawud 1990).

Los fenoles volátiles son ciertos aldehídos y alcoholes que tienen origen en la transformación de determinados ácidos fenólicos presentes en la uva, como el benzaldehído, la vainillina, el alcohol bencílico y el 2-feniletanol. Este último, aunque se encuentra en la uva en pequeñas cantidades, se forma en gran cantidad a partir de la 2-fenilalanina durante la etapa de fermentación (Lamikanra et al, 1996). Estos compuesto se asocian a descriptores aromáticos agradables, como el aroma a cereza y caramelo del benzaldehído, el floral asociado a los alcoholes bencílico y feniletilo o el especiado de la vainillina.

La mayor parte de estos compuestos son comunes en casi todas las variedades, solo que se encuentran en distintas proporciones. Esta relación entre concentraciones, así como unas pocas sustancias asociadas a cultivares concretos, es lo que distingue el aroma típico de cada variedad de uva. Hay que tener además en cuenta que no todos los compuestos aromáticos contribuyen finalmente al aroma del vino, ya que no todos superan la concentración umbral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Para realizar este estudio, se empleó uva tinta de las variedades Syrah y Tempranillo, cultivadas en el "Marco de Jerez", (Jerez de la Frontera, Cádiz, España, **Figura 1**), zona caracterizada por su clima cálido. La uva fue recogida en la fecha determinada como de madurez tecnológica, es decir, la fecha óptima de vendimia desde el punto de vista industrial.

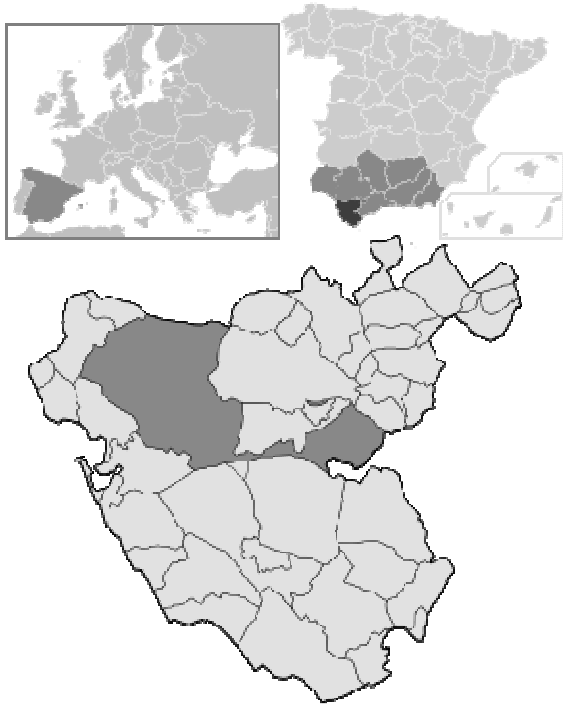


Figura 1. Situación geográfica del Marco de Jerez

Extracción de compuestos aromáticos

Para extraer los compuestos aromáticos presentes en la uva, se empleó una metodología consistente en simular el proceso de extracción que se lleva a cabo durante la fermentación de la pasta molturada. Así, para simular la molturación se empleó una batidora a baja velocidad, a fin de que no se produzca rotura de las pepitas. Tras varias pruebas, se seleccionaron el modelo, la velocidad y el tiempo de proceso adecuados. Para imitar las condiciones del medio fermentativo, se añadió la cantidad necesaria de etanol para ajustar el grado alcohólico al 13% y, cuando el pH del mosto superó el valor de 3,5 unidades, fue corregido hasta alcanzar este valor mediante la adición de ácido tartárico. Además, todas las muestras se ajustaron hasta 50 mg/L de anhídrido sulfuroso total. La pasta así corregida se introdujo en un matraz erlenmeyer de vidrio de 1 L y se mantuvo en agitación en un agitador orbital (Rotabit, Selecta) a 150 rpm durante 14 h, tras lo cual, la muestra se prensó y centrifugó (10.000 rpm, 10 min; Microfriger-BL, Selecta).

Una vez obtenido el extracto, para adecuar las muestras al método analítico empleado, y evitar interferencias por parte del etanol, los extractos se diluyeron hasta aproximadamente 2 ó 3 grados alcohólicos. Esto además conlleva una reducción del contenido en azúcares de la muestra y evita una posible obstrucción del cartucho en la etapa de extracción. Así, a 50 mL de cada extracto se le añadió la cantidad de agua destilada necesaria en cada caso. Posteriormente, a cada muestra se le adicionaron 0,4 mL de patrón interno (1-heptanol a concentración de 156 μg/L).

A continuación, se llevó a cabo una extracción en fase sólida, empleando un colector múltiple (*Visiprep-DL Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds*, SUPELCO INC, Bellefonte, PA), capaz de preparar simultáneamente 12 muestras, y cartuchos de tipo DSC-18 de 1 g (6 mL) (SUPELCO, Bellefonte PA, USA). En la etapa de extracción, se empleó la metodología propuesta por Di Stefano (1991), con algunas modificaciones. Así, los cartuchos se acondicionaron con 3 mL de metanol (Calidad HPLC, Panreac) y 5 mL de agua destilada. Posteriormente, se pasó la muestra, a un caudal de 3 mL/min. A continuación, el cartucho se lavó con 12 mL de agua y los compuestos volátiles, que quedaron retenidos durante la extracción, se eluyeron con 10 mL de diclorometano (Calidad GC, Panreac). Posteriormente, se secaron con sulfato sódico anhidro y las muestras eluídas se concentraron hasta 0,2 mL bajo corriente de nitrógeno para ser analizadas mediante cromatografía gaseosa.

Una vez extraídos los aromas libres, los compuestos glicosilados quedan retenidos en el cartucho. Para recogerlos, se eluyeron con 5 mL de metanol. A continuación, se añadieron 25 mL de tampón citrato-fosfato a pH 5, y enzima glucosidasa comercial, para liberar los compuestos aromáticos. (AR 2000, DSM, Holanda) en dosis de 3g/HL. Las muestras se mantuvieron en estufa a 40ºC durante 24h, tras lo cual, se les añadió patrón interno, y se les realizó de nuevo el proceso de extracción con diclorometano en cartuchos nuevos.

Análisis cromatográfico

Las muestras se analizaron en un equipo GC-MS modelo Voyager (Termoquest, Finnigan, Milán, Italia) con una columna Supelcowax 10 (60 m x 0,32 mm ID; 0,50 μm), con las siguientes condiciones de operación: temperatura del inyector y detector de 250°C; horno inicialemente a 40°C durante 5 min y una rampa de 2°C/min hasta llegar a 200°C durante 5 min. Las condiciones empleadas en el espectrómetro de masas fueron: modo de impacto electrónico a 70 eV; temperatura de origen y de la interface de 220 y 320°C, respectivamente; índice de barrido de 1 scan/s; adquisición de masas de 45-400 u.m.a. Con estas condiciones, se inyectaron 2 μL de muestra en modo splitless (40 s), empleando helio como gas portador (1 mL/min).

La identificación de los picos se basó en la comparación de los tiempos de retención y espectros de masa con patrones suministrados por Sigma-Aldrich y Fluka. En los casos en que los patrones no estuvieron disponibles, los picos se identifican por comparación con los espectros disponibles en la base de datos del programa Xcalibur (versión 1.1) y con los datos cromatográficos de la bibliografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total, se han determinado quince compuestos aromáticos pertenecientes a las tres familias aromáticas anteriormente citadas. En concreto, cinco derivados fenólicos, ocho terpenos, y dos compuestos norisoprenoides. De todos ellos, hay siete que son comunes a las dos variedades, y que aparecen tanto en forma libre como conjugada. En la **Tabla 1**, se encuentran diferenciados cuáles de los compuestos analizados aparecen en cada variedad, y los que no están presentes o no se detectan. En la misma tabla podemos se encuentra recogido el porcentaje en que cada compuesto aparece de forma conjugada, para las dos variedades estudiadas.

Como podemos observar, la relación entre compuestos libres y conjugados es variable según la familia aromática y la variedad estudiadas, pero en todos los casos es un porcentaje muy elevado. No obstante, hay tres de ellos que aparecen exclusivamente de forma conjugada, como son el citronelol y eucaliptol en la variedad Tempranillo, y el p-mentenol en la variedad Syrah. Pasar estos compuestos a su forma libre podría suponer incluir un toque cítrico y/o mentolado en el aroma de los vinos obtenidos. Hay otros ocho compuestos que sólo aparecen en una de las dos variedades y, en este caso servirían para diferenciarlas entre sí. En el caso de la variedad Tempranillo, estos son el eugenol, con olor a clavo, el citronelol, con un aroma más cítrico y fresco, y el eucaliptol, con olor a eucalipto. En la variedad Syrah, aparecen el guaiacol, de aroma especiado, el p-mentenol, de aroma mentolado, el óxido de linalool y el 2,6-dimetil-3,7-octadie-2,6-diol, con aromas florales, y la β-ionona, que aporta a la variedad Syrah un olor característico a violetas. En la **Figura 2**, aparece representado, para cada compuesto y variedad, el porcentaje para cada uno de ellos con respecto al máximo obtenido entre las dos variedades.

En la **Figura 3**, podemos observar el contenido en compuestos libres y conjugados para cada familia aromática y variedad, en tanto por ciento con respecto a la cantidad total máxima determinada, en este caso siempre en la variedad Syrah. Como se puede observar, el contenido total de cada una de las

familias es distinto para cada variedad, y mayor en todos los casos en la variedad Syrah, por lo que, presumiblemente esta variedad, una vez vinificada, presente un aroma más intenso que la Tempranillo. Es de destacar el alto contenido en compuestos norisoprenoides, tanto libres como conjugados presentes en la variedad Syrah, en relación a los que presenta la variedad Tempranillo. Este tipo de compuestos aporta aromas afrutados y florales muy característicos y apreciados de ciertas variedades tintas.

Tabla 1. Compuestos aromáticos determinados en cada variedad, libres y conjugados, agrupados por familias. Porcentaje de glicosilación (%).

	Tempranillo			**Syrah**		
	Libre	**Conjugado**	**%**	**Libre**	**Conjugado**	**%**
DERIVADOS FENOLICOS						
Alcohol feniletilo			81,43			72,41
Alcohol bencílico			89,33			88,29
Eugenol			60,60			
Guaiacol						75,32
Vainillina			21,40			29,83
TERPENOS Y DERIVADOS						
Citronelol			100,00			
trans-Geraniol			84,55			84,41
α-Terpineol			79,02			82,40
Limoneno			90,55			96,63
p-Ment-1-en-4-ol						100,00
Eucaliptol			100,00			
Oxido de linalol						88,05
2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol						92,97
NORISOPRENOIDES						
β-Damascenona			79,67			64,43
β-Ionona						85,44

Se encuentra. No se encuentra.

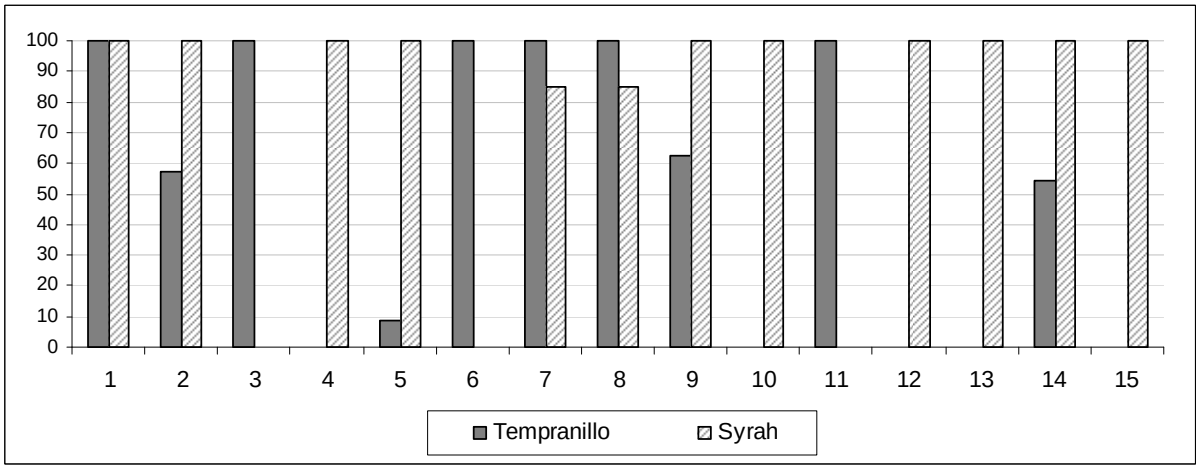


Figura 2. Contenido total por compuesto y variedad, en porcentaje con respecto al máximo obtenido por alguna de ellas. 1. Alcohol feniletilo; 2. Alcohol bencílico; 3. Eugenol; 4. Guaiacol; 5. Vainillina; 6. Citronellol; 7. trans-Geraniol; 8. α-Terpineol; 9. Limoneno; 10. p-Ment-1-en-4-ol; 11. Eucaliptol; 12. Oxido de linalool; 13. 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol; 14. β-Damascenona; 15. β-Ionona.

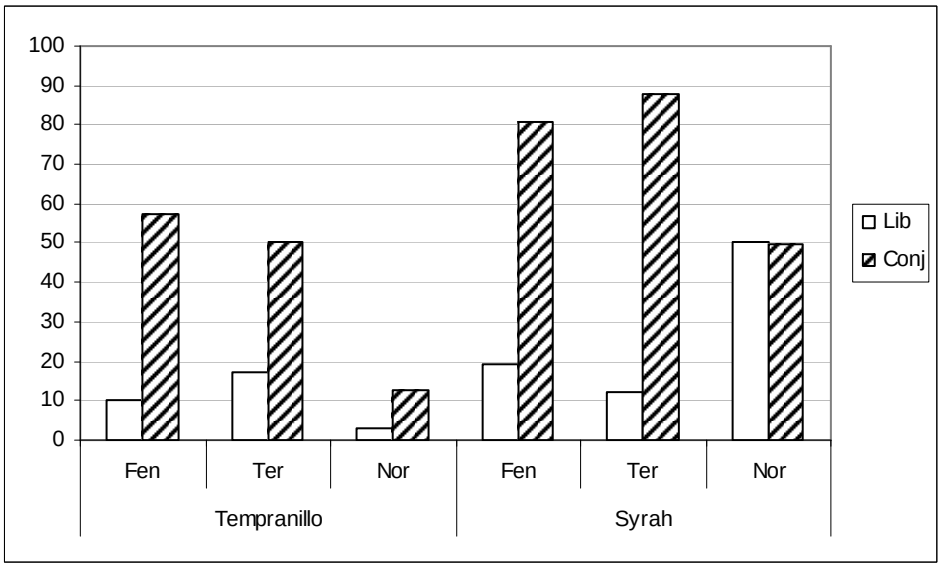


Figura 3. Contenido en compuestos libres (Lib) y conjugados (Conj) para cada variedad, agrupados por familias aromáticas. Fen: derivados fenólicos; Ter: terpenos; Nor: norisoprenoides.

También la proporción existente entre las distintas familias aromáticas es distinta según la variedad estudiada, por lo que sus vinos presentarán distintos perfiles aromáticos. Esto se verá acentuado debido al hecho de que haya ciertos compuestos presentes en sólo alguna de ellas, como hemos comentado anteriormente. Es de resaltar que en ambas variedades el contenido en precursores aromáticos es siempre mayor que en aromas libres, por lo que el perfil aromático de los vinos de ambas variedades podría realzarse en gran medida aplicando las tecnologías adecuadas para liberar mayor cantidad de aromas. Además, si tenemos en cuenta que la fracción libre puede que no alcance por si sola la denominada concentración umbral, es posible que al liberar parte o la totalidad de la fracción conjugada, aparezcan aromas que de otra manera era imposible apreciar.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que resulta muy interesante el estudio aromático de cada variedad de uva para determinar cuáles son los compuestos característicos de cada una de ellas y en que proporción se encuentran. Esta información puede ser empleada a la hora de decidir elaborar vinos monovarietales, o bien elaborar vinos empleando dos o más variedades que se complementen de alguna manera. Además, es muy interesante conocer el potencial aromático de cada variedad, es decir los aromas que aparecen en forma conjugada, ya que su liberación puede suponer tanto un aumento de la intensidad aromática, como la aparición de nuevos aromas, bien debido a que dicho compuesto no aparecía en forma libre, o bien debido a que aparecía en forma libre, pero no en concentración suficiente como para alcanzar el umbral de percepción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Di Stefano R. 1991. Proposition d'une méthode de préparation de l'echantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. Bull. OIV, 721-722 :219-223.

Ferreira V. 2001. Los aromas del vino. Curso: Temas actuales de interés enológico. Universitat Rovira I Virgili, Tarragona.

Hidalgo J. 2006. La calidad del vino desde el viñedo. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Kanasawud P, Crouzet JC. 1990. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of β-carotene in aqueous medium. β-carotene degradation. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 38, 237-243.

Lamikanra O, Grimm CC, Rodin JB, Inyang ID. 1996. J. Agric. Food Chem. 44, 1111-1115

Razungles A, Günata Z, Pinatel S, Baumes R, Bayonove C. 1993. Étude quantitaive de composés terpéniques, norisoprénoides et de leurs précurseurs dans diverses varietés de raisins. Science des aliments 13, 59-72.

Efecto de distintos hidrocoloides sobre transiciones térmicas y movilidad molecular en masa de harina de trigo

Effect of different hydrocolloids on thermal transitions and molecular mobility in wheat flour dough

Linlaud, N[1] Puppo, MC[1,2] Ferrero, C[1]

(1)CIDCA-Fac. Ciencias Exactas-UNLP-CCT La Plata (CONICET), 47 y 116 La Plata, Buenos Aires
(2)Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP, 60 y 119 La Plata, Buenos Aires, Argentina.
nlinlaud@cidca.org.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se analizó la influencia de hidrocoloides sobre la gelatinización de almidón, y la cantidad de agua congelable a través de calorimetría diferencial de barrido. Se estudió también la movilidad molecular del sistema a través de ensayos de tiempo de relajación, λ, por resonancia magnética nuclear (^{1}H spin-spin RMN). Se utilizaron como sistemas modelo masas frescas y liofilizadas, preparadas a partir de harina de trigo comercial (tipo 000, CAA) con distintos hidrocoloides (1,5 g/100g harina): goma guar (GG), goma xántica (GX), goma garrofín (LBG), pectina de alto metoxilo (P) y la mezcla de garrofin y xántica 50:50 (LBG+GX) cuyos valores de absorción farinográfica (A) fueron 62,1%, 66,4%, 66%, 62%, 65,5%, respectivamente. Se evaluó la gelatinización del almidón obteniéndose temperatura inicial (Ti), de pico (Tp), final (Tf) y la entalpía del proceso. En las masas frescas elaboradas con agua farinográfica se observó una disminución de la Tf respecto al control con el agregado de LBG+GX, LBG y GX. Las masas liofilizadas y rehidratadas en relación sólido:agua 1:0,5, presentaron un corrimiento de ambos picos del termograma, cuyas Tp (TpI y TpII) se vieron incrementadas por el agregado de hidrocoloides en la mayoría de los casos. La Tf aumentó significativamente con LBG+GX, LBG, GX y GG. Las variaciones en las temperaturas observadas se pueden relacionar con la disminución de cantidad de agua disponible para la gelatinización cuando la muestra contiene hidrocoloide.

El porcentaje de agua congelable de las masas frescas aumentó significativamente respecto al control cuando se agregó la mezcla LBG+GX.

De los datos obtenidos por RMN se observó que en las masas la movilidad molecular aumentó en forma creciente respecto a la masa control con el agregado de LBG, GX y LBG+GX, no varió con el agregado de GG y disminuyó significativamente con P.

Estos resultados sugieren que los hidrocoloides interactúan con los componentes de la masa en forma diferente según su estructura, generando en particular un cambio en la disponibilidad de agua para procesos como la gelatinización del almidón y la congelación y una alteración en la movilidad de los protones del sistema, probablemente relacionada con una reestructuración de la matriz. El estudio más detallado de estos cambios es relevante en la masa panaria dado el rol de las interacciones del agua con proteínas de gluten y almidón.

ABSTRACT

In the present work, the influence of hydrocolloids on starch gelatinization and freezable water was evaluated by differential scanning calorimetry- The molecular mobility of the system was also studied by RMN relaxation assays (^{1}H spin-spin RMN). Guar gum (GG), xanthan gum (XG), locust beam gum (LBG), high methoxyl pectin (P) and the mixture of locust beam gum and xanthan gum 50:50 (LBG+XG) were employed at a 1.5 g/100g flour level. Farinographic water absorption (A) values of blends were 62.1 %, 66.4 %, 66.0 %, 62.0 %, 65.5 %, respectively. A commercial wheat flour was used. The following starch gelatinization parameters were obtained: onset temperature (Ti), peak temperature (Tp), final temperature (Tf) and gelatinization enthalpy. In fresh doughs, obtained with the farinographic amount of water, a decrease in Tf, respect to control, was observed when LBG+GX, LBG and GX. were added. Lyophilized and rehydrated doughs (solids:water = 1:0.5) exhibited a shift of both peaks in thermograms, with the Tp (TpI y TpII) values increased in most cases because of

hydrocolloid addition. Tf significantly increased by addition of LBG+GX, LBG, GX and GG. The variations in temperature can be related to the decrease in the quantity of water available for the gelatinization process when the sample contains hydrocolloids. The percentage of freezable water of fresh dough significantly increased respect to control with the addition of the mixture LBG+XG. By NMR assays, it could be observed that the molecular mobility increased with the addition of LBG, XG and LBG+XG. No differences in relaxation time were observed when GG was added but a significant decrease was observed when P was incorporated. From these results, it can be concluded that hydrocolloids can interact with the other dough components in different ways according to their structure, thus inducing a change in water availability for processes like starch gelatinization and freezing. A change in protons mobility was observed, probably related to restructuring of the system matrix. A more detailed study of these changes is relevant in bread dough taking into account the role of the interactions among water, gluten proteins and starch.

PALABRAS CLAVE: *hidrocoloides, movilidad molecular, disponibilidad de agua, masa panaria.*

KEYWORDS: *hydrocolloids, malecular mobility, bread dough, water availability.*

INTRODUCCIÓN

En la panificación, los componentes de la masa pueden sufrir diversas transiciones como la gelatinización del almidón y en el caso de la utilización de masas congeladas, la formación de hielo. Estas transiciones pueden verse afectadas por el agregado de aditivos que, por su naturaleza, influyen en la disponibilidad de agua del sistema. La absorción de agua de una harina es un factor importante en la panificación ya que ella contribuirá a la calidad del producto, su vida útil y el rendimiento del proceso. Durante el amasado la harina, el agua y otros ingredientes son mezclados hasta alcanzar un desarrollo óptimo de la red de gluten. Para ello, la red debe estar bien hidratada y las partículas de almidón inmersas en ella deben estar distribuidas uniformemente. La movilidad del agua en la masa es un parámetro importante ya que está relacionado directamente con la calidad de la red de gluten (Leung y col, 1979). Entre los parámetros que inciden en la absorción de agua se encuentran el grado de molienda, calidad y cantidad de gluten, porcentaje de almidón dañado, presencia de fibra. Como parte de esta última se puede considerar tanto la fibra endógena (fundamentalmente pentosanos) como la agregada como mejorador (polisacáridos de distinto origen). Los hidrocoloides son polisacáridos de diferentes orígenes con alto peso molecular cuya característica principal es su capacidad de retener agua. Su alta hidrofilicidad puede afectar en forma significativa la absorción de agua de la harina (Linlaud y col, 2009). Su presencia en productos de panificación puede modificar la gelatinización del almidón, extender la vida útil del producto, puede ser usado como reemplazo de grasa, como sustituto del gluten y como fuente de fibra dietaria (Guarda y col., 2004, Rosell y col., 2001). El efecto de los hidrocoloides en las propiedades funcionales de la masa y la calidad del pan depende de la naturaleza, origen y tamaño de las partículas de los hidrocoloides y la dosificación incorporada en la formulación de la masa (Ribotta y col., 2005).

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) analizar la influencia de hidrocoloides sobre la gelatinización de almidón y la cantidad de agua congelable a través de calorimetría diferencial de barrido (DSC); b) estudiar la movilidad molecular del sistema a través de ensayos de tiempo de relajación mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la harina y mezclas utilizadas

Se utilizó una harina comercial tipo 000 según el CAA provista por Molino Campodónico (La Plata, Argentina). El contenido de proteína total de esta harina fue de 13,1%, el de gluten de 9,7% y la relación gluten húmedo/gluten seco de 2,77, cenizas, 0.705% y humedad 14.89%. Se utilizaron hidrocoloides comerciales como goma guar (GG), goma xántica (GX), pectina de alto metoxilo (P), goma garrofin (LBG) y mezcla de goma garrofín y xántica (50:50) (LBG+GX) (Saporiti S.A., Argentina) en concentración 1,5 % en base a harina. Los valores de absorción farinográfica (A) para las harinas aditivadas fueron 62,1% (con GG), 66,4% (con GX), 62,0% (con P), 66,0% (con LBG) y 65,5% (con LBG+GX). El valor de A para el control (harina sin aditivar) fue de 62,0%.

Elaboración de las masas

Para la preparación de las masas se empleó la siguiente fórmula: cada 100 gramos de harina se utilizaron 2 g de NaCl, los hidrocoloides en la concentración indicada y la cantidad de agua según la absorción farinográfica de cada mezcla o según absorción farinográfica de la masa control (agua constante). Para evitar cambios durante los ensayos no se utilizó levadura. Las masas se prepararon en la amasadora de un microfarinógrafo de Brabender con capacidad de 10 g.

El tiempo de amasado fue de 9 minutos. Luego se dejó reposar la masa 10 minutos a temperatura ambiente, cubierta con film para evitar deshidrataciones.

Caracterización de las masas

Gelatinización del almidón

Pequeñas cantidades de las masas obtenidas se liofilizaron y rehidrataron hasta obtener una relación sólido:agua de 1:0,5. Se colocó una pequeña cantidad de masa rehidratada (10-14 mg) en una cápsula de aluminio la cual fue sellada herméticamente con una prensa. En otra serie de ensayos se utilizó masa con cantidad de agua variable, ajustada según valores farinográficos. Como referencia se utilizó una cápsula vacía. Se realizó un calentamiento controlado desde una temperatura inicial de 20 ºC hasta alcanzar 130 ºC a una velocidad de 10 ºC/min en un calorímetro Q100 (TA Instruments, USA). De los termogramas obtenidos (flujo calórico en función de la temperatura) se determinaron las temperaturas inicial (Ti), final (Tf) y de pico (TPI, TPII) y las entalpías de gelatinización utilizando el software del equipo. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resonancia magnética nuclear

Se analizó la movilidad molecular del sistema a través de ensayos de tiempo de relajación (T2) por 1H spin-spin RMN. En el caso particular de las masas esta movilidad está determinada en gran medida por la cantidad de agua agregada y las interacciones entre ésta y los componentes hidrofílicos de la masa. Los núcleos de hidrogeno son excitados por pulsos de pocos milisegundos y cuando el pulso cesa los núcleos vuelven a su estado original emitiendo una señal. La amplitud de la señal es proporcional al número de núcleos de hidrógeno en la muestra y decrece en función del tiempo.

Se elaboraron las masas según la técnica descripta, con agua farinográfica y con agua constante. Cada masa se colocó en un tubo de vidrio de10 mm de diámetro con la ayuda de una varilla hasta una altura de 3 cm aproximadamente y se tapó para evitar la deshidratación. Los tubos se colocaron en la celda del equipo (Bruker, USA) y se realizó la medida a temperatura ambiente. Se obtuvieron las curvas de decaimiento de la señal en función del tiempo de las masas con el agregado de hidrocoloide las cuales se ajustaron con la ecuación (1) y se obtuvieron los tiempos de relajación para cada masa (Tabla 2).

$$I = Ae^{(-t/\lambda)} \quad (1)$$

donde: I intensidad de la señal, λ tiempo de relajación, A factor pre exponencial, t tiempo

Los ensayos se realizaron por triplicado.

Porcentaje de agua congelable

Para este ensayo se utilizó masa fresca elaborada con los hidrocoloides en una concentración de 1,5% y agua agregada según el valor de absorción farinográfica. Se colocó una pequeña cantidad de masa (10-14 mg) en una cápsula de aluminio previamente pesada la cual fue sellada herméticamente con una prensa. La cápsula se colocó en la celda del equipo junto a una cápsula vacía sellada como referencia. Se realizaron las corridas por duplicado en un calorímetro Q100 (TA Instruments, USA). La muestra fue equilibrada a 20 ºC durante 5 minutos luego se enfrió hasta -60 ºC manteniéndose a esa temperatura durante 60 minutos. Se realizó luego un calentamiento a 2 ºC/ min hasta llegar a una temperatura final de 20 ºC. Se obtuvieron las entalpías de fusión del hielo formado y se calcularon los porcentajes de agua congelada en cada muestra. Los ensayos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gelatinización del almidón

En la **Figura 1** se muestran los termogramas de las muestras analizadas, para una relación sólidos:agua 1:0,5. El pico I (PI) y el pico II (PII) corresponden a la gelatinización de almidón, que presenta el desdoblamiento característico debido a la restricción en la cantidad de agua disponible para el proceso (Biliaderis, 1992). El tercer pico corresponde a la disociación del complejo amilosa-lípido. La **Tabla 1** muestra los valores obtenidos de temperaturas y entalpías del proceso. De acuerdo a estos

resultados se observó que con GG, LBG y LBG+GX aumentó significativamente TPI mientras que TPII fue afectada por el agregado de GX, LBG y LBG+GX. La Tf se vio significativamente incrementada por todas las gomas excepto P. Este corrimiento de temperaturas y en particular de Tf, se puede relacionar con la disminución de cantidad de agua disponible en las muestras con hidrocoloide (Ferrero y col, 1996). La entalpía total del proceso no presentó diferencias significativas respecto al control.

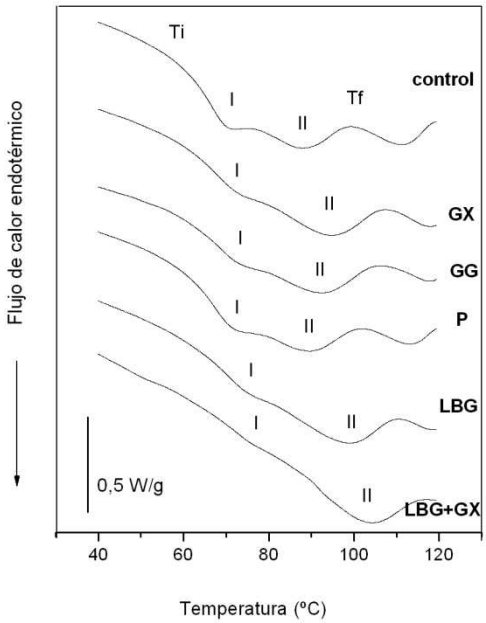


Figura 1. Termogramas obtenidos de las masas liofilizadas y rehidratadas (relación sólidos:agua 1:0,5) sin (control) y con 1,5% de goma

Tabla 1. Temperatura de los picos, áreas totales bajo las curvas de los termogramas de las masas liofilizadas.

Masa	Ti (ºC)	TPI (ºC)	TPII (ºC)	Tf (ºC)	Area total (J/g)
control	59,84 a	70,87 a	90,53 ac	100,78 a	5,75 ab
GX	59,79 a	72,57 ab	95,67 b	107,54 b	5,69 ab
GG	60,83 a	73,88 bc	92,87 ab	105,99 b	4,24 a
P	60,76 a	71,11 a	89,19 c	99,75 a	5,69 ab
LBG	61,99 a	75,79 c	100,84 d	112,61 c	6,18 b
LBG+X	61,69 a	76,32 c	103,14 d	113,99 c	5,35ª b

Letras distintas dentro de un mismo grupo corresponden a valores significativamente distintos ($p < 0,05$).

Cuando se gelatinizaron masas preparadas con cantidad farinográfica de agua no se observó este efecto de corrimiento en la Tf (resultados no mostrados).

Movilidad molecular a través de ensayos de relajación RMN

Los tiempos de relajación obtenidos para cada masa son mostrados en la **Tabla 2**. En el caso de las masas hechas con agua farinográfica se observó que el tiempo de relajación λ, relacionado con la movilidad molecular, aumentó significativamente respecto a la masa control con el agregado de LBG, GX y LBG+GX, no observándose variaciones con el agregado de GG. En este caso se encontró una correlación positiva entre la cantidad de agua agregada y el tiempo de relajación ($R^2 = 0,6306$). Por otro lado, para las masas preparadas con agua constante (utilizando la absorción farinografica de la masa control) no se observaron diferencias significativas respecto al control, excepto en la muestra con P. Con el agregado de P disminuyó la movilidad molecular significativamente respecto al control tanto para las masas preparadas con la cantidad de agua farinográfica correspondiente como para las preparadas con la cantidad de agua del control. En un trabajo previo, Linlaud y col. (2009) informaron que las estabilidades farinográficas de las masas con 1,5 % de hidrocoloide decrecían en el siguiente orden: GG (27 min) > GX (21 min) >control (19.5 min)>LBG (17 min)> LBG+GX (15 min)> P (9.5

min). De acuerdo a esto se observa que la masa con GG (la más estable) absorbe la misma cantidad de agua (62 %) que la aditivada con P (la menos estable) y según lo mostrado en **Tabla 2**, ambas masas presentan tiempos de relajación que no son significativamente diferentes. Las masas con GX, LBG y la mezcla de LBG+GX son las que más agua absorben lo que podría contribuir a la mayor movilidad molecular encontrada. En estos casos, la estabilidad no resulta muy diferente del control salvo para la mezcla LBG+GX. Esto indicaría no hay una relación directa entre la cantidad de agua y movilidad molecular con la estabilidad de la masa; ésta dependerá finalmente de la forma en que el hidrocoloide se pueda integrar a la matriz y en particular a la red proteica, fortaleciéndola como en el caso de GG o debilitándola como en el caso de P.

Tabla 2 Tiempos de relajación (λ) de las masas.

	λ (milisegundos)	
Masa	**Agua farinográfica**	**Agua constante**
Control	12,9 cd	12,9 a
GX	14,5 a	13,0 a
GG	12,4 bc	12,4 ab
P	11,5 b	11,6 b
LBG	13,8 ad	12,7 a
LBG+GX	14,5 a	13,4 a

Letras distintas dentro de un mismo grupo corresponden a valores significativamente distintos (p< 0,05).

Porcentaje de agua congelable

En la **Tabla 3** se muestran los porcentajes de agua congelable obtenidos para cada masa (preparadas con agua farinográfica). Se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de agua congelable en presencia de hidrocoloides, siendo este aumento significativo respecto al control con el agregado de la mezcla LBG+GX. Comparando los valores de **Tablas 2** y **3** se observa que las masas (agua farinográfica) con mayor movilidad son las que presentan también un mayor porcentaje de agua congelable. Esto indicaría que cuando se agrega agua en cantidad suficiente (agua farinográfica) en presencia de hidrocoloide se genera al amasar una matriz donde el agua estaría más lábil o disponible que en el control. Esta mayor disponibilidad explicaría la ausencia de corrimiento en las temperaturas finales (Tf) de gelatinización si se las compara con las masas preparadas con restricción de agua (agua farinográfica del control).

Tabla 3 Agua congelable (%) de las masas

Masa	**% Agua congelable**
Control	57,3 a
GX	61,5 ab
GG	58,1 a
P	59,3 ab
LBG	61,1 ab
LBG+GX	63,7 b

Letras distintas dentro de un mismo grupo corresponden a valores significativamente distintos (p< 0,05).

CONCLUSIONES

Los hidrocoloides generan una restricción de la disponibilidad de agua en la masa, que puede afectar procesos como la gelatinización del almidón cuando se trabaja con niveles constantes de agua. Sin embargo, en masas con hidrocoloide preparadas de acuerdo a la absorción farinográfica de cada muestra, se observaron en general mayores tiempos de relajación, relacionados con una mayor movilidad molecular y un mayor porcentaje de agua congelable. Esto indicaría la formación, en presencia de cantidad suficiente de agua, de una matriz en donde ésta se encuentra más disponible, lo

que se relacionaría con las interacciones que pueden establecer hidrocoloides, proteínas y almidón entre sí así como su respectiva interacción con el agua presente. La diferente estructura de los hidrocoloides, que influye en el tipo de interacciones que pueden establecer, explicaría su diferente efecto al ser incorporados a la masa.

AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo pudo realizarse gracias a la asistencia financiera de los proyectos: PICTR 2003-00286 (ANPCyT) y CONICET-PIP 6353

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biliaderis, C.,G., 1992. Structures and phase transitions of starch in food systems. Food Technology, 46: 98-109.

Ferrero, C., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. 1996. Effect of hydrocolloids on starch thermal transitions, as measured by DSC. Journal of Thermal Analysis, 47: 1247-1266.

Guarda, A., Rosell, C.M., Benedito, C., Galotto, M.J., 2004. Different hydrocolloids as bread improversand antistalling agents. Food Hydrocolloids, 18: 241-247.

Leung, H, K., Magnuson, J, A., and Bruinsma, B. L., 1979. Pulsed NMR study of water mobility in flour dough. Journal of Food Science, 44: 1408-1411.

Linlaud, N.E., Puppo, M.C., Ferrero, C. 2009. Effect of hydrocolloids on water absorption of wheat flour and farinograph and textural characteristics of dough. Cereal Chemistry. En prensa

Ribotta P.D., Ausar S.F., Beltramo D.M., León A.E. 2005. Interactions of hydrocolloids and sonicated-gluten proteins. Food Hydrocolloids, 19: 93-99.

Rosell, C, M., Rojas, J.A., Benedito de Barber, C,. 2001. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. Food Hydrocolloids, 15: 75-81.

Análisis de fiambres comerciales: detección de especies cárnicas y de proteínas agregadas utilizando SDS-PAGE

Commercial Cold cuts analysis: detection of meat species and extrinsic proteins using SDS-PAGE

López L, Greco C, Binaghi J, Mambrín C y Valencia M

Cátedra de Bomatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Junín 956. 2do. Piso. Buenos Aires. Argentina.
e-mail: laulop@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Objetivos: establecer la aplicabilidad de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para detectar las especies cárnicas utilizadas y las proteínas extrínsecas agregadas en fiambres comerciales de diferente composición. Determinar cualitativamente almidón en las muestras analizadas. Materiales y Métodos: Se analizaron quince fiambres comerciales. Para la identificación de la especie cárnica y de los ingredientes proteicos se realizó el desgrasado/deshidratado de las muestras con acetona; la extracción de las proteínas totales presentes con buffer Tris ClH 1,5 M que contiene dodecilsulfato de sodio y 2-mercaptoetanol (2-ME) o con isopropanol 55º + 2-ME (solvente selectivo para proteínas lácteas) y la separación electroforética de las proteínas extraídas en placas de gel de poliacrilamida según el sistema de Laemmli. La detección de almidón se realizó según metodo AOAC 935.49. Resultados y discusión: los fiambres comerciales analizados declaraban en su composición diferentes especies cárnicas: carne vacuna, carne porcina, pollo, pavo o carne porcina y pollo o carne vacuna y carne porcina. Además algunos fiambres declaraban soja, plasma o proteínas lácteas en su composición. En la mayoría de las muestras analizadas se identificaron las especies cárnicas declaradas: carne porcina, carne vacuna, carne de pavo, carne de pollo o mezclas de dos especies cárnicas (vacuna/ porcina y porcina/pollo). Sólo una muestra que declaraba pavo tenía pollo en su composición. Con respecto a las proteínas extrínsecas agregadas se detectó soja en ocho de las muestras analizadas, dos de ellas no lo declaraban. Se detectó plasma o leche en dos muestras que lo declaraban. También se detectó plasma en una muestra que no lo declaraba. No se detectaron proteínas de suero de queso ni caseinato, declaradas en los rótulos. En el primer caso, el suero de queso podría haber sido agregado por debajo del límite de detección del método (0,8 % de proteína de suero); en el segundo caso correspondería a un error de rotulado por parte de un supermercado ya que se trataba de un jamón de primera marca y calidad en el cual el agregado de caseinato no está permitido. La determinación de almidón resultó positiva o positiva débil en diez de las muestras analizadas; en tres de ellas este ingrediente no estaba declarado en los respectivos rótulos. Conclusiones: la metodología electroforética SDS- PAGE es una herramienta útil para la detección de diferentes especies cárnicas solas o en mezclas, así como para la detección de diferentes proteínas extrínsecas en fiambres comerciales. Esta metodología junto con la detección cualitativa de almidón permitirían corroborar los ingredientes proteicos y el almidón declarados en los rótulos de fiambres comerciales.

ABSTRACT

Objective: evaluation of the feasibility of using SDS-PAGE to detect different meat species and extrinsic proteins used in commercial cold cuts and determine starch in the analysed samples. Methods: 15 commercial cold cuts were analysed. The samples were defatted and dried with acetone to identify meat species and protein ingredients. Proteins were extracted with buffer Tris ClH 1,5 M with sodium dodecilsulphate and 2-mercaptoethanol (2-ME) (total proteins) or with isopropanol 55º + 2-ME (selective solvent for dairy proteins). Separation in polyacrilamide slab gel electrophoresis with Laemmli system (SDS PAGE) were used. Method AOAC 935.49 was used for the detection of starch. Results and discussion: fifteen commercial cold cuts were analysed. Their package label declared different meat species such as bovine, porcine, chicken, turkey, or porcine with

chicken or bovine with porcine meat. Also, some cold cuts declared soy, plasma or milk proteins in their composition. In most samples the meat species identified were the same as the ones declared in the label. Only one sample that declared turkey had chicken. In regard to the extrinsic protein content, soy proteins were detected in eight samples, two of them did not declare these proteins. Plasma or milk proteins were detected in two samples that declared them. Also, plasma was detected in one sample that did not declare it. Whey and caseins proteins declared in the labels of two samples could not be detected. In one of them whey proteins might had been added below the detection limit of the method (0,8 % of whey protein). In the other sample a possible error of labelling at the supermarket might had occured because this sample was a high quality cooked ham and in this type of product the use of caseins is not allowed. The detection of starch was positive or weak positive in ten of the analysed samples; in three of them this ingredient was not declared in the respective label. Conclusions: In addition to the detection of different extrinsic proteins in commercial cold cuts, the SDS- PAGE is an useful methodology for the detection of different meat species alone or in mixtures. This methodology with the cualitative detection of starch would corroborate the presence of protein ingredients and starch declared in the label of cold cuts.

PALABRAS CLAVE: *fiambres, SDS-PAGE, especies cárnicas, proteínas extrínsecas, almidón.*

KEYWORDS: *cold cuts, SDS-PAGE, meat species, extrinsic proteins, starch.*

INTRODUCCIÓN

A partir de octubre de 2007 el Código Alimentario Argentino (CAA) establece parámetros de calidad para ciertas salazones cocidas, jamón, paleta de cerdo y lomo de cerdo y para algunos chacinados, fiambre cocido de pata de cerdo, fiambre cocido de paleta de cerdo, fiambre cocido de lomo de cerdo, fiambre cocido de... (nombre/s de la/s especie/s) para emparedados. En las tres salazones mencionadas no permite el agregado de proteínas agregadas ni otros extensores, establece reacción de almidón negativa y una relación humedad/proteínas de 4,65; 5,00 y 4,50; respectivamente. Para los chacinados mencionados establece que puede contener proteínas de soja agregadas según el límite para chacinados (máximo 2 % de aislado de soja) y permite el agregado de almidón según el límite para chacinados (máximo 10 %), estableciendo además para los siguientes productos: fiambre cocido de pata de cerdo, fiambre cocido de paleta de cerdo y fiambre cocido de lomo de cerdo, una relación humedad/proteínas de 6,50 y para el producto fiambre cocido de... (nombre/s de la/s especie/s) para emparedados una relación humedad/ proteínas de 8,0. Para el último producto mencionado el CAA establece que de acuerdo al contenido porcentual de las distintas carnes declaradas en la monografía la denominación de venta será “fiambre cocido de... (nombre/s de la/s especie/s) para emparedados” debiéndose completar con la enumeración en orden porcentual decreciente de la totalidad de las especies animales de faena permitida que componen el producto. (CAA 2009).

El hecho de que el CAA permita el agregado o no de determinados ingredientes proteicos y que defina un producto que pueda ser elaborado con diferentes especies cárnicas hace necesario contar con metodología que permita la detección de diferentes ingredientes proteicos y las distintas especies cárnicas utilizadas a los fines de verificar lo declarado en los respectivos rótulos.

En trabajos previos, utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, se estableció el nivel de detección de proteínas de soja en mezcla con carne vacuna utilizando solución extractiva de proteínas totales, y de harina de trigo, leche en polvo y caseinato en mezcla con carne vacuna utilizando un solvente selectivo para prolaminas y caseínas, el isopropanol 55% + 2% 2-mercaptoetanol (ISO 55º + 2-ME) (Olivera Carrión 1988, Olivera Carrión y Valencia 1990a y b, López 2000, López y Valencia 2001). Posteriormente se realizó la puesta a punto de la detección y cuantificación de proteínas extrínsecas en jamones cocidos (López et al 2006) y se realizó entre noviembre de 2005 y mayo de 2007 un relevamiento de 21 productos comerciales elaborados exclusivamente con carne de cerdo con el fin de verificar el cumplimiento de la legislación vigente. (López et al 2007)

La metodología electroforética resultó también de utilidad para la detección de mezclas carne porcina /carne vacuna en productos crudos (salchichas, longanizas y chorizos frescos), permitiendo mediante el análisis de sistemas modelo la cuantificación de la proporción carne porcina/ carne vacuna en productos comerciales. (López et al 2009)

En el presente trabajo se evaluó la aplicabilidad de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para detectar las especies cárnicas utilizadas y las proteínas extrínsecas agregadas en fiambres comerciales de diferente composición. Además se verificó la presencia de almidón a los fines de corroborar su declaración en los respectivos rótulos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron quince fiambres comerciales, un fiambre de cerdo cocido (muestra 1), tres jamones cocidos (muestra 2, 14 y 15), un pastrón (muestra 3), tres pechugas de pavo (muestras 4, 9 y 11), un fiambre de pavo (muestra 7), tres fiambres cocidos para emparedados (muestras 5, 6 y 12), dos fiambres de pollo (muestras 8 y 10) y un salchichón con jamón (muestra 13). Las muestras fueron analizadas entre diciembre de 2007 y octubre de 2008. Los ingredientes proteicos y el almidón declarados se presentan en la **Tabla 1** de Resultados y Discusión.

Determinaciones analíticas

Almidón cualitativo

Método AOAC 935.49. (AOAC 2000).**Análisis electroforético**

Se identificaron las proteínas presentes por SDS-PAGE. Se utilizaron como controles de las muestras analizadas carne vacuna, carne porcina, pollo, pavo, jamón cocido sin proteínas agregadas, aislado de soja, caseinato, suero lácteo y plasma bovino.

Desgrasado/deshidratado de las muestras. El desgrasado/deshidratado de las muestras previamente molidas se realizó con acetona. Se suspendió la muestra en relación 1/10 con acetona y se homogeneizó en VirTis modelo 23 a baja velocidad durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. Las muestras fueron desgrasadas con acetona dos veces.

Extracción de proteínas totales. Se utilizó buffer Tris-ClH 0,0625M (pH: 6,8) con 3 % de SDS y 2 % de 2-ME (solución extractiva de proteínas totales). Se pesaron 30 mg de producto cárnico o de materia prima proteica control desgrasado/deshidratado con acetona y se extrajeron con 2 mL de solución extractiva por calentamiento en baño de agua a 100° C durante 5 minutos con agitación y posterior centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Este solvente de extracción permite detectar las proteínas de las diferentes especies cárnicas y además proteínas de soja, plasma y suero lácteo. (López et al 2006).

Extracción de caseínas. Se realizó con isopropanol 55º + 2% de 2-mercaptoetanol (ISO 55º + 2-ME) por agitación en VirTis. Las mezclas se homogeneizaron en VirTis modelo 23 a baja velocidad durante 5 minutos, se dejaron en reposo 1 hora y se agitaron nuevamente en homogenizador durante 5 minutos. Luego se centrifugaron 15 minutos a 2500 rpm. De cada producto cárnico se pesaron 350 mg de muestra desgrasada/deshidratada con acetona y 50 mg de caseinato control. En todos los casos la extracción se efectuó con 2 mL de ISO 55º + 2-ME. Este solvente de extracción permite detectar caseínas.

Electroforesis. Se utilizó básicamente el sistema de Laemmli (Laemmli 1970). Se trabajó con geles de poliacrilamida en sistema discontinuo, con gel de separación (poro fino) y gel de concentración (poro grueso). El gel de separación se preparó con 10 % de acrilamida en una solución 1,5 M Tris-ClH con 0,4 % de SDS (pH: 9,2). El gel de concentración se preparó con 3 % de acrilamida en una solución 0,5 M Tris-ClH con 0,4 % de SDS (pH: 6,8).

La electroforesis se realizó con equipo Mini Protean® Tetra cell de BioRad a 180 V durante 45 minutos. La tinción se realizó con Coomassie Brilliant Blue R 250. Las resoluciones proteicas obtenidas se densitometraron con equipo Shimadzu Dual - Wavelength Chromatogram Scanner Model CS - 910. Se trabajó con longitud de onda de máxima absorción de 550 nm y de mínima absorción utilizada como referencia de 400 nm. La adquisición de datos se realizó con el programa Chromatography Station CSW de DataApex Ltd. (López et al 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan los ingredientes proteicos y el almidón declarados en los respectivos rótulos y los resultados obtenidos para las 15 muestras comerciales analizadas.

Tabla 1. Ingredientes proteicos y almidón declarados en los respectivos rótulos y resultados obtenidos en el análisis de 15 muestras comerciales de diferente composición.

MUESTRAS	INGREDIENTES PROTEICOS Y ALMIDÓN DECLARADOS	ESPECIES CARNICAS DETECTADAS	PROTEINAS EXTRÍNSECAS DETECTADAS	DETECCIÓN DE ALMIDÓN
1	Carne porcina, almidón	Carne porcina	Proteínas de soja	Positivo
2	Cerdo, caseinato de sodio	Carne porcina	---	Negativo
3	Pecho vacuno, proteína aislada de soja, suero de queso deshidratado	Carne vacuna	Proteínas de soja	**Positivo**
4	Pechuga de pavo	Pavo	---	Negativo
5	Carne porcina, carne vacuna, plasma bovino, suero de queso y proteínas de soja	Carne porcina (la presencia de plasma dificulta la detección de carne vacuna)	Proteínas de soja y plasma	**Positivo**
6	Carne de cerdo, pollo, soja, leche descremada	Carne porcina y pollo	Proteínas de soja	**Positivo**
7	Pavo y soja, almidón	Pollo	Proteínas de soja	Positivo
8	Pollo y soja, almidón	Pollo	Proteínas de soja	Positivo
9	Pavo	Pavo	---	**Positivo**
10	Pollo y almidón de trigo	Pollo	---	Positivo
11	Pavo	Pavo	---	Negativo
12	Carne vacuna, soja, plasma y leche, almidón	Carne vacuna	Proteínas de soja y caseínas	Positivo
13	Carne vacuna y carne porcina, jamón; almidón	Carne vacuna y porcina	**Proteínas de soja**	Positivo
14	Carne porcina	Carne porcina	---	Negativo
15	Carne porcina	Carne porcina	**Plasma**	Negativo

A modo de ejemplo en las **Figuras 1**, **2** y **3** se presentan densitogramas de algunas de las muestras analizadas.

En la muestra 1 se confirmó la presencia de proteínas de carne de cerdo y el almidón declarados en el rótulo. La muestra presentó picos característicos de proteína de soja sin embargo dicha materia prima no estaba declarada en el respectivo rótulo.

En la muestra 2 se confirmó la presencia de proteínas de carne de cerdo. Utilizando el solvente selectivo para la extracción de las proteínas lácteas caseínas no se observó presencia de esta materia prima proteica. En esta muestra se presume que habría un error de rotulado por parte del supermercado ya que se trataba de un jamón de primera marca y calidad en el cual el agregado de caseinato no está permitido. No se detectaron proteínas extrínsecas agregadas ni almidón.

En la muestra 3 se confirmó la presencia de proteínas de carne vacuna y de soja declaradas en el respectivo rótulo. No fue posible confirmar la presencia de suero de queso. Esta materia prima proteica podría haber sido agregada por debajo del límite de detección del método (0,8% de proteína de suero). (López 2006). Se detectó la presencia de almidón que no estaba declarado.

En la muestra 4 sólo se detectaron proteínas de pavo correspondientes a la especie cárnica declarada en el respectivo rótulo. No se detectaron proteínas extrínsecas agregadas ni almidón. (**Figura 1**).

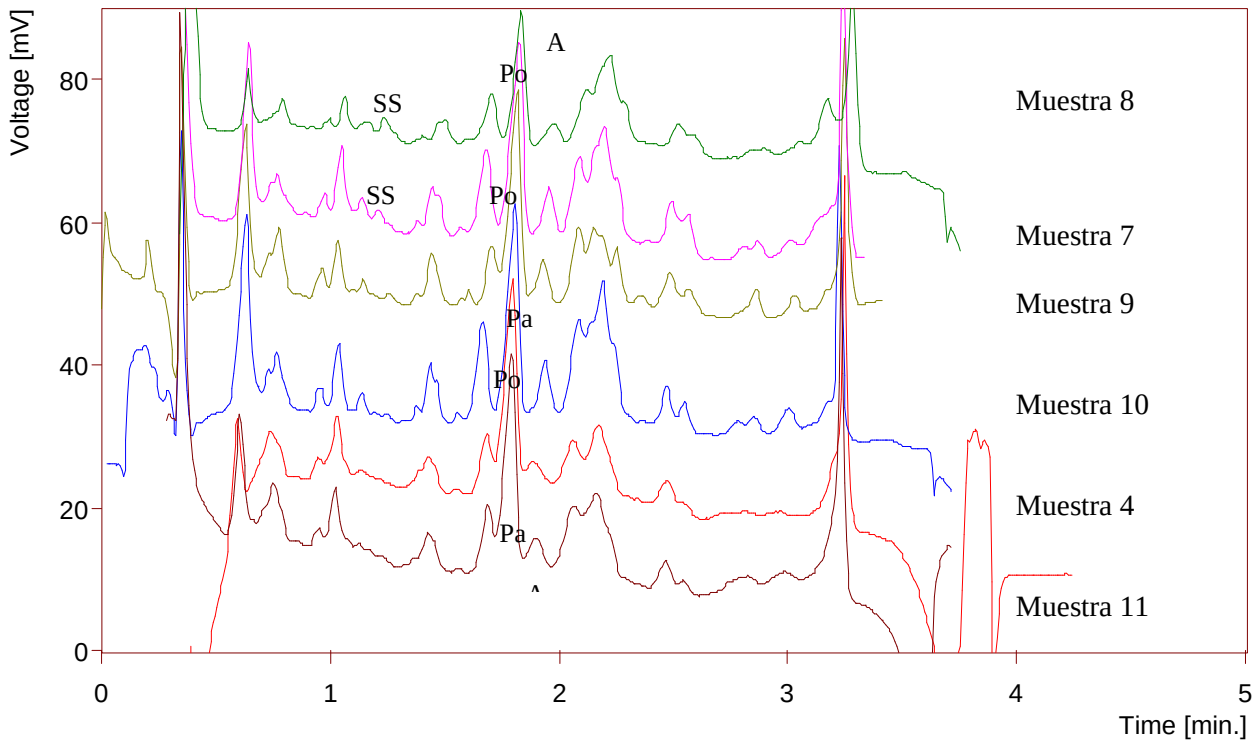


Figura 1. Densitogramas correspondientes a proteínas totales de las muestras 4 y 7 a 11, separadas por SDS-PAGE. Po: picos característicos de pollo. Pa: picos característicos de pavo. S: picos característicos de soja. A: pico característico de actina.

En la muestra 5 (**Figura 2**) se detectó la presencia de proteínas de cerdo (Cp), de plasma (P) y de soja (S). Esta metodología no permite diferenciar plasma vacuno de plasma porcino ya que ambas materias primas presentan igual patrón electroforético. (López et al 2006)

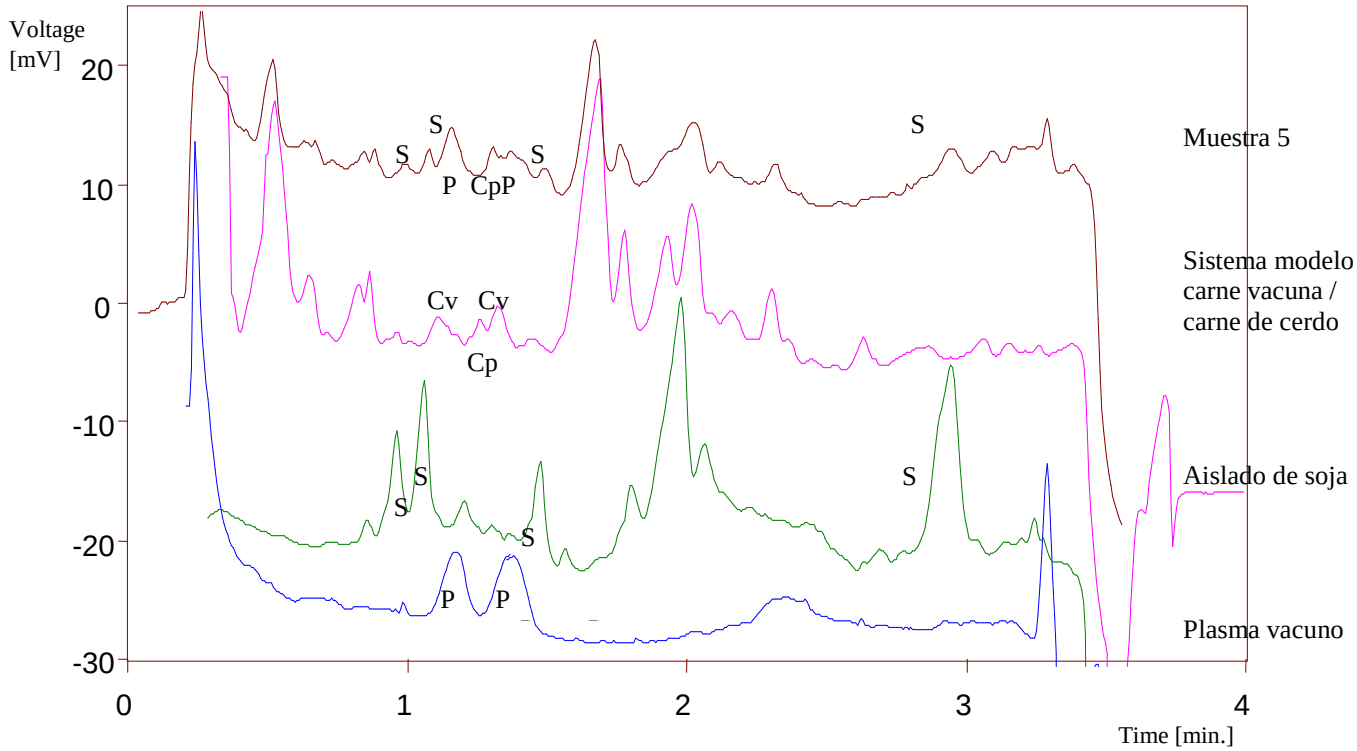


Figura 2: Densitogramas correspondientes a proteínas totales de la muestra 5, de sistema modelo carne vacuna/carne porcina, de plasma y de soja, utilizados como control, separadas por SDS-PAGE.
Cv: picos característicos de carne vacuna. Cp: picos característicos de carne porcina. S: picos característicos de soja. P: picos característicos de plasma.

Este fiambre declaraba además de carne de cerdo, de plasma y de soja, carne vacuna. Paralelamente a esta muestra se analizó un sistema modelo de mezcla carne de cerdo/carne vacuna (75 % carne de cerdo/ 25 % carne vacuna) en el que se pudieron identificar claramente picos característicos de ambas especies cárnicas. Debido a que los picos característicos de plasma (P) coinciden con los picos de carne vacuna (Cv) que permiten su detección en mezcla con carne porcina (Cp) no es posible en esta muestra confirmar la presencia de carne vacuna. Tampoco se detectó en esta muestra suero de queso posiblemente por su agregado por debajo del límite de detección del método (0,8% de proteína de suero). (López et al 2006). Sí se detectó almidón, no declarado en el respectivo rótulo.
En la muestra 6 (**Figura 3**) se detectó la presencia de proteínas de cerdo (Cp), de pollo (Po) y de soja (S) declaradas en el respectivo rótulo. No fue posible confirmar la presencia de proteínas de leche con el nivel de detección del método (1 % de leche en polvo en mezcla con carne). (López et al 2006).

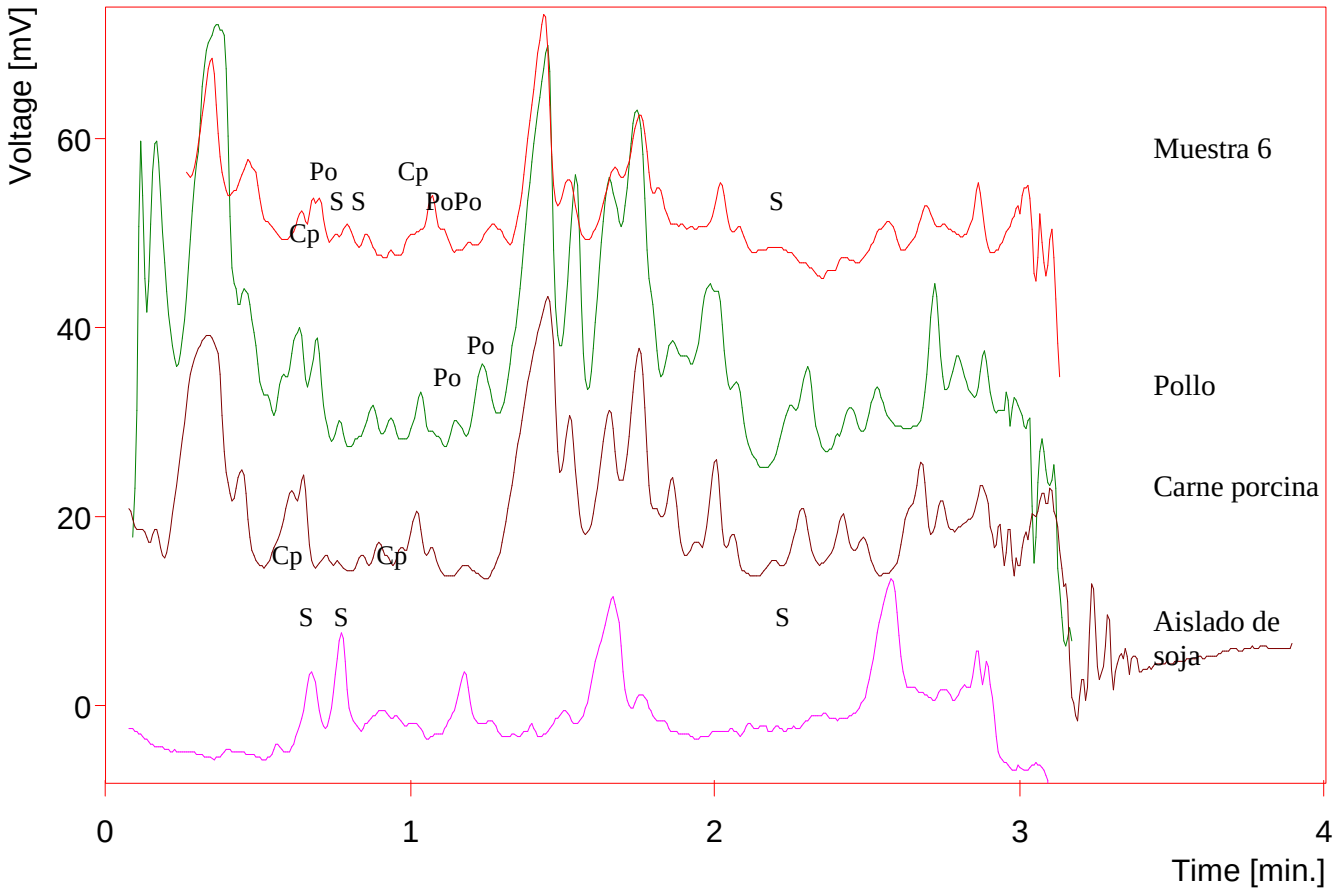


Figura 3. Densitogramas correspondientes a proteínas totales de la muestra 6, carne porcina, pollo y de aislado de soja, utilizados como control, separadas por SDS-PAGE. Cp: picos característicos de carne porcina. Po: picos característicos de pollo. S: picos característicos de soja.

En la muestra 7 se detectaron proteínas características de pollo (Po) y no se observaron picos característicos de pavo (Pa). En la **Figura 1** se observa que si bien las proteínas de pollo y de pavo presentan resoluciones electroforéticas muy similares existe un pico próximo a la actina (A) que permite distinguir pollo de pavo precisamente por su proximidad con la actina. El pico Pa característico de pavo aparece inmediatamente antes de la actina mientras que el pico Po, característico de pollo, aparece más alejado de la actina. La presencia de soja y de almidón declarados en el respectivo rótulo fue confirmada.
En la muestra 8 se confirmó la presencia de proteínas de pollo (Po) y de soja (S) y de almidón declarados en el respectivo rótulo (**Figura 1**).
En la muestra 9 se confirmó la presencia de proteínas de pavo (Pa) declaradas en el respectivo rótulo. (**Figura 1**). También se detectó presencia de almidón en baja concentración, esta ingrediente no estaba declarado.

En la muestra 10 se confirmó la presencia de proteínas de pollo (Po) declaradas en el respectivo rótulo (**Figura 1**). En esta muestra se detectó presencia de almidón que coincide con la declaración de almidón de trigo en el rótulo.
En la muestra 11 se confirmó la presencia de proteínas de pavo (Pa) declaradas en el respectivo rótulo (**Figura 1**). No se detectó presencia de almidón en esta muestra.
En la muestra 12 se detectó la presencia de proteínas de carne vacuna y de soja. No se pudo confirmar el agregado de plasma. En esta muestra con el solvente selectivo para la extracción de proteínas lácteas, ISO 55° + 2ME, se observaron bandas de caseínas de muy baja intensidad. Se detectó presencia de almidón, declarado en el respectivo rótulo.
En la muestra 13 (**Figura 4**) se confirmó la presencia de proteínas de carne vacuna (Cv) y de carne porcina (Cp) declaradas en el respectivo rótulo, así como la presencia de almidón. Sin embargo en esta muestra se detectó la presencia de soja (S) que no estaba declarada en el respectivo rótulo.
En la muestra 14 se detectó la presencia de carne porcina declarada en el rótulo y no se detectaron otras proteínas extrínsecas ni almidón.

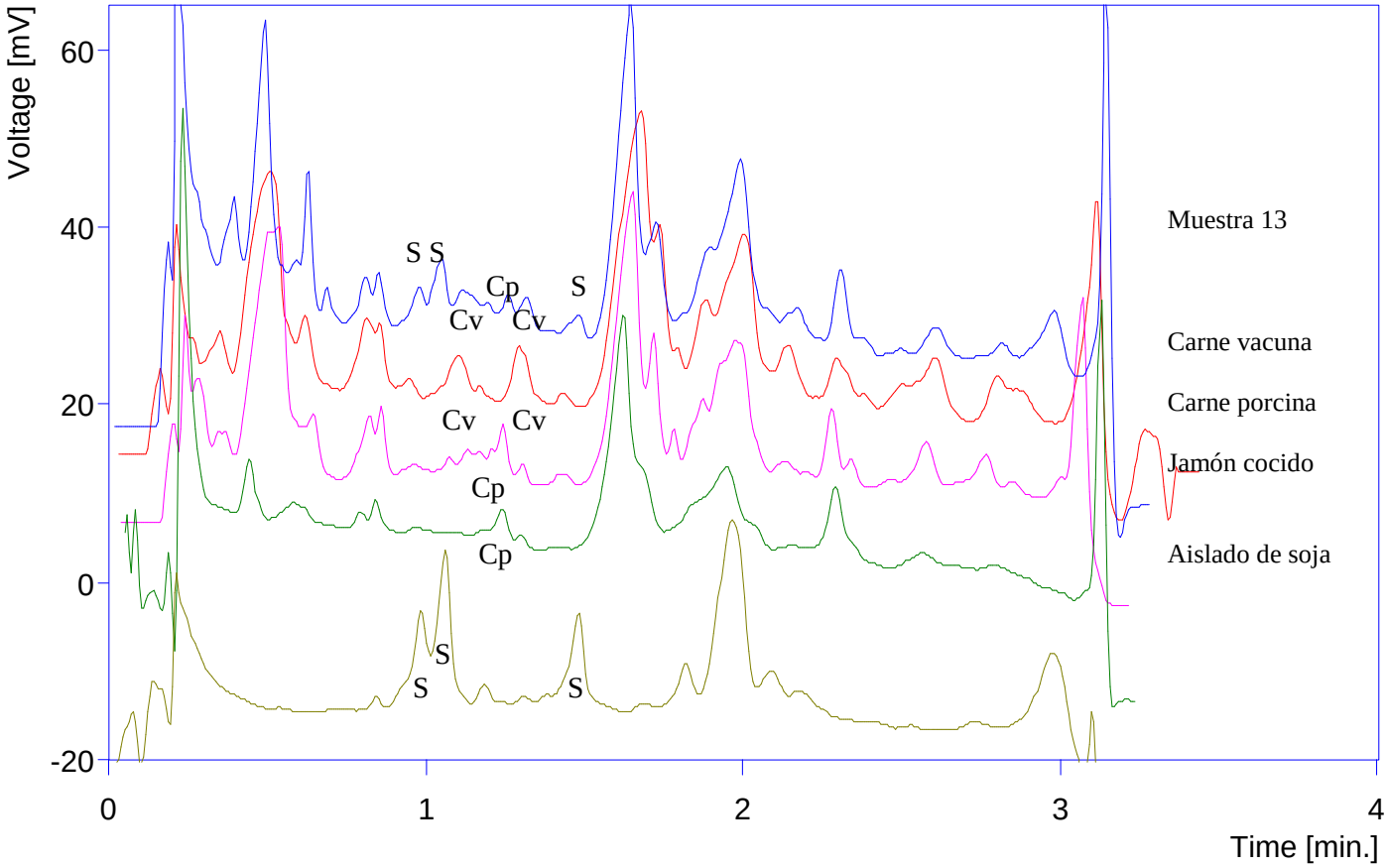


Figura 4. Densitogramas correspondientes a proteínas totales de la muestra 13 y a carne vacuna, carne porcina y aislado de soja, utilizados como control, separadas por SDS-PAGE. Cv: picos característicos de carne vacuna. Cp: picos característicos de carne porcina. S: picos característicos de soja.

En la muestra 15 se detectó la presencia de carne porcina pero también se detectó la presencia de plasma en baja concentración. Esta materia prima no estaba declarada en el respectivo rótulo y su agregado no está permitido en este tipo de producto, jamón cocido. (CAA 2009)

CONCLUSIONES

De acuerdo con estos resultados en la mayoría de las muestras se identificaron las especies cárnicas declaradas: carne porcina, carne vacuna, carne de pavo, carne de pollo o mezclas de dos especies cárnicas (vacuna/ porcina y porcina/pollo). Sólo una muestra que declaraba pavo tenía pollo en su composición. Con respecto a las proteínas extrínsecas agregadas se detectó soja en ocho de las muestras analizadas, dos de ellas no lo declaraban aunque en ambos tipos de productos (fiambre de

cerdo y salchichón con jamón) su agregado está permitido. Se detectó plasma o leche en dos muestras que lo declaraban. También se detectó plasma en una muestra que no lo declaraba y que no debía contener este ingrediente (jamón cocido). No se detectaron proteínas de suero de queso en dos muestras ni caseinato en una muestra (estos ingredientes estaban declarados en los respectivos rótulos). En el primer caso, el suero de queso podría haber sido agregado por debajo del límite de detección del método (0,8% de proteína de suero); en el segundo caso correspondería a un error de rotulado por parte del supermercado ya que se trataba de un jamón de primera marca y calidad en el cual el agregado de caseinato no está permitido. La determinación de almidón resultó positiva o positiva débil en diez de las muestras analizadas; en tres de ellas este ingrediente no estaba declarado en los respectivos rótulos. La metodología electroforética SDS- PAGE es una herramienta útil para la detección de diferentes especies cárnicas solas o en mezclas así como para la detección de diferentes proteínas extrínsecas en fiambres comerciales. Esta metodología junto con la detección cualitativa de almidón permitirían corroborar los ingredientes proteicos y el almidón declarados en los rótulos de fiambres comerciales.

AGRADECIMIENTOSA TecnoAlimenti SA por su colaboración con muestras de composición conocida para su análisis. Parcialmente financiado por UBACyT B418.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed. Horwitz W Ed Washington, DC.

CAA, Código Alimentario Argentino, actualizado, 2009. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/codigoa/Capitulo_VI_Carneos_actualiz_2007-08.pdf, visitada abril 2009.

Laemmli U.K. 1970. " Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage t4". Nature. 227: 680 – 685.

López L. B. 2000. "Separación, identificación y cuantificación de proteínas en alimentos procesados". Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

López L.B. y Valencia M.E. 2001. "Detección de proteínas extrínsecas en productos cárnicos comerciales por SDS-PAGE". Revista Chilena de Nutrición. Vol. 28 Nº 3: 447 – 456.

López L. B, Greco C. B, Ronayne de Ferrer P. y Valencia M. E. 2006. "Identificación de proteínas extrínsecas en jamones cocidos por SDS-PAGE: Nivel de detección en sistemas modelo". Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 56:, 282 – 287.

López Laura B**.,** Greco Carola B., Pellegrino Néstor R., Giacomino Silvia y Valencia Mirta E. 2007. "Control Bromatológico de productos cárnicos, verificación del cumplimiento de la legislación". La industria cárnica Latinoamericana. N° 147: 62 – 65.

López L B, Binaghi MJ, Greco CB, Mambrín MC y Valencia ME. 2009. "Identificación y cuantificación de especies vacuna / porcina en productos cárnicos crudos por SDS-PAGE". III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. 15 al 17 de abril de 2009. Córdoba Argentina.

Olivera Carrión M. 1988. "Separación de proteínas alimenticias por electroforesis: Estudio de los cambios inducidos por el procesado, identificación de especies y detección de proteínas en mezclas". Tesis Doctoral. UBA. Argentina.

Olivera Carrión M. y Valencia M. 1990a. "Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. I. Estudio en sistema modelo". Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 30 (4): 509-517.

Olivera Carrión M. y Valencia M. 1990b. “Detección y cuantificación de soja en productos cárnicos por electroforesis. II. Identificación e interferencias de otras proteínas diferentes de soja”. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 30(4): 518-528.

Predicción de propiedades mecánicas de tortillas chips utilizando análisis de imágenes a través de visión computacional.

Prediction of mechanical properties of tortillas chips using computer assisted image process

Matiacevich SB (1, 2), Inostroza, MP (1), Mery D (3), Pedreschi F (1)

(1) Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Santiago de Chile, Chile.
(2) CONICET. Departamento de Industrias. FCEyN. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
(3) Departamento de Ciencia de la Computación. Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile.
Los experimentos fueron realizados en la Universidad de Santiago de Chile
silviam@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

La importancia económica y social de las tortillas es evidente y el estudio del proceso de su fritura resulta relevante para diseñar tortillas de una mejor calidad sensorial y nutricional. El uso de técnicas de visión computacional y análisis de imágenes han permitido mejorar significativamente el control de procesos y evaluar automáticamente la calidad de diversos alimentos. El objetivo de este trabajo fue estudiar y correlacionar propiedades mecánicas (fuerza máxima y área) de tortillas chips a distintos tiempos y temperaturas de fritura y propiedades digitales obtenidas por visión computacional tales como geométricas, cromáticas o texturales. En esta investigación se obtuvo una alta correlación lineal entre parámetros mecánicos de calidad y parámetros digitales de textura en tortillas chips, observándose diferencias en los parámetros digitales obtenidos por efecto de la temperatura de fritura. Además, la alta tendencia lineal entre las propiedades mecánicas obtenidas instrumentalmente y por análisis de imágenes utilizando visión computacional permitió predecir propiedades mecánicas en tortillas chips, como fuerza máxima y área, relacionadas con la fracturabilidad y dureza, respectivamente.

ABSTRACT

The economic, cultural and social importance of tortilla products is evident and engineering studies are relevant to design tortillas with better nutritional and sensorial quality. Computer vision is a valuable tool which helps to improve the automatic evaluation of food quality. The objective of this research was to study and correlate the mechanical properties (maximum force and work) of tortilla chips (at different frying time and temperatures) and some textural, chromatic and geometrical properties obtained from images by using computer vision. In conclusion, in this study a high linear correlation was obtained between mechanical and textural digital parameters of tortillas chips using computer vision, observing differences due to frying temperature. Moreover, the high linear correlation between instrumental and image properties permit to predict mechanical properties as maximum force and work, and related them to hardness and toughness attributes, respectively, by using computer vision.

PALABRAS CLAVE: *tortillas chips, visión computacional, propiedades mecánicas.*

KEYWORDS: *tortillas chips, computer vision, mechanical parameters.*

INTRODUCCIÓN

Muchos productos de maíz como las tortillas (fritas o sin freír) son parte fundamental de la dieta de muchos países de Latinoamérica. La importancia económica, cultural y social de estos productos es evidente y el estudio del proceso de fritura en tortilla chips resulta relevante para diseñar tortillas de una mejor calidad sensorial y nutricional. Las tortillas chips son horneadas y luego fritas, con lo cual absorben menos aceite, son mas crocantes y con un mayor aroma alcalino que los chips sin hornear. (Moreira *et al* 1995, Moreira *et al* 1997, Kawas y Moreira 2001). El uso de técnicas de visión computacional y análisis de imágenes han permitido mejorar significativamente el control de procesos

y a la evaluación automática de la calidad de materiales complejos tales como los alimentos (Mery y Pedreschi 2005, Pedreschi *et al* 2006). Varios autores estudiaron las características estructurales de las tortillas chips fritas. Hawrysh *et al* (1995) encontraron que no se observaron diferencias significativas en el efecto de la textura por el uso de diferentes tipos de aceites. Moreira *et al* (1995) determinaron que la fracturabilidad (fuerza máxima de quiebre) de las tortillas chips depende del tiempo de fritura. La caracterización de atributos de calidad de las tortillas chips durante su fritura generará información valiosa para desarrollar una evaluación y modelos de los cambios estructurales de los productos fritos.
El objetivo de este trabajo fue estudiar y correlacionar propiedades mecánicas (fuerza máxima y área) de tortillas chips durante su fritura en distintas tiempos y temperaturas de fritura y propiedades geométricas, cromáticas o texturales obtenidas por análisis de imágenes utilizando técnicas de visión computacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las tortillas chips

Tortillas chips fueron preparadas a partir de masa de maíz nixtamilizado (F.H.M. Alimentos Ltd., Santiago de Chile, Chile). El espesor de las tortillas fue ajustado usando una tortilladora (González, S.A., Guadalupe, México). Las tortillas resultantes midieron 3.7 ± 0.2 cm de diámetro y 2 ± 0.2 mm de espesor y fueron sometidas a un proceso de pre-cocción a 215°C durante 1.5 min en un asador eléctrico (Black & Decker).

Condiciones de fritura

Se realizó la fritura de inmersión de 10 chips simultáneamente en aceite fresco de girasol (Chef, Coprona, Chile) contenido en un freidor eléctrico (Beckers, Model F1-C, Italy) a las tres temperaturas testeadas: 160°C, 175°C y 190°C, manteniendo la temperatura de fritura constante (±1 °C). El aceite fue precalentado por una hora antes de la fritura y descartado luego de 6 hs de uso (Blumenthal 1991). Las tortillas chips fueron fritas a diferentes intervalos de tiempo (6 tiempos) hasta un contenido final de humedad de 1.8% (en base seca, bs), luego enfriados a temperatura ambiente en desecadores durante 10 a 20 min y luego analizados por el sistema de visión computacional implementado o por análisis textural. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Sistemas de visión computacional

Imágenes digitales capturadas a cada temperatura de fritura fueron procesados por un sistema de vision computacional, el cual consiste en una caja negra con cuatro tubos de luz natural de 18W (Phillips) y una cámara digital (Canon Powershot G3, 4 Megapixeles) en posición vertical a 22.5 cm de las muestras. El ángulo entre la lente de la cámara y la luz fue de 45°. Todas las imágenes fueron escanéadas en las mismas condiciones usando el control remoto del programa ZoomBrowser v6.0 (Canon). El análisis de imágenes se realizó utilizando el software Matlab v. 7.0 junto con la herramienta Balu (Mery y Soto 2008). El Balu utiliza una gran cantidad de características digitales, geométricas, de intensidad y texturales, extrayendo un total de 227 características (Mery 2006, Mery y Soto 2008).

Análisis de textura

La textura de las tortillas fue realizada a temperatura ambiente (20°C) a través de una prueba de punción utilizando un analizador de textura (Texture Analyzer™, TA.XT2, Texture Technology Corp., NY) usando una sonda cilíndrica de ¼'' de diámetro a una velocidad de 1 mm/s. La fuerza máxima de quiebre (g) y el área (N/mm) bajo la curva hasta el pico máximo fueron obtenidos a partir de las curvas fuerza vs distancia utilizando el software Texture Expert (v 6.06). La fuerza de fractura es la máxima fuerza de quiebre requerida para romper la muestra y se encuentra relacionada con la fracturabilidad. El área se encuentra relacionada con el trabajo necesario para romper el producto, por lo tanto con la dureza del mismo. Las mediciones fueron repetidas tres veces con 10 chips en cada condición experimental.

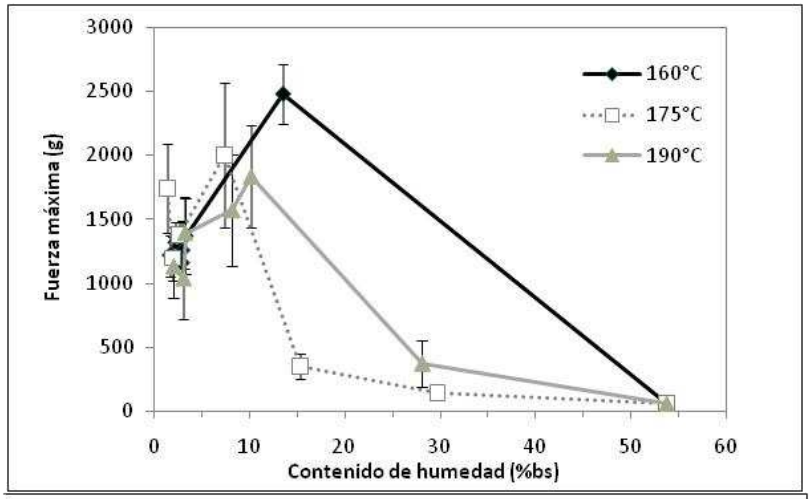
Contenido de humedad

El contenido de humedad o de agua (wc) de las tortillas chips fueron determinadas utilizando una estufa de secado de humedad (MS-70, A&D Company Ltd.). Muestras (aproximadamente 5 g) a cada tiempo de fritura fueron secados a 160°C hasta peso constante (por duplicado). Se informa el promedio de los resultados en porcentaje en base seca (%bs).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra la fuerza máxima y el área o trabajo en función del tiempo de fritura (1A) y del contenido de agua (1B) a cada temperatura analizada. A medida que aumenta el tiempo de fritura, se observó que el contenido de agua disminuyó y se produjo un cambio en el comportamiento mecánico desde un comportamiento de sólido dúctil sin fractura a un sólido frágil (Miranda y Aguilera 2006). La fuerza máxima, relacionada con la fracturabilidad disminuyó a medida que el contenido de agua fue mayor mientras se comportó como sólido dúctil (a cortos tiempos de fritura). Sin embargo, a contenidos de agua ≤10%bs, el material se comportó como un sólido frágil al aumentar el tiempo de fritura, la fuerza máxima de quiebre aumentó a mayores tiempos de fritura y menores contenidos de humedad, aumentándose así la crocancia del producto. El trabajo mecánico o área, asociado a la dureza, disminuyó con la disminución del contenido de agua o el aumento del tiempo de fritura a todas las temperaturas analizadas, tanto si el comportamiento mecánico fue dúctil o frágil. Se observaron diferencias en los valores de fuerza máxima y área a las diferentes temperaturas de fritura analizadas cuando el contenido de agua fue mayor al 10%bs.

(A)



(B)

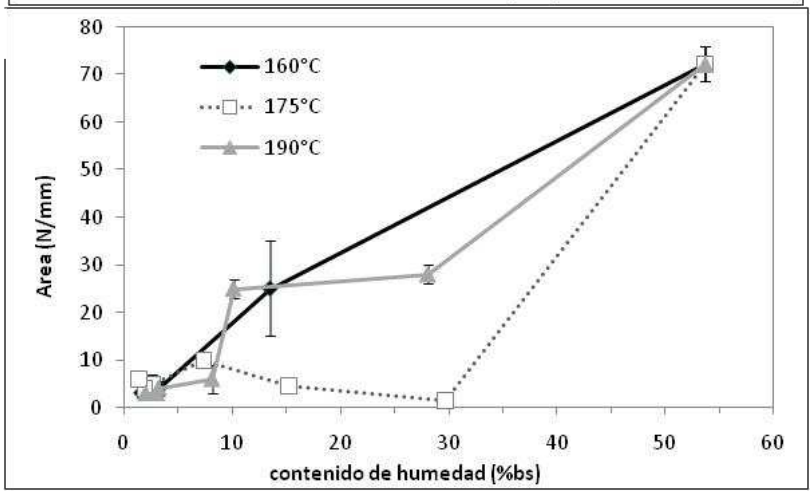


Figura 1. Parámetros mecánicos de textura obtenidos instrumentalmente de tortillas chips fritas a diferentes temperaturas. (A) Fuerza máxima (B) Área. Se grafica el valor promedio con su respectivo desvío estándar.

Los valores de los parámetros texturales exhibieron difusión con una apreciable desviación estándar. El coeficiente de variación (definido como 100 x desviación estándar /valor promedio) fue diferente para cada tiempo de fritura y temperatura, y se encontró en el rango de 20 al 42% para el trabajo mecánico y del 10 a 40% para la fuerza máxima. Las variaciones en los datos obtenidos puede ser atribuido a diferencias en el origen del material, a la heterogeneidad de la masa y al diferente grado de inflado de los chips a un mismo tiempo de fritura a pesar que fueron fritos simultáneamente.

A través del análisis de imágenes se obtuvieron 227 características digitales, a partir de las cuales se obtuvo la mejor correlación (R^2 > 0,90) entre los parámetros mecánicos y digitales de textura

obtenidos por visión computacional (**Tabla 1**). Se puede observar en la **Tabla 1** que los parámetros digitales que mejor correlacionaron con los parámetros mecánicos de textura fueron diferentes a cada temperatura analizada, indicando que diferencias en la textura de las tortillas chips pueden ser observadas a través del análisis de imágenes. Las diferencias obtenidas en los valores de los parámetros mecánicos y los parámetros digitales fueron principalmente atribuidas a las diferentes temperaturas de fritura. Utilizando los parámetros digitales que mejor correlacionaron con los parámetros mecánicos analizados, se realizó la predicción de los parámetros mecánicos. En la **Tabla 1** también se observa las ecuaciones de predicción correspondiente a cada temperatura analizada para cada parámetro mecánico de textura analizado y su respectivo coeficiente de correlación de la regresión lineal de ajuste entre ellos, que demuestra el buen ajuste de la ecuación de predicción.

Tabla 1. Parámetros obtenidos por análisis de imágenes que mejor correlacionaron con los parámetros mecánicos de textura y sus respectivas ecuaciones de predicción. R^2: coeficiente de correlación calculado para la regresión lineal de predicción.

Parámetros mecánicos	Temperatura de fritura	Parámetros digitales de mejor correlación	Ecuación de predicción	R^2
Fuerza máxima	160°C	Int. Hu moment 7 - Value	y=0.971x+77.36	0.9796
	175°C	Fourier 1 - Value	y=0.9965x+157.65	0.9801
	190°C	Tx1, d3 (range) - Gray	y=0.9705x-2.26	0.9662
Área	160°C	Int. Hu moment 7 - Gray	y=0.9881x+0.1693	0.9853
	175°C	Tx13, d3 (mean) - Green	y=0.9798x+0.745	0.9727
	190°C	Int. Hu moment 6 - a	y=0.939x+0.7697	0.9728

La **Figura 2** muestra un ejemplo de predicción de propiedades mecánicas (Fuerza Máxima) en tortillas chips fritas a 190°C, observando variabilidad debido a los replicados, sin embargo se obtuvieron altas correlaciones lineales ($R^2 \geq 0.966$) entre los parámetros mecánicos y digitales de textura.

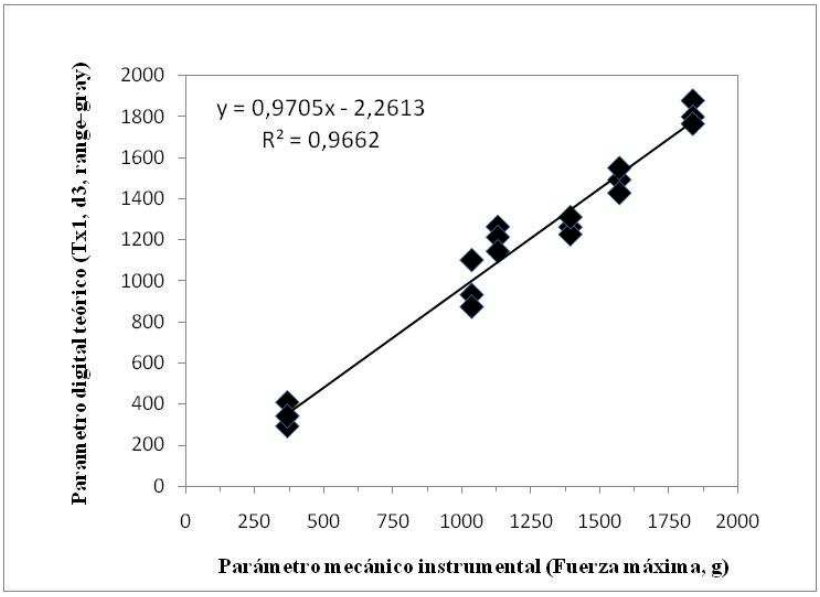


Figura 2. Predicción a los distintos tiempos de fritura del parámetro mecánico (Fuerza máxima) utilizando el parámetro digital que mejor correlacionó obtenido por análisis de imágenes utilizando visión computacional en tortillas chips fritas a 190°C.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron parámetros digitales de textura por análisis de imágenes que fueron los que mejor correlacionaron con los parámetros de textura obtenidos mecánicamente. Los parámetros digitales fueron diferentes a cada condición de temperaturas analizadas, indicando que se pudieron observar

diferencias en la textura de las tortillas chips por análisis de imágenes, las cuales fueron debidas a las diferencias de temperatura analizadas. La alta correlación lineal que se encontró en este trabajo entre los parámetros mecánicos y digitales de textura obtenidos por análisis de imágenes permite que esta emergente tecnología pueda ser utilizada para el mejoramiento y control del proceso de fritura de tortillas chips.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Jon May de FHM Alimentos Ltd. por la generosa donación de materia prima para la elaboración de las tortillas. Este trabajo fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Santiago de Chile (USACH), por el LACCIR Virtual Institute (Proyecto R0308LAC003) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blumenthal MM. 1991. A new look at the chemistry and physics of deep fat frying. Food Technology, 45: 68-71.

Hawrysh ZJ, Erin MK, Kim SS, Hardin RT. 1995. Sensory and chemical stability of tortilla chips fried in canola oil, corn oil, and partially hydrogenated soybean oil. Journal of American Oil Chemistry Society, 72: 1123-1130.

Kawas ML, Moreira RG. 2001. Characterization of product quality attributes of tortillas chips during the frying process. Journal Food Engineering, 47: 97-107.

McCormick R. 1988. Analytical developments target food structure and texture. Prepared Foods, 157: 235-236.

Mery D. 2006. Extracción de características. Departamento de las Ciencias de la Computación, Universidad Católica de Chile. Págs. 7-19.

Mery D., Soto A. 2008. Features: The More The Better. En: Mastorakis, Demiralp, Mladenov, Bojkovic. editores. New aspects of signal processing,computational, geometry and artificial vision. Proceedings of the 8th WSEAS International Conference on signal processing, computational geometry and artificial vision. pag 46-50.

Mery D, Pedreschi F. 2005. Segmentation of colour food images using a robust algorithm. Journal Food Engineering, 66: 353-360.

Miranda ML, Aguilera JM. 2006. Structure and texture properties of fried potatoes products. Food Reviews International, 22: 173-201.

Moreira RG, Palau VE, Sweat VE, Sun X. 1995. Thermal and physical properties of tortilla chips as a function of frying time. Journal of Food Processing and Preservation, 19: 175-189.

Moreira RG, Castell-Perez ME, Barrufet MA. 1999. Deep-fat frying: fundamentals and applications; Aspen Publishers, Gaithensburg, MA, 6, 98: 179-202.

Moreira, RG, Sun X, Chen Y. 1997. Factors affecting oil uptake in tortilla chips in deep-fat frying. Journal Food Engineering. 31: 485-498.

Pedreschi, F, León J, Mery D, Moyano P. 2006. Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. Food Research International, 39: 1092-1098.

Roudaut G, Dacremont C, Vallès Pàmies B., Colas B, Lemeste M. 2002. Crispness: a critical review on sensory and material science approach. Trends Food Science and Technology, 13: 217–227.

Vincent JFV. 1998. The quantification of crispness. Journal Science Food Agriculture, 78: 162–168.

Estudio comparativo de actividad antioxidante, contenido de polifenoles y flavonoides de extractos de polen apícola en relación a los distintos solventes de extracción

Evaluation of antioxidant activity of different bee-pollen extracts and its relation with polyphenol and flavonoid contents

Medina AV (1), Chaillou LL(1), Nazareno MA (1) (2)

(1) Instituto de Ciencias Químicas. Facultad de Agronomía y Agroindustrias-Universidad Nacional de Santiago del Estero. Av. Belgrano (S) 1912. CP 4200. Santiago del Estero, Argentina.
(2) INQUINOA-CONICET. llchaillou@yahoo.com

RESUMEN

La notable capacidad de compuestos polifenólicos de neutralizar a especies reactivas de oxígeno está fuertemente asociada a su estructura. La relación entre el contenido de estos compuestos y su poder antioxidante se ha estudiado durante años en frutas, vegetales y plantas medicinales. Los productos apícolas son particularmente ricos en estas sustancias bioactivas. Los objetivos de este trabajo fueron determinar el solvente más adecuado para preparación de extractos de polen, cuantificar el contenido de compuestos polifenólicos y flavonoides totales y determinar la actividad antirradicalaria y antioxidante de los diferentes extractos de polen multifloral elaborado por las abejas *Apis mellifera* L. a partir de especies vegetales predominantes en la provincia de Santiago del Estero. Se prepararon extractos de polen utilizando 5 solventes de extracción: metanol, metanol-agua (1:4); etanol absoluto, etanol de 96º y etanol-agua (1,2:1). Los compuestos fenólicos totales se cuantificaron mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como referencia mientras que los flavonoides por la técnica espectrofotométrica del $AlCl_3$, fueron referidos a quercetina. La actividad antioxidante se determinó por las técnicas de decoloración de los radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$), del radical catión del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$) y la técnica de la co-oxidación, inducida por lipoxigenasa de soja, del sistema micelar β-caroteno- ácido linoleico. Los contenidos de polifenoles y flavonoides fueron 17,3 y 1,7 mg/g para extracto polínico en metanol; 15,9 y 1,3 mg/g para metanol-agua; 16,1 y 2,1 mg/g para etanol absoluto; 17,8 y 1,8 para etanol de 96º y 17,2 y 3 mg/g para etanol-agua, respectivamente. El análisis estadístico de los datos reveló que existen diferencias significativas entre los extractos preparados con etanol absoluto y metanol-agua y el resto de los extractos. La capacidad atrapadora de los radicales $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$ y la actividad antioxidante fueron 28,3; 31,1 y 41,9% para extracto polínico en metanol; 30,4; 27,5 y 47,6% para metanol-agua; 25,2; 26,2 y 45,8% para etanol absoluto; 25,5; 30,6 y 16,3% para etanol de 96º y 25,9; 26,6 y 49,2% para etanol-agua, respectivamente. La mayor actividad atrapadora de radicales libres se observó en extractos metanólicos y etanólicos en cambio, la mayor actividad antioxidante, en etanol-agua. La diferencia entre los valores para las actividades antirradicalaria y antioxidante se debe a que éstas evalúan diferentes mecanismos de protección y en distintos sistemas. Los extractos analizados presentan una actividad antirradicalaria y antioxidante moderada. Para la utilización de extractos polínicos como suplementos dietarios, por razones de costo, toxicidad y estabilidad del extracto se sugiere utilizar etanol puro como solvente de extracción.

ABSTRACT

The remarkable capacity of polyphenolic compounds to neutralize oxygen reactive species is strongly associated to its chemical structure. The relation between polyphenol contents and their antioxidant power in fruits, vegetables and medicinal plants has been studied for years. Hive products are particularly rich in these bioactive substances. The main aims of this work were choosing the most adequate solvent to preparing pollen extracts, to quantifying polyphenolic compound and flavonoid total contents and determining the antiradical and antioxidant activities of different multifloral pollen extracts elaborated by bees with predominant plant species from the Argentinean province of Santiago del Estero. Pollen extracts were prepared using 5 extraction solvents: methanol, (1:4) methanol-water

mixture; absolute ethanol, pure ethanol and (1.2:1) ethanol-water mixture. Total phenolic compound contents were determined by Folin-Ciocalteu technique using gallic acid as reference while, flavonoid contents were measured by the aluminum chloride spectrophotometric technique using quercetin as reference. Antioxidant activities were determined by two free radical bleaching techniques, those of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical ($DPPH^{\bullet}$) and 2,2´-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ($ABTS^{\bullet+}$) and by the β-carotene bleaching technique based in the inhibition of the enzymatically induced β-carotene- linoleic acid cooxidation. Polyphenol and flavonoid total contents of pollen extracts were 17.3 and 1.7 mg/g using methanol as solvent, 15.9 and 1.3 mg/g for methanol-water mixture, 16.1 and 2.1 mg/g for absolute ethanol, 17.8 and 1.8 for pure ethanol and 17.2 and 3 mg/g for an ethanol-water mixture, respectively. Statistical analysis of data showed significant differences among absolute ethanol extract and methanol-water mixture extracts and the rest of them. Scavenging capacity towards $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ radicals and antioxidant activity were 28.3, 31.1 and 41.9 % for methanolic pollen extract, 30.4, 27.5 and 47.6 % for methanol-water mixture, 25.2, 26.2 and 45.8 % for absolute ethanol, 25.5, 30.6 and 16.3 % for pure ethanol and 25.9, 26.6 and 49.2 % for an ethanol-water mixture, respectively. The highest free radical scavenging activities were observed for methanolic extracts and ethanol-water mixtures. Differences observed between antiradical and antioxidant activities are due to the different protection mechanisms occurring in different systems. The extracts analyzed showed moderate antioxidant and antiradical activities. For reasons of cost, toxicity and extract stability, pure ethanol is suggested as solvent extraction to use pollen extract in dietary supplements preparation.

PALABRAS CLAVE: *actividad antioxidante, flavonoides, polen, polifenoles.*

KEYWORDS: *antioxidant activity, flavonoids, pollen, polyphenols.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha registrado un considerable interés por el estudio de los mecanismos de oxidación, los radicales libres y la función que éstos cumplen en el organismo y en los alimentos (Jiménez-Escrig *et al*. 2000). Estos radicales se producen durante el metabolismo normal y patológico, también por acción de radiación ionizante, pesticidas, toxinas fúngicas, alimentos procesados, humo del tabaco, radiación solar e inducen daño oxidativo a biomoléculas esenciales para la vida, tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos. Este daño puede provocar envejecimiento así como también numerosas enfermedades degenerativas tales como arterioesclerosis, cáncer, mal de Parkinson, de Alzheimer, demencia isquemia cardíaca y cerebral, etc. (Potterat 1997, Lee *et al*. 1998, Soler-Rivas *et al*. 2000, Fukumoto y Mazza 2000). Entre las reacciones de oxidación que también conciernen a la industria alimentaria, la lipoperoxidación es el proceso de reacción en cadena, por el cual se oxidan las moléculas de ácidos grasos, principales componentes de membranas celulares de los alimentos, lo que ocasiona un cambio total o parcial en las propiedades sensoriales como color, olor o sabor y en el valor nutritivo tales como: pérdida de vitaminas, de ácidos grasos esenciales, disminución de la calidad proteica, etc. La oxidación lipídica es una reacción autocatalítica, sin embargo, puede ser retardada por la adición de sustancias antioxidantes que pueden prevenir la etapa de iniciación, interrumpir la cadena de propagación atrapando radicales libres, reducir la formación de hidroperóxidos, formar quelatos con metales pesados, desactivar las especies con exceso energético (Rajalakshmi y Narasimhan 1996). Por lo tanto los antioxidantes pueden definirse como sustancias, que estando presentes en pequeñas concentraciones, retardan o previenen significativamente la oxidación de un sustrato oxidable (Wong 1989, Melo y Guerra 2002). Por ello se ha incrementado la atención científica sobre su reactividad y sus potenciales efectos preventivos y terapéuticos de bebidas y alimentos (Yu *et al*. 2003, Kroyer y Hegedus 2001). Su capacidad antioxidante se atribuye a la acción conjunta de una amplia variedad de antioxidantes que están presentes en su composición, principalmente polifenoles así como también vitaminas C y E, carotenoides terpenoides, enzimas y minerales (Leja *et al*. 2007, Pérez-Jiménez *et al*. 2008).

La notable capacidad de compuestos polifenólicos de neutralizar a especies reactivas de oxígeno está fuertemente asociada a su estructura (Benavente-García *et al*. 1997, Melo y Guerra 2002). Los productos apícolas, tales como propóleos y polen, son particularmente ricos en estas sustancias

bioactivas. El polen de abejas es un producto natural resultado de la aglutinación de polen colectado de diversas flores por las abejas *Apis mellifera* L. con néctar y secreciones salivares. Lo almacenan en la colmena, separado de las celdas de néctar puesto que constituye la fuente de proteínas más importante para estos insectos (Almeida-Muradian *et al.* 2005). En su composición se destacan polisacáridos, lípidos, proteínas aminoácidos y una variedad de productos secundarios tales como polifenoles, carotenoides, esteroles, vitaminas, etc. (Sarmento Silva *et al.* 2006). Los compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides poseen valiosas actividades antioxidante, antiinflamatoria, antiespasmolítica, antibacteriana, antifúngica, analgésica, inhibidora de enzimas, citotoxica, antitumoral y hepatoprotectora (Bankova *et al*. 1982, Harborne y Williams 2000). Como se mencionó anteriormente, el polen presenta en su composición sustancias valiosas como polifenoles que pueden actuar como potentes antioxidantes (Kroyer y Hegedus, 2001). Por ello los objetivos de este trabajo fueron determinar el solvente más adecuado para la preparación de extractos de polen, cuantificar el contenido de compuestos polifenólicos y flavonoides totales y determinar la actividad antirradicalaria y antioxidante de los diferentes extractos de polen multifloral elaborado por las abejas *Apis mellifera* L. a partir de especies vegetales predominantes en la provincia de Santiago del Estero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se recolectaron 15 muestras de polen multifloral de aproximadamente 100 g, mediante el uso de trampas colocadas en colmenas ubicadas la localidad El Zanjón de la provincia de Santiago del Estero, Argentina. Se almacenaron en el laboratorio, refrigeradas, y al abrigo de la luz. Previamente al análisis fueron trituradas y homogeneizadas.

Preparación de los extractos de polen

Se prepararon extractos de polen al 1% utilizando 5 solventes de extracción: metanol, metanol-agua (1:4:); etanol absoluto, etanol de 96º y etanol-agua (1,2:1). Para ello se extrajeron porciones de 1g de cada muestra con 100 mL de cada solución. Los extractos se sonicaron durante 30 min, posteriormente filtrados y conservados con refrigeración en frascos de color ámbar hasta el momento del análisis.

Determinación de Compuestos polifenólicos y Flavonoides

Los compuestos fenólicos se cuantificaron, en extractos al 0,1 % v/v, con el reactivo de Folin-Ciocalteu, por absorbancia espectrofotométrica a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg/g de polifenoles expresados como ácido gálico.

Los flavonoides se determinaron midiendo la absorbancia del complejo flavonoides-aluminio a 428 nm, obtenido por reacción del extracto polínico con una solución metanólica de $AlCl_3$ al 2%. Los resultados se expresaron como mg/g de flavonoides expresados como quercetina.

Determinación de actividad antirradicalaria

La actividad antirradicalaria se determinó utilizando las técnicas de decoloración de los radicales libres 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) y del radical catión del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etibenzotiazolin-6-sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$).

Para la primera técnica, se midió, en espectrofotómetro UNICAM UV-Visible UV2, la absorbancia a 517 nm, durante 10 min, de una solución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) en metanol (Absorbancia 1, concentración: 33,6μg/mL) con 60 μL de EEP. La actividad antirradicalaria (AAR) se calculó, mediante la ecuación:

$$AAR(\%) = 100\left[1 - \frac{A_m^{\infty}}{A^0}\right] \qquad (1)$$

Donde A^0 es absorbancia al tiempo 0 sin el agregado de muestra y A_m^{∞} es absorbancia de la muestra al tiempo infinito. La absorbancia en estado estacionario se obtuvo mediante el ajuste de los perfiles cinéticos a tiempo infinito.

Para la segunda técnica se generó el radical $ABTS^{\bullet+}$ mezclando una solución stock del ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) con persulfato de potasio. La mezcla se colocó en oscuridad durante 16 h hasta lograr la estabilidad del reactivo. Luego se diluyó con buffer fosfato (pH 7) hasta una absorbancia de 0,70±0,01 (Rice-Evans y col., 1996). Se determinó la absorbancia, a 734

nm, durante 10 min de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ con 35µL de EEP. El cálculo se realizó utilizando la ecuación (1), ajustando también los perfiles cinéticos a tiempo infinito.

Determinación de la actividad antioxidante

Se prepararon soluciones de β-caroteno y ácido linoleico utilizando Tween 20 y buffer borato de sodio (pH 9). Alícuotas de estas soluciones se mezclaron y se adicionaron 100µL de EEP, se agregó una solución de lipoxigenasa de soja para inducir la oxidación y se leyó la absorbancia, durante 10 min, a 460 nm (Chaillou y Nazareno 2006). La actividad antirradicalaria (AAO) se calculó, mediante la ecuación sugerida por Burda y Oleszek (2001):

$$\%\ AOA = 100 \times \left[1 - \frac{(A_m^0 - A_m^t)}{(A_c^0 - A_c^t)} \right] \qquad (2)$$

Donde A_m^0 es la absorbancia de la muestra a 0 min y A_c^0es la absorbancia del control a 0 min; A_c^t y A_m^t son las absorbancias para un tiempo de 10 min del control y de la muestra, respectivamente.
Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presenta el contenido de polifenoles totales y flavonoides determinado en diferentes extractos de polen multifloral. El mayor contenido de polifenoles se observó en el extracto preparado con etanol de 96º seguido por el del extracto metanólico y el del extracto etanol-agua. En este último, se determinó el mayor contenido de flavonoides, seguido por los cuantificados en los extractos mencionados anteriormente.

Tabla 1. Contenido de polifenoles y flavonoides en diferentes extractos de polen.

Solvente de extracción	Polifenoles (mg/g)	Flavonoides (mg/g)
Metanol absoluto	$17,3 \pm 0,1^a$	$1,7 \pm 0,2^a$
Metanol-Agua (1:4)	$15,9 \pm 0,5^b$	$1,3 \pm 0,1^b$
Etanol absoluto	$16,1 \pm 0,1^c$	$2,1 \pm 0,1^c$
Etanol de 96º	$17,9 \pm 0,3^a$	$1,8 \pm 0,1^a$
Etanol-Agua (1,2-1)	$17,2 \pm 0,1^a$	$3,0 \pm 0,2^a$

(n=15)

El análisis estadístico de los datos reveló que existen diferencias significativas entre los extractos preparados con etanol absoluto y metanol-agua y el resto de los extractos.

En las **Figuras 1** a **3** se muestra la actividad antirradicalaria de las muestras analizadas frente a los radicales libres $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$ y la actividad antioxidante.

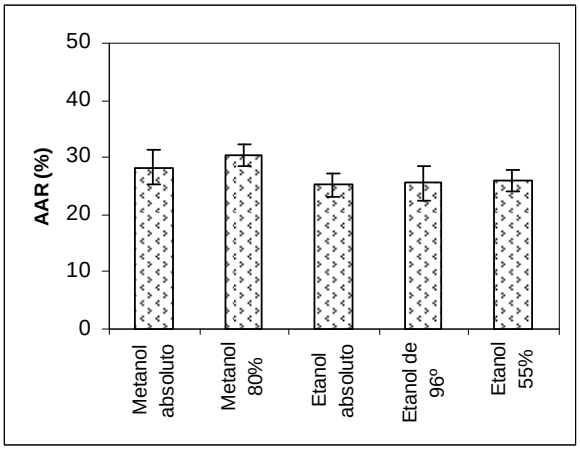


Figura 1. Actividad antirradicalaria de extractos polínicos frente a DPPH•.

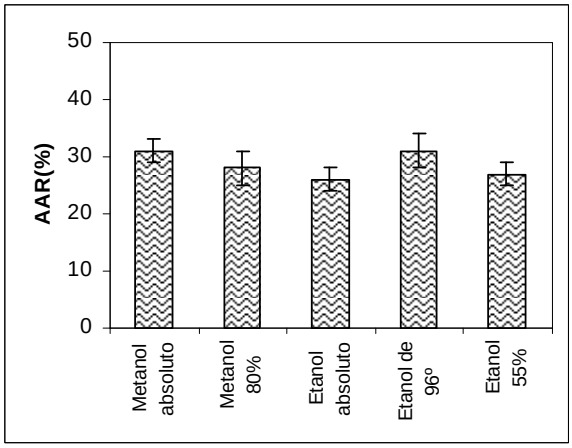


Figura 2. Actividad antirradicalaria de extractos polínicos frente a $ABTS^{\bullet+}$.

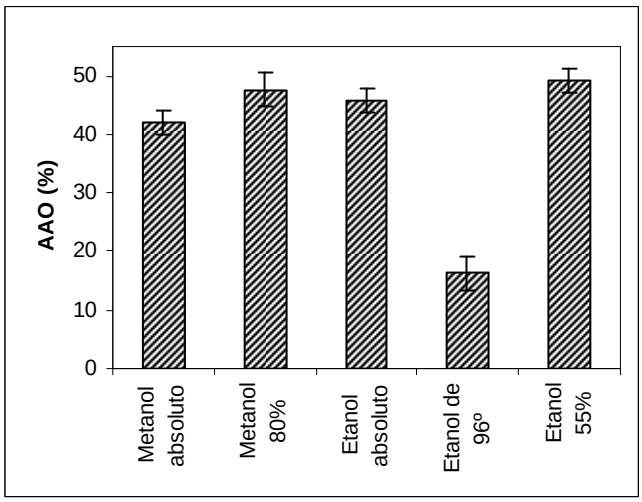


Figura 3. Actividad antioxidante de extractos polínicos.

La mayor capacidad atrapadora de radicales $ABTS^{\bullet+}$ se encontró en los extractos metanólicos y en el preparado con etanol de 96º. Este hecho podría deberse a diferencias en los perfiles de compuestos polifenólicos en los diferentes extractos, siendo los metanólicos más ricos en compuestos que poseen mayor capacidad de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$. El efecto antirradicalario sobre $DPPH^{\bullet}$ (25 a 30%) es inferior al rango de 35 a 53 % reportado por Kroyer y Hegedus (2001), las diferencias son atribuibles a los mayores contenidos de polifenoles en pólenes europeos estudiados por estos autores. Los mayores efectos atrapadores sobre este radical se determinaron en extractos metanólicos. La menor actividad antioxidante se determinó en el extracto preparado con etanol de 96º y las mayores actividades en extractos preparados con metanol al 80% y etanol al 55%, esto se corresponde con una mayor extracción de flavonoides en los extractos mencionados. La diferencia entre los valores de la actividad antirradicalaria y antioxidante se debe a que se evalúan diferentes mecanismos de acción y en medios diferentes ya que la primera se lleva a cabo en medio homogéneo, mientras que la última, en medio micelar (Chaillou y Nazareno 2006).

Se encontró correlación lineal directa entre la actividad antirradicalaria frente al radical $ABTS^{\bullet+}$ y el contenido de polifenoles, por el contrario, no se encontró correlación entre las actividades antirradicalaria sobre $DPPH^{\bullet}$ y antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales.

CONCLUSIONES

Los contenidos de polifenoles y de flavonoides representan parámetros característicos del polen colectado por las abejas y su rol como sustancias bioactivas con implicancias fisiológico-nutricionales

benéficas para la salud hacen interesante el uso de sus extractos como un suplemento dietario efectivo y funcional.
Los extractos analizados presentan actividad antirradicalaria y antioxidante moderada. Si debido a esta propiedad se desean utilizar extractos polínicos de abejas como suplementos dietarios, por razones de costo, toxicidad, estabilidad y puesto que permite una muy buena extracción de sustancias bioactivas con actividad antirradicalaria, se sugiere como solvente de extracción el etanol 96°, o bien etanol al 55% puesto que estos últimos extractos presentan, además, notable actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el financiamiento de CICYT-UNSE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of Food Composition and Analysis, 18: 105-111.

Bankova V, Popov S, Marenkov W. 1982. High perfomance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of Chromatography, 242: 135-143.

Benavente-García O, Castillo J, Marin F, Ortuño A, Del Río J. 1997. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 4505-4515.

Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 2774-2779

Chaillou LL, Nazareno MA. 2006. New method to determine antioxidant activity of polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8397-8402.

Fukumoto L, Mazza, G. 2000. Assesing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 3597-3604.

Harborne JB, Williams CA. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. Review. Phytochemistry, 55: 481-504.

Jiménez-Escrig A, Jimenez Jimenez I, Sanchez-Moreno C, Saura-Calixto F. 2000. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2, 2-diphenyl-1-picrylhidrazyl. Journal of the Science and Food Agriculture, 80: 1686-1690.

Kroyer G, Hegedus N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2: 171-174.

Lee SZ, Mbwambo H, Cheng L, Luyengi E, Gamez R, Metha A, Kinghorn J, Pezzuto J. 1998. Evaluation of the antioxidant potencial of natural products, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 1: 35-46.

Leja M, Mareczek A. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. Food Chemistry, 100: 237-240.

Melo E, Guerra N. 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Boletin SBCTA, Campinas, 36: 1-11.

Meltzer H, Malterud K. 1997. Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? Review. Scandinavian Journal of Nutrition/Näringsforskning, 41: 50-57.

Perez- Jimenez J, Arranz S, Tabernero M, Diaz-Rubio M, Serrano J, Goñi I, Saura-Calixto F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expresión of results. Food Research International, 41: 274-285

Potterat O. 1997. Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. Current Organic Chemistry, 4: 415-439.

Rajalakshmi D, Narasimhan S. 1996. Food antioxidants: Sources and Methods of Evaluation. En Madhavi DL, Deshpande SS, Salunke DK. Food antioxidant, Technological, Toxicological and Health perspectives. 1ª ed. , New York: M. Dekker Inc. Pág. 65-75.

Sarmento Silva TM, Camara CA, da Silva Lins AC, Barbosa-Filho JM, Sarmento da Silva EM, Freitas BM, Ribeiro dos Santos F. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 507-511.

Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers H. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. Phytochemical Analysis, 11: 330-338.

Wong DWS. 1989. Química de los alimentos. 1ª ed. Madrid: ACRIBIA S.A. Pág.496.

Yu L, Perret J, Harris M, Wilson J, Haley S. 2003. Antioxidant properties of bran extracts from "Akron" wheat grown at different locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1566-1570.

Análisis estructural y propiedades funcionales de la beta-lactoglobulina sometida a calentamiento previo

Structural analysis and functional properties of heated beta-lactoglobulin

Moro A, Báez GD, Busti PA, Delorenzi NJ(1)

Departamento Química-Física. Área Fisicoquímica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Rosario (2000).
(1)ndeloren@fbioyf.unr.edu.ar

RESUMEN

La beta-lactoglobulina (β-LG) determina el comportamiento funcional de los productos derivados del lactosuero, por ser su proteína mayoritaria. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las especies presentes en muestras de β-LG (55 mg/mL, buffer fosfato 20 mM, pH 6,8) sometidas a calentamiento previo y relacionarlas con modificaciones producidas en ciertas propiedades funcionales (emulsificación y espumado). El análisis estructural realizado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), dicroísmo circular (DC) y medidas de extinción de la fluorescencia con acrilamida (para estimar la hidrofobicidad superficial, HS) arrojó los siguientes resultados: el tratamiento térmico de las muestras a 65 °C produjo monómeros no nativos parcialmente desnaturalizados (MNN65), con HS ligeramente aumentada, sin modificaciones en la estructura secundaria, pero sí en la terciaria. El tratamiento térmico a 85 °C produjo monómeros no nativos parcialmente desnaturalizados (MNN85), con aumento significativo en la HS y modificaciones tanto en la estructura secundaria como en la terciaria. Al incrementar de 1 a 15 minutos el tiempo de calentamiento a 85 °C, se detectaron especies de mayores pesos moleculares (PM): dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros, formados desde MNN85 unidos por puentes disulfuro. Por comparación con muestras de β-LG de menor concentración (1 mg/mL) sometidas a calentamientos a 85 °C, se observó que los cambios conformacionales irreversibles son rápidos e independientes de la concentración. Para estudiar las propiedades funcionales de las muestras proteicas, se formaron emulsiones con soluciones 0,1 % P/V de β-LG previamente calentada (a ambas temperaturas y por diferentes tiempos) y aceite de maíz, con una fracción de fase dispersa (ϕ) de 0,2 y espumas por aireación de las mismas soluciones proteicas. La actividad emulsionante se estimó a través del Índice de Actividad Emulsionante (EAI), obtenido desde medidas turbidimétricas, observándose un leve aumento del EAI cuando el tratamiento térmico previo se dio a 65 °C, mientras que cuando las muestras proteicas se calentaron a 85 °C, el EAI disminuyó apreciablemente. La estabilidad de las emulsiones se estimó por medidas de reflectancia difusa, observándose un ligero incremento para los calentamientos a 65 °C y una disminución importante de estabilidad ante mayores tiempos de calentamiento a 85 °C. La estabilidad de las espumas se evaluó a través de medidas de volumen de espuma en función del tiempo, observándose un gran incremento de estabilidad en las muestras calentadas a 85 °C hasta determinado tiempo. El aumento de la actividad emulsionante y estabilidad de las emulsiones formadas con soluciones de β-LG calentadas previamente a 65 °C podría deberse a la mayor afinidad de los MNN65 por la interfase aceite/agua al presentar mayor HS. En cambio, cuando a 85 °C los MNN85 dan agregados de mayor PM, a pesar del aumento de HS verificado, se dificulta la difusión de las moléculas proteicas hacia la interfase, dándose por ende una disminución del EAI y de la estabilidad de las emulsiones. En el caso de las espumas, por implicar tiempos mayores de formación, prevalecerá el efecto positivo de la HS y se dará un aumento de la estabilidad de las espumas.

ABSTRACT

The main whey protein is beta-lactoglobulin (β-LG), so it is the leading protein in its functional behaviour. The aim of this work was the characterization of the different species in β-LG samples (55 mg/mL, phosphate buffer 20 mM, pH 6,8) which were heated at two temperatures (65 °C and 85 °C), to point out a valid relationship between the structure and certain functional properties (emulsifying and foaming). Electrophoresis (SDS-PAGE), Circular dichroism (CD) and Fluorescence quenching by

acrylamide as a quencher (to estimate surface hydrophobicity, HS), were the chosen techniques for structural characterization. The results were: 65 °C heat treatment lead to produce partially denatured non-native monomers (MNN65) of β-LG , with a slight increment in HS and without any changes in secondary structure, but some in the terciary one. On the other hand, the heat treatment at 85 °C produced the appearance of partially denatured non-native monomers (MNN85), with a significant raise in HS and modifications both in secondary and terciary structures. Aggregates of greater molecular weights (dimers, trimers, oligomers and polymers) were founded when the samples were heated for longer times at 85 °C. These structures come from MNN85 linked through disulfure bonds. Samples of the same protein but at a different concentration (1 mg/mL) were assayed too, heating them at 85 °C during the same different times. It was shown that irreversible conformational changes were fast and independient of the concentration. Functional properties were studied by emulsions and foams prepared with those protein solutions (β-LG 0,1 % P/V) previouslly heated at the two temperatures and during the different times. Oil/water emulsions were prepared with corn oil ($\phi = 0,2$) and foams, by air addition. Emulsifying activity was estimated with EAI (Emulsion activity index), from turbidity measurements. A slight raise in EAI was observed at 65 °C, while EAI decreased in 85 °C simples. Emulsion stability was verify through back-scattering measurements, where a small raise for samples treated at 65 °C and a significant decreasement for samples heated at 85 °C were observed. Foam stability was evaluated by volume measurements during the time. A great increase of stability was detected for the 85 °C samples, until a certain time of heating. The increase in emulsifying activity and stability shown for samples heated at 65 °C can be due to a more significant afinity for the oil/water interface developed for the MNN65, low molecular weight species with higher HS. In contrast, the aggregates developed at 85 °C, despite their high HS values, last more time in arriving to the interface surface because of difusión dificultéis due to their size. Hence, a decrease in EAI and in emulsion stability were observed. Foams need more time to form, so the positive effect of HS will be more important than difusion and then, in 85 °C heated samples the foam stability will increase.

PALABRAS CLAVE: *beta-lactoglobulina, tratamiento térmico, propiedades funcionales.*

KEYWORDS: *beta-lactoglobulin, heat treatment, functional properties*.

INTRODUCCIÓN

El lactosuero fue durante mucho tiempo más bien un problema dado su alto poder contaminante que un producto de interés. Los intentos por aprovechar mejor este subproducto debían pasar inevitablemente por maximizar la utilización de sus componentes potencialmente valiosos, especialmente los proteicos. El lactosuero contiene de 4 a 7 g de proteína/L, de tal forma que alrededor del 20% de las proteínas de la leche se hallan como "proteínas del lactosuero". La beta-lactoglobulina (β-LG), constituye aproximadamente el 60% de las proteínas del lactosuero, por lo que siendo la proteína mayoritaria, es la principal responsable de su comportamiento y funcionalidad (Wong et al. 1996, Korhonen et al. 1998, Cambero Rodríguez et al. 1998).

La molécula de β-LG presenta una estructura tridimensional que consiste en ocho hebras de estructura en hoja plegada, dispuestas en forma antiparalela y enrolladas de tal manera que forman un barril de cono aplanado, con un cáliz o bolsillo hidrofóbico (Busti et al. 1998, Sawyer et al. 2000). En el extremo carboxilo terminal se observa un segmento pequeño de estructura α-hélice con tres giros. Manteniendo la estructura terciaria de la molécula se hallan presentes dos puentes disulfuros formados a través de residuos Cisteína (Cys): Cys66 y Cys160 y Cys106-Cys119, quedando aún un residuo de Cys libre (Cys121) que permanece oculto en la estructura nativa. De los residuos aminoacídicos presentes, los responsables de la fluorescencia intrínseca de la molécula son los residuos Triptófano (Trp) (Trp19 y Trp61), el primero situado en la base del cáliz central hidrofóbico de la proteína y el segundo, en los bordes de dicho bolsillo hidrofóbico. (Braunitzer et al. 1973, Preaux et al. 1979).

El término "propiedades funcionales" refiere a las propiedades fisicoquímicas que las proteínas presentan en solución acuosa o en sistemas modelo simples, e incluye, entre otras, la solubilidad, la absorción de agua, la capacidad gelificante, la capacidad emulsionante y la capacidad espumante, así como la de contribuir a la estabilidad tanto de emulsiones como de espumas (Cambero Rodríguez et

al. 1998, McClements 1999). Las propiedades funcionales de proteínas nativas en solución acuosa dependen tanto de factores intrínsecos (distintos niveles de estructura, conformación, tamaño, flexibilidad, carga neta, hidrofobicidad, anfifilicidad, etc.) como extrínsecos (condiciones de entorno, tales como temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de electrolitos, etc.). La β-LG presenta fundamentalmente capacidad gelificante siendo de interés optimizar sus capacidades espumante y emulsionante (Korhonen et al. 1998).

Muchos alimentos se presentan estructuralmente como emulsiones o espumas, en las que las proteínas del lactosuero juegan un papel preponderante, dadas sus propiedades nutritivas y funcionales. La diversidad fisicoquímica y las propiedades funcionales de las proteínas del suero las hace altamente apropiadas para fines tanto alimenticios. Así estas proteínas se han ido convirtiendo en aditivos alimentarios que brindan un alto valor nutricional y una amplia funcionalidad (Cheftel et al. 1989, Quaglia et al. 1993, Wong et al. 1996, Korhonen *et al.* 1998). Actualmente se usan proteínas del lactosuero para una amplia variedad de alimentos: productos de panadería y confituras, productos lácteos, productos dietéticos, fórmulas de alimento infantil, etc.

Las proteínas, debido a sus características estructurales anfipáticas y su capacidad de desnaturalizarse y agregarse en interfases, son capaces de formar películas interfaciales de rigidez y elasticidad variables, por lo que son consideradas buenos agentes emulsionantes. Ejemplos de alimentos donde las proteínas actúan como agentes emulsionantes son: la leche, la manteca, la mayonesa, salsas, helados, etc. Para que una proteína tenga buenas características emulsionantes y/o espumantes debe presentar buena hidrofobicidad superficial y alto grado de flexibilidad. Cuando una molécula proteica entra en contacto con la interfase, los restos de aminoácidos no polares se orientan hacia la fase oleosa y la proteína se adsorbe espontáneamente. Durante la adsorción, las proteínas se despliegan y forman una monocapa molecular resistente, cohesiva y elástica. Cuanto más desnaturalizada esté la proteína, mayor cantidad de grupos hidrofóbicos expondrá y por lo tanto mayor capacidad estabilizante para la emulsión tendrá, por su mayor tendencia a ubicarse en la interfase agua-aceite; cuanto mayor sea su coeficiente de difusión más rápido llegará a la interfase acuosa-lipídica, estabilizándola; cuanto más flexible sea, mejor capa estabilizadora de la interfase, constituirá.

En la mayoría de los alimentos que implican la presencia de espumas, las proteínas son los agentes que logran la formación y estabilización de la fase gaseosa dispersa, formando una barrera protectora elástica entre las burbujas de gas atrapadas. Las características que hacen de una proteína un buen agente emulsionante, también, en general, la harían un buen agente espumante.Por otro lado, para aumentar la estabilidad de la espuma, deberá formarse una película estable rodeando la burbuja de aire, con determinadas características reológicas, para lo cual las moléculas de proteína adsorbidas tienen que asociarse entre sí (ya sea por puentes disulfuro o por interacciones hidrofóbicas) para formar agregados de gran tamaño. La proteína deberá poseer ambos efectos: tensoactivo y formador de película, al mismo tiempo para estabilizar más eficientemente a las espumas.

La capacidad estabilizante de espumas que presente una proteína será modificada tanto por factores del entorno (pH, fuerza iónica y temperatura), como por factores relacionados con la propia proteína (concentración proteica, solubilidad, hidrofobicidad superficial, carga neta y superficial, flexibilidad, tamaño molecular, etc) (Wagner 2000).

El proceso de desnaturalización puede provocar en las proteínas del suero una serie de efectos indeseados, pero paralelamente pueden mejorar sus propiedades superficiales. El proceso de desnaturalización térmica de la β-LG ha sido estudiado en un amplio rango de entornos fisicoquímicos, la mayoría de las veces a pH cercanos a la neutralidad, condición de relevancia práctica en los procesos lácteos industriales (Ruegg *et al.* 1977, Pagliarini *et al.* 1990, Griffin *et al.* 1993, Iametti *et al.* 1996, Relkin 1996, Dalgleish *et al.* 1997, Prabakaran *et al.* 1997, Busti *et al.* 2005). La desnaturalización térmica de la β-LG comienza alrededor de los 65 °C, seguido de un proceso de dimerización y polimerización. El cambio conformacional inicial que implica la exposición del residuo Cys y de puentes disulfuro (Cys 106-119), hace que el monómero de β-LG entre en un estado de alta reactividad. Los monómeros interaccionan entre sí, estableciendo enlaces vía intercambio disulfuro-sulfhidrilo entre ellos, y generando la formación de dímeros. Estos dímeros reactivos a su vez, comienzan la propagación de la polimerización al alcanzar una concentración crítica (Griffin *et al.* 1993, Prabakaran *et al.* 1997, Busti *et al.* 2005). Estudios espectroscópicos demostraron que cuando la β-LG es calentada por encima de 65-70 °C, ocurren cambios irreversibles en su estructura, con la formación de agregados. En general, puede decirse que, por debajo de 55 °C,

las soluciones de β-LG son una mezcla de monómeros y dímeros; entre 55 y 90 °C, el calentamiento induce cambios irreversibles en la proteína y se forman agregados de bajo peso molecular; y finalmente, a temperaturas mayores a los 90 °C, se forman agregados de mayor peso molecular.
En el presente trabajo se estudió el comportamiento de la β-LG al ser sometida a calentamiento, a dos diferentes temperaturas (65 y 85 °C) y durante distintos períodos de tiempo, haciendo un seguimiento de los cambios estructurales que dicho calentamiento provoca en la proteína y de la consecuente repercusión que se da en sus propiedades funcionales, especialmente en lo que hace a sus capacidades emulsionantes y espumantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Soluciones de β-LG

β-LG AB bovina (Sigma Chemical Co, USA) 55 mg/mL (aproximadamente 3 mM) y 1 mg/mL, ambas en buffer fosfato 20 mM pH 6,8. Las concentraciones se determinaron por lectura de Absorbancia a 278 nm.

Solución de acrilamida

Droga sólida 5 M en buffer fosfato 20 mM pH 6,8

Tratamiento térmico de la β-LG

A diferentes fracciones de una solución inicial de β-LG 55 mg/mL (ó 1 mg/mL) en buffer fosfato 20 mM pH 6,8, se calentaron a 65 y a 85 °C por diferentes tiempos: 0 (fracción no sometida a tratamiento térmico), 1, 3, 5, 7, 10, 15 y 30 minutos. Cada muestra fue enfriada en baño de agua-hielo hasta temperatura ambiente.

Extinción de fluorescencia

3 mL de cada muestra proteica se titularon con solución de acrilamida 5 M, registrándose en el espectrofluorómetro las intensidades de fluorescencia ante el agregado de sucesivas alícuotas de solución de acrilamida 5 M, con una longitud de onda de excitación de 295 nm y de emisión de 337 nm. Se consideró como intensidad de fluorescencia inicial (F_0) a la obtenida con la muestra antes del primer agregado de acrilamida. El rango de concentraciones de extintor abarcado en la técnica fue de 0 a 0,2 M. Los resultados obtenidos se representaron en un gráfico de Stern-Volmer (F°/F vs. concentración de acrilamida). La ecuación de Stern-Volmer plantea que:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

donde: K_{SV} : constante de Stern-Volmer para la extinción dinámica de la fluorescencia; [Q] : concentración del agente extintor acrilamida.

Electroforesis en geles de poliacrilamid

β-LG (55 mg/mL y 1 mg/mL) nativa y precalentada a 65 °C y a 85 °C, por diferentes tiempos, en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (Laemmli 1970) con un Mini Protean III (Bio-Rad Laboratories, USA). Los geles obtenidos, fueron scanneados con el programa de scanner Scan Jet 5p Hewlett-Packard. Para cuantificar las intensidades relativas de las bandas obtenidas, se utilizó un software desarrollado por nuestro grupo de investigación. Los pesos moleculares de cada banda proteica fueron comparados con los estándares conocidos de referencia.

Dicroísmo circular(DC)

Las soluciones de β-LG (25 µM para el UV lejano y 164 µM para el UV cercano) sometidas a tratamiento térmico fueron estudiadas utilizando un espectropolarímetro (Jasco J-810, Japón), tiempo de integración de 2 s, ancho de banda de 2 nm. Para las experiencias en el UV lejano: λ = 190 - 250 nm y para las del UV cercano, entre 250 y 320 nm; se utilizaron sendas celdas de camino óptico de 0,1 y 1 cm, respectivamente.
La elipticidad (θ) se calculó según la siguiente ecuación, y sus unidades se expresaron en grados:

$$\theta = 2{,}303 \cdot (A_I - A_D) \cdot \frac{180}{4\pi} = 33 \cdot \Delta A \qquad (3.2)$$

Los datos obtenidos de las experiencias de DC se reportaron como "elipticidad molar media por residuo": [θ]MRW (grado .cm2. dmol-1).

$$[\theta]_{MRW} = \frac{\theta}{10 \cdot C \cdot l \cdot n}$$

donde : θ : elipticidad (miligrados); C: concentración de la muestra (M); l: camino óptico (cm)
n: número de aminoácidos (para la β-LG, el valor de n es aproximadamente 162).
Se analizaron los espectros del UV lejano para intentar inferir la presencia de diferentes proporciones de conformaciones α-hélice, hoja plegada β y ovillo estadístico. Para ello, se utilizó un software (CONTIN) (Chang et al. 1978).

Preparación de emulsiones

Soluciones proteicas 0,1% en buffer fosfato 20 mM pH 6,8 a las que se les agregó un volumen de fase oleosa (aceite de maíz) manteniendo una ϕ = fracción de volumen de fase aceite = 0,20. Agitación mecánica de la mezcla con un homogeneizador de alta velocidad (Braun Vario, Argentina), modificado por el equipo de trabajo, a 10000 rpm durante 1 minuto. Todas las emulsiones fueron hechas a temperatura ambiente.

Turbidimetría: Método de Pearce-Kinsella

De las emulsiones formadas se extrajeron sendas alícuotas de 30 μL a ciertos tiempos, llevándolas a 3 mL con solución de SDS ,en % P/V en buffer fosfato 20 mM pH 6,8 (dilución 1/100). Se midieron las Absorbancias a 500 nm (Pearce et al. 1978). Se calculó el EAI de acuerdo con la modificación planteada por Cameron (Cameron et al 1991):

$$EAI = \frac{2 \cdot T}{(1-\phi) \cdot C} \qquad T = \frac{2{,}303 \cdot A \cdot f}{l}$$

donde: T: turbidez; ϕ : fracción de volumen de fase aceite = 0,20; C : concentración de proteína (103 g/m3); A: absorbancia a 500 nm; f : factor de dilución; l : camino óptico = 0,01 m. Las unidades del EAI son m2/g.

Reflectancia difusa(BS)

Las emulsiones fueron analizadas con un Vertical Scan Analyzer (Coulter QuickScan, Beckman, Fullerton, CA, USA) (Mengual et al 1999a, Mengual et al. 1999b).Las curvas de BS se obtuvieron a intervalos de 1 minuto y registrando las diferentes alturas del tubo (en mm), siendo la altura total del tubo, 60 mm. Se tomaron los valores medios de BS en la zona de 10-15 mm de altura de tubo en función del tiempo post-emulsión. Los valores de BS a cada tiempo se refirieron al valor inicial (BSo).Todas las experiencias se realizaron por duplicado y a temperatura ambiente (20 °C).

Evaluación de Actividad Espumante y Estabilidad de la espuma formada

Las medidas de las alturas alcanzadas por las espumas se realizaron en un dispositivo de medida diseñado por el propio grupo de investigación, consistente en una columna de acrílico (de 22 cm de longitud y 3,5 cm de diámetro), con un disco poroso de vidrio sinterizado en su base, a la que se le adaptó un catéter por el que se puede insuflar nitrógeno y se adosó a la columna de acrílico una escala graduada en cm. Para cada experiencia se colocaron en la columna 20 mL de solución de β-LG. Se insufló nitrógeno a la muestra a una velocidad de flujo constante (5 mL/s). Se registraron los cambios de las alturas con el tiempo, realizando filmaciones con una cámara digital (Olympus DS-580 de 4,0 megapixeles). El parámetro utilizado para estimar la estabilidad de la espuma fue el cociente entre el volumen de espuma a diferentes tiempos, y el volumen de espuma inicial (al momento de cesar el insuflado de gas), el que se denominó "Volumen relativo".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Electroforesis en SDS-PAGE

Aunque durante la investigación se trabajó a las dos temperaturas (65 °C y 85 °C) como ya se ha mencionado, en las corridas electroforéticas correspondientes a calentamientos de la β-LG a 65 ºC, se

detectó la presencia únicamente de monómeros, indicando por lo tanto que a esa temperatura no se verifican cambios en el peso molecular de la proteína (imagen no incluida).

Según bibliografía previa (de la Fuente et al. 2002), se sabe que la β-LG sometida a calentamiento por encima de 65 ºC sufre cambios que afectan su estructura terciaria y cuaternaria. El primer cambio observable es la disociación de los dímeros nativos en monómeros. A continuación el monómero nativo se desnaturaliza parcialmente, provocando una mayor exposición al solvente del grupo sulfhidrilo libre y de residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Este monómero es un "monómero reactivo" que comienza a agregarse a través de la formación de puentes disulfuro intermoleculares y de interacciones no covalentes de tipo hidrofóbico. Los grupos tioles desempeñan un papel crucial en la agregación de la β-LG inducida por calentamiento, actuando como iniciadores en reacciones de intercambio tiol/disulfuro. La formación de puentes disulfuro intermoleculares hacen irreversible el proceso de agregación, y en cierta manera evita interacciones no covalentes de las estructuras modificadas. Estas interacciones no covalentes de tipo hidrofóbico toman importancia en el proceso global de agregación solamente a temperaturas superiores a la temperatura global de desnaturalización de la β-LG (entre 70 y 75 ºC). El medio no reductor usado en las electroforesis (SDS-PAGE) permite la dispersión de los agregados unidos a través de interacciones hidrofóbicas, mientras que los agregados unidos por puentes disulfuro permanecen intactos.

Cuando se realizaron las corridas electroforéticas de la β-LG sometida a calentamiento a 85 °C durante diferentes tiempos, se observaron imágenes como la de la **Figura 1**, donde puede observarse que la muestra sin tratamiento térmico presenta una banda intensamente coloreada, correspondiente al monómero nativo (I), y una banda correspondiente al dímero, apenas visible. Después de un breve período de calentamiento a 85 ºC (1 minuto), la intensidad de la banda correspondiente al dímero aumenta y aparece una banda adicional correspondiente al trímero. La proporción máxima de dímeros y trímeros se observa entre 1 y 3 minutos de calentamiento a 85 ºC. Después de los 3 minutos, las bandas que corresponden a monómeros, dímeros y trímeros comienzan a disminuir en intensidad. Por sobre este tiempo de calentamiento a la citada temperatura, las especies predominantes son agregados de más de tres moléculas de β-LG desnaturalizada unidas por puentes disulfuro intermoleculares (oligómeros y polímeros) que no penetraron en el gel de corrida.

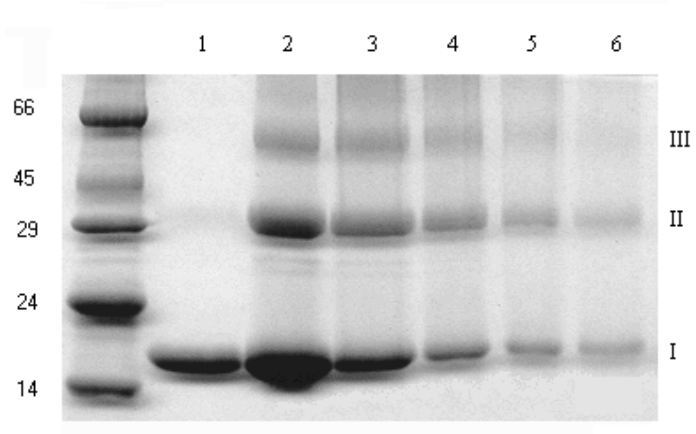


Figura 1. SDS-PAGE en medio no reductor de soluciones de β-LG pre-calentadas a 85ºC durante 0 minutos (línea1), 1 minuto (línea 2), 3 minutos (línea 3), 5 minutos (línea 4), 10 minutos (línea 5) y 15 minutos (línea 6); I: monómeros de β-LG; II: dímeros; III: trímeros. Solamente se muestra el gel de corrida (15 %). M: marcadores de peso molecular (kDa).

La **Figura 2** muestra las concentraciones relativas de las distintas especies de β-LG presentes durante el calentamiento a 85 ºC a distintos tiempos, datos derivados del análisis de las intensidades relativas de las bandas observadas en la **Figura 1**. Se evidencia en esta figura que los oligómeros y los polímeros comienzan a formarse cuando las concentraciones de dímeros y trímeros sobrepasan el máximo de concentración. Dímeros y trímeros son productos intermediarios que rápidamente son convertidos en oligómeros y polímeros. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros

autores (Prabakaran et al. 1997). Después de los 5 minutos de calentamiento, las especies multiméricas representan más del 60 % del total de especies presentes.

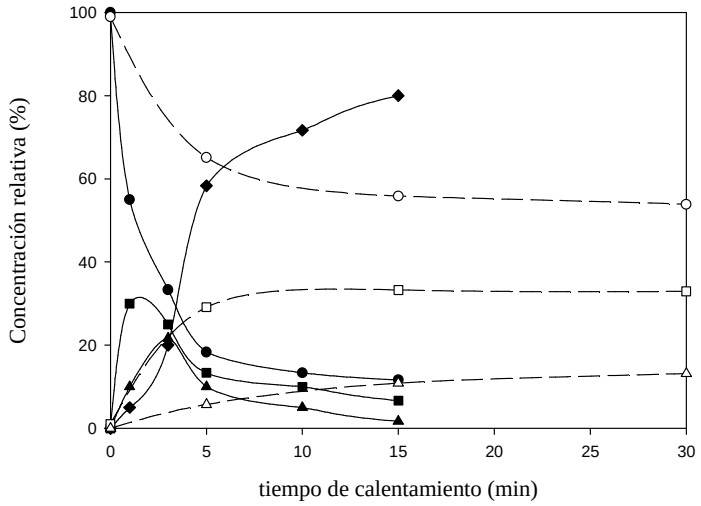


Figura 2. Concentración relativa de monómeros (□), dímeros (■), trímeros (▲), y agregados de mayor peso molecular (oligómeros y polímeros) (♦) de soluciones de β-LG 55 mg/mL, formados por calentamiento a 85 ºC. Concentración relativa de monómeros (○), dímeros (□), trímeros (□) formados por calentamiento a 80 ºC de soluciones de β-LG 1 mg/mL (condiciones ensayadas por Kim y col., 2005).

Hoffmann et al. (1997) demostraron que a una dada temperatura de calentamiento, el tamaño promedio de los agregados formados disminuye cuando la concentración decrece. En uno de las últimas publicaciones sobre calentamiento de la β-LG (Kim et al. 2005) calentaron a 80 ºC durante 30 minutos una solución de β-LG de concentración 1 mg/mL (en buffer fosfato 20mM, pH 6,8). Repitiendo esta experiencia en el presente trabajo, solamente se encontraron presentes monómeros, dímeros y trímeros (**Figura 2**). Oligómeros y polímeros de β-LG de alto peso molecular no se detectaron en las condiciones ensayadas por estos autores.

Dicroísmo Circular

Examinando la **Figura 3** (65 °C; DC en UV lejano) se observa que calentamientos a 65 ºC de la β-LG no provocan cambios en su estructura secundaria, ya que los espectros de DC en el UV lejano para los diferentes tiempos de calentamiento se superponen unos a otros.

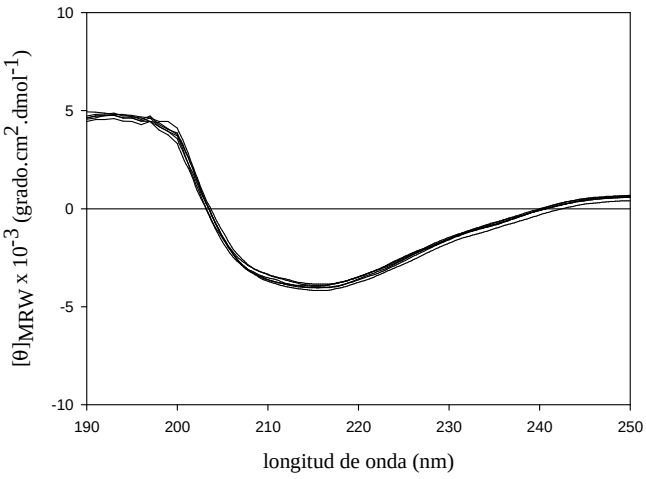


Figura 3. Espectros de DC en el ultravioleta lejano de soluciones de β-LG tratadas previamente a 65 ºC durante distintos tiempos: 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15 minutos.

En cambio, en la **Figura 4** (65 °C; DC en UV cercano) se evidencian cambios parciales en la estructura terciaria de la proteína. Relacionando estos espectros para β-LG calentada previamente a 65 °C con lo observado y citado anteriormente para las corridas electroforéticas, son hechos coherentes que reafirman que a esta temperatura solamente están presentes los monómeros de la proteína.

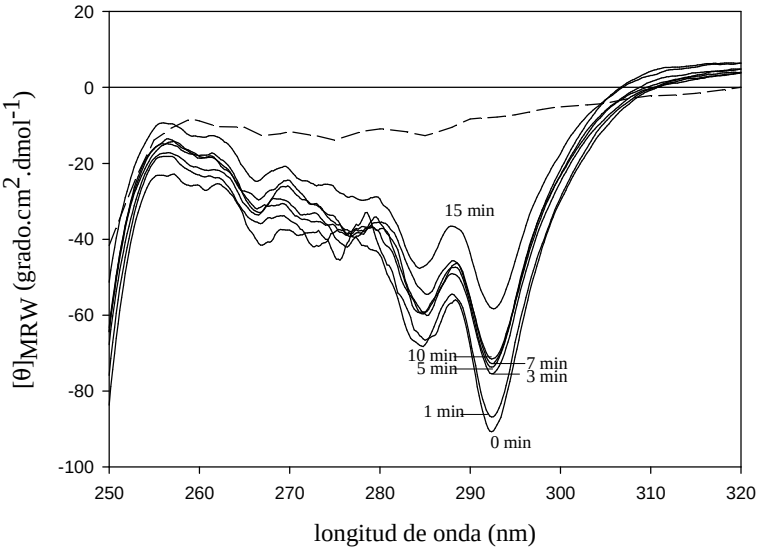


Figura 4. Espectros de DC en el ultravioleta cercano de soluciones de β-LG tratadas previamente a 65 ºC durante distintos tiempos. Con línea (---) se representa el espectro de β-LG en urea 8 M.

Los efectos del calentamiento a 85 ºC de soluciones de β-LG sobre los espectros de DC en el ultravioleta lejano son mostrados en la **Figura 5**. El pico negativo se desplaza gradualmente de la región de los 210-220 nm hacia la de 200-210 nm, indicando una progresiva conversión de las estructuras periódicas en α-hélice y hoja plegada β en estructuras aperiódicas con el calentamiento. La **Tabla 1**, obtenida a partir del análisis de los espectros de DC de la **Figura 5**, pone en evidencia este desplazamiento hacia estructuras tipo ovillo estadístico. Los cambios son pronunciados a los 3 minutos de calentamiento, disminuyendo las variaciones a tiempos superiores de calentamiento. Calentamientos por encima de los 7 minutos producen cambios similares en la estructura secundaria de la proteína. Los distintos porcentajes de estructura secundaria, obtenidos a partir de los datos de DC en el UV lejano para la β-LG pre-tratada térmicamente a 85 ºC durante diferentes tiempos (**Figura 5** y **Tabla 1**), coinciden con los datos obtenidos por otros autores (Kim et al. 2005), tratando soluciones de β-LG de muy baja concentración proteica (1 mg/mL). Sin embargo, existen diferencias significativas entre las soluciones concentradas ensayadas en el presente trabajo y las soluciones diluidas usadas por estos autores, respecto de la abundancia relativa de las especies encontradas en solución después del calentamiento y posterior enfriamiento a temperatura ambiente, como se discutió previamente en el análisis electroforético.

Tabla 1. Composición porcentual de distintos tipos de estructura secundaria de la β-LG en solución, sometida a calentamiento previo a 85°C, durante diferentes tiempos y a pH 6,8.

Tiempo de calentamiento (minutos)	% α-Hélice	% Hoja plegada β	% Ovillo estadístico
0	15	45	40
1	15	43	42
3	13	42	45
5	12	42	46
7	11	41	48
10	10	40	50
15	10	40	50

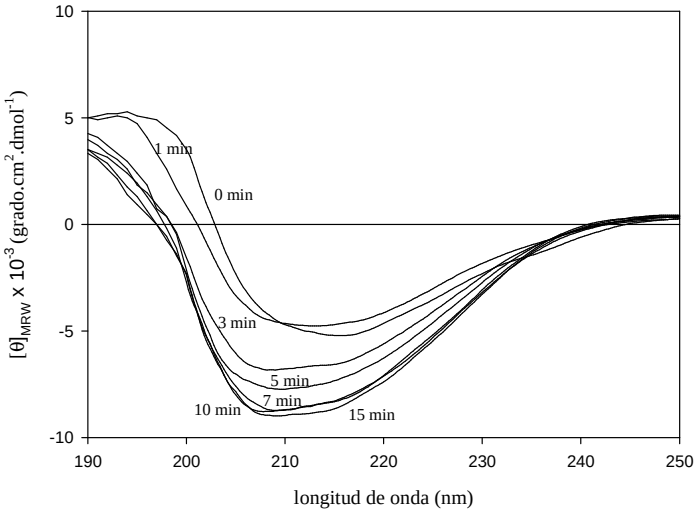


Figura 5. Espectros de DC en el ultravioleta lejano de soluciones de β-LG tratadas previamente a 85 ºC durante distintos tiempos.

Los espectros de DC en el UV cercano, son útiles para caracterizar la estructura terciaria de las proteínas. El entorno en el que se hallan los residuos de aminoácidos aromáticos es el responsable de estos espectros (Greenfield 2004). Los picos de elipticidad negativa que se encuentran a aproximadamente 285 y 292 nm en los espectros de DC de soluciones de β-LG nativa en solución acuosa, se deben principalmente a la absorbancia del Trp19 (Creamer 1995, Gast 2001). El tratamiento térmico de las soluciones de β-LG a 85 ºC causó una disminución en la profundidad de picos negativos señalados (**Figura 6**). Este hecho refleja cambios estructurales que ocurren dentro del bolsillo hidrofóbico o cáliz de la molécula de β-LG, donde se localiza el Trp19 (Manderson et al. 1999). El cambio es pronunciado a los 3 minutos de calentamiento a 85 ºC. Tiempos mayores de calentamiento no producen mayores cambios en la estructura de la β-LG, de manera similar a lo que ocurre con los espectros de DC obtenidos en el ultravioleta lejano. Se observa que los cambios obtenidos entre 260 y 290 nm por calentamiento a 85 ºC son menores que los obtenidos para la β-LG desnaturalizada en presencia de urea 8,0 M (pH 6,8). Esto evidencia la presencia de cierta estructura terciaria en las moléculas proteicas después del tratamiento térmico.

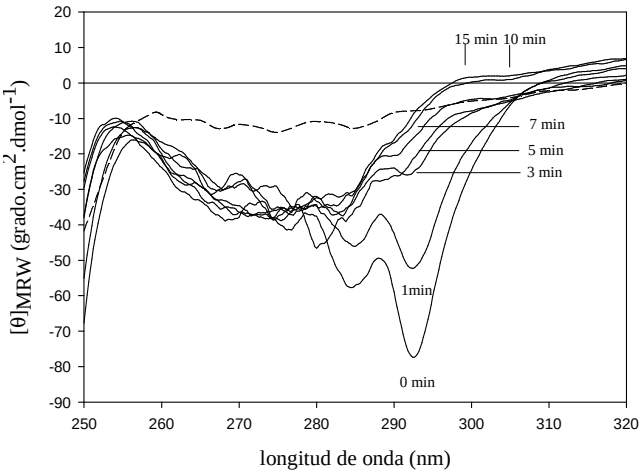


Figura 6. Espectros de DC en el ultravioleta cercano de soluciones de β-LG tratadas previamente a 85 ºC durante distintos tiempos. Con línea (---) se representa el espectro de β-LG en urea 8 M.

Iametti et al. (1995) demostraron que los monómeros nativos de β-LG térmicamente tratada se desnaturalizan parcialmente formando monómeros no nativos que presentan una mayor exposición al solvente del sulfhidrilo libre (Cys121) y de grupos hidrofóbicos internos (Palazolo et al. 2000). Esta desnaturalización parcial es reversible. Sin embargo, se determinó la presencia de monómeros no nativos, que permanecen en solución aun después del enfriamiento de las muestras calentadas (Manderson et al. 1998). Algunos de los autores citados sugieren que estas especies son formadas irreversiblemente por reordenamiento de los puentes disulfuro intramoleculares. Croguennec et al. (2004) confirmaron la presencia de monómeros no nativos que por reacción intramolecular de intercambio tiol/disulfuro entre Cys121 y Cys106-Cys119 resultan en una estructura monomérica parcialmente desnaturalizada con exposición de un sulfhidrilo libre Cys119 y un puente disulfuro Cys106-Cys121. Estos autores denominaron a esta estructura Mcys119 para diferenciarla de la propuesta por Iametti y col. (1996), a la que denominaron Mcys121. Mcys121 es más reactiva que la Mcys 119 para intercambios tiol/disulfuro intermoleculares que lleven a la formación de agregados unidos por enlaces covalentes. Sin embargo, esta estructura es reversible a monómero tipo nativo cuando el sistema es enfriado. Mcys119 es menos reactiva; pero su formación es irreversible.

Evidentemente, los monómeros no nativos formados irreversiblemente por calentamiento a 65 ºC y posterior enfriamiento no son los mismos que los formados a 85 ºC (Mcys119, por ejemplo), debido a que estos últimos presentan una estructura secundaria bien diferenciada de la de los monómeros nativos de β-LG. Fessas et al. (2001), utilizando medidas calorimétricas, demostraron la presencia de dos dominios estructurales independientes en la molécula β-LG con distinta estabilidad térmica. Un primer dominio que presenta una temperatura de transición irreversible cercana a los 60 ºC, indetectable por medidas espectroscópicas, y un segundo dominio más estable, que es el que contiene al Trp19, y cuya temperatura de desnaturalización es la determinada cerca de los 70 ºC. Es probable, por lo tanto, que las medidas experimentales a 65 ºC presentadas en este trabajo, evidencien la presencia de monómeros no nativos con cambios estructurales irreversibles que involucren al primer dominio descubierto por los autores citados (Fessas et al. 2001). Estos cambios irreversibles se darían mayormente en la estructura terciaria de la proteína.

Estos resultados indicarían que los cambios conformacionales irreversibles por encima de la Tm de la β-LG monomérica son rápidos e independientes de la concentración de proteína, mientras que la presencia de especies irreversiblemente formadas (monómeros desnaturalizados unidos por puentes disulfuro que forman estructuras de mayor peso molecular) sí es fuertemente dependiente de la concentración de β-LG. Croguennec et al. (2004) demostró que a pHs próximos al neutro (pH 6,6), fuerza iónica menor a 15 mM y temperaturas superiores a 85 ºC (condiciones semejantes a las ensayadas en el presente trabajo) el paso de agregación es el limitante de la velocidad de reacción en comparación con el de desnaturalización.

Otra conclusión que se puede extraer de los resultados hasta aquí obtenidos es que la desnaturalización de los monómeros es parcial y no se ve mayormente afectada cuando los monómeros se unen covalentemente para formar dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros de alto peso molecular.

Extinción de fluorescencia intrínseca con acrilamida

En el rango de extintor usado, los gráficos de Stern-Volmer para la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β-LG por agregado de acrilamida son aproximadamente lineales (**Figura 7** y **Figura 8**). De este modo, dichos gráficos pueden ajustarse por la ecuación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q]$$

que representaba la ecuación para el sector lineal de dichas gráficas. En estas figuras se muestran los resultados de la extinción de fluorescencia intrínseca de la β-LG precalentada a diferentes tiempos, a 65 °C y a 85 °C, respectivamente, siguiendo el protocolo habitual ya descripto.

En este caso, K es una constante aparente (Kap) debido a que la β-LG posee más de un residuo de Trp cuya fluorescencia puede ser extinguida por la presencia de acrilamida. Esta constante puede ser usada como medida de HS. De las pendientes de los gráficos de Stern-Volmer se obtuvieron entonces las distintas Kap que se representan en la **Figura 9**. Del análisis de las **Figuras 7**, **8** y **9**, puede observarse que el calentamiento provoca un aumento de la HS, más pronunciado a 85 ºC que a 65 ºC. A pesar de

esto, debe notarse nuevamente, que el efecto de la acrilamida en la fluorescencia de la β-LG sometida a calentamiento previo es sustancialmente menor que el obtenido sobre la β-LG desnaturalizada en urea 8 M. Este resultado señala la presencia de una estructura residual en las especias formadas por calentamiento y posterior enfriamiento, confirmando que en estas estructuras los residuos de Trp no son totalmente accesibles al extintor.

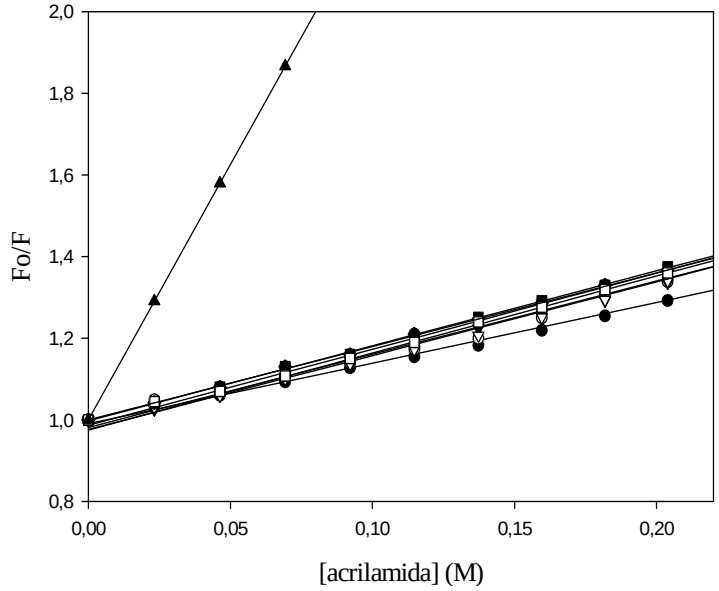


Figura 7. Gráficos de Stern-Volmer correspondientes a la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β-LG por adición de acrilamida. β-LG sometida a calentamiento previo a 65 ºC durante distintos tiempos 0 (●), 1 (○), 3 (▼), 5 (□), 7 (■), 10 (□) y 15 minutos (♦). β-LG en urea 8M (▲). Cada punto es el promedio de tres mediciones.

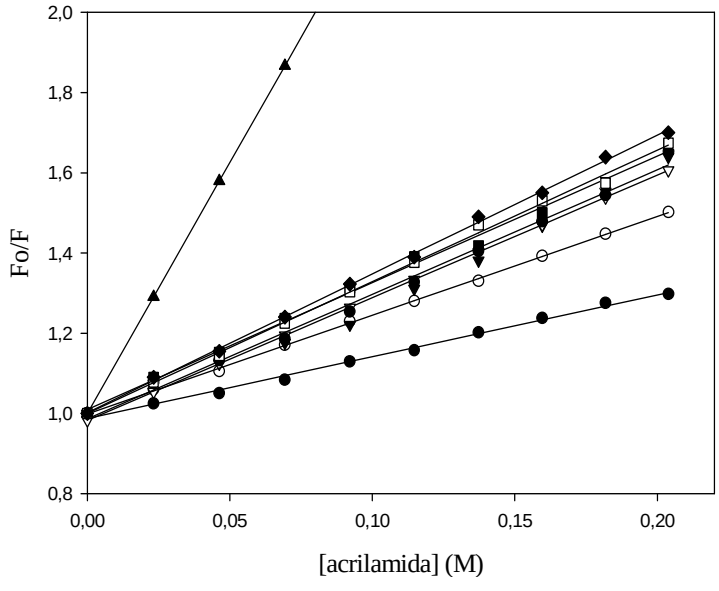


Figura 8. Gráficos de Stern-Volmer correspondientes a la extinción de la fluorescencia intrínseca de la β-LG por adición de acrilamida. β-LG sometida a calentamiento previo a 85 ºC durante distintos tiempos 0 (●), 1 (○), 3 (▼), 5 (□), 7 (■), 10 (□) y 15 minutos (♦). β-LG en urea 8M (▲). Cada punto es el promedio de tres mediciones.

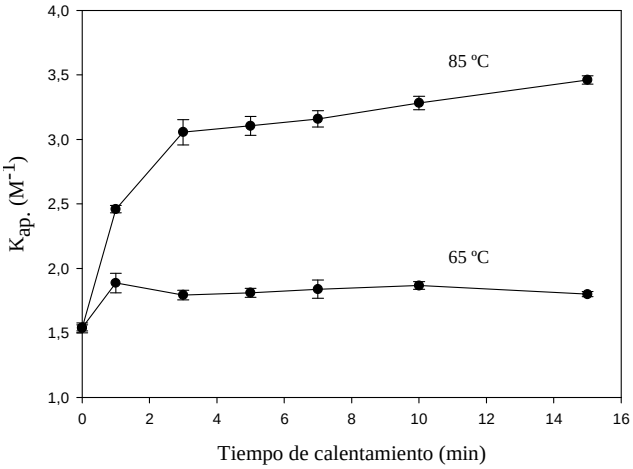


Figura 9. Valores de Kap obtenidos a partir de los gráficos de Stern-Volmer de las Figuras 8 y 9. Cada punto es el promedio de tres mediciones.

Otra concordancia con las medidas de DC es evidenciar la rapidez con que se dan los cambios conformacionales por tratamiento térmico, ya que solamente 3 minutos de calentamiento son suficientes para producir los cambios más pronunciados en la estructura terciaria de la proteína. La **Figura 7** evidencia que los cambios irreversibles producidos por calentamiento a 65 ºC, son detectables por medidas espectroscópicas, y que además involucra a los residuos de Trp, contrariamente a lo señalado por otros autores (Fessas et al. 2001).

Estudio de la actividad y estabilidad emulsionante de las soluciones de β-LG sometidas a tratamiento térmico previo

Para el estudio de las propiedades funcionales de la β-LG modificada por calentamiento previo, se procedió a calcular el "índice de actividad emulsionante" (EAI), basado en el método turbidimétrico (Pearce et al. 1978), y utilizando la modificación que del mismo realizaran Cameron et al. (1991).

Así, la actividad emulsionante de la β-LG, estimada a través de los EAI, para emulsiones aceite/soluciones de β-LG, a las dos temperaturas ensayadas, es mostrada en la **Figura 10**. Con el calentamiento previo a 65 ºC la actividad emulsionante aumenta, mientras que para calentamientos a 85 ºC se observa, contrariamente, una disminución en dicho parámetro. Los cambios son más pronunciados a 85 ºC, alcanzándose valores máximos de modificación del EAI a tiempos de calentamiento muy cortos.

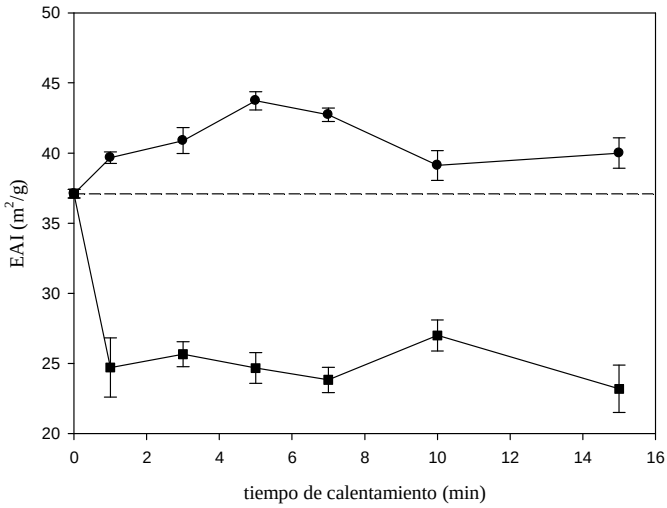


Figura 10. Índice de actividad emulsionante (EAI) de la β-LG en función de calentamientos previos durante diferentes tiempos a (●) 65 ºC y a (■) 85 ºC. Las medidas se realizaron por triplicado.

Para evaluar la estabilidad de las emulsiones formadas en presencia de β-LG previamente sometida a calentamiento a las dos temperaturas ensayadas en el presente trabajo, se escogió el parámetro $t_{0,8}$ correspondiente a las experiencias de reflectancia difusa, entendido como el tiempo que debe transcurrir para que la medida de reflectancia difusa inicial de la emulsión en estudio disminuya un 20%. Los resultados se muestran en la **Figura 11**. Vemos que el calentamiento previo a 65 ºC aumenta la estabilidad de las emulsiones formadas, mientras que a 85 ºC se observa, contrariamente, una disminución en dicho parámetro. Los cambios son pronunciados a tiempos iniciales de calentamiento previo (3 minutos).

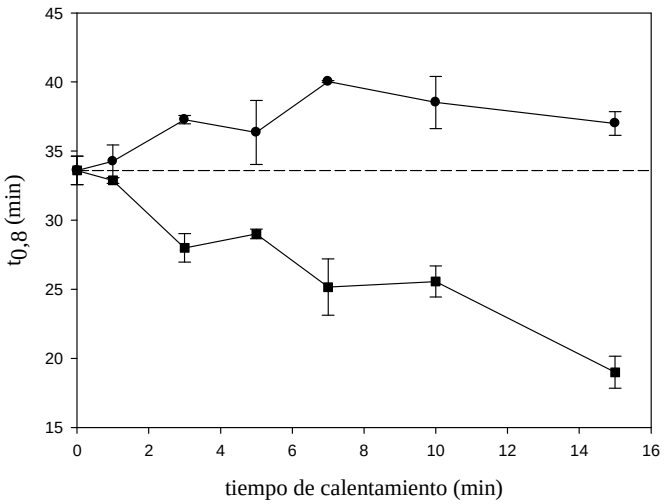


Figura 11. Estabilidad de las emulsiones formadas estimadas a través del $t_{0,8}$ (medidas de reflectancia difusa) en función de calentamientos previos durante diferentes tiempos a (●) 65 ºC y a (■) 85 ºC. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Estudio de la actividad y estabilidad espumante de las soluciones de β-LG sometidas a tratamiento térmico previo

Según los resultados obtenidos, la actividad espumante de la β-LG sometida a calentamientos previos durante diferentes tiempos, tanto a 65 °C como a 85 °C, no varía ni con la temperatura ni con el tiempo de calentamiento, de acuerdo con las condiciones ensayadas para su determinación (resultados no mostrados). Tampoco se comprobaron cambios significativos en la estabilidad de las espumas formadas a 65 ºC (resultados no mostrados). Sin embargo, se apreciaron cambios notables en la estabilidad de las espumas formadas a partir de soluciones de β-LG calentadas previamente a 85 ºC durante diferentes tiempos (**Figura 12**). El parámetro de seguimiento para evaluar la estabilidad de las espumas formadas es el "Volumen relativo", cociente entre el volumen de espuma a diferentes tiempos y el volumen de espuma inicial (al momento de cesar el insuflado de gas).

La estabilidad de las espumas formadas aumentó con el calentamiento previo hasta parecer alcanzar un máximo entre los 5 y los 10 minutos. Tiempos de calentamiento superiores a los 10 minutos produjeron un colapso rápido de la espuma. Se observó que mayores tiempos de calentamiento a 85 ºC de soluciones de β-LG provocan la formación de espumas más estables, contrariamente a lo que sucede con las emulsiones vistas anteriormente. Como ya se dijo en la Introducción de este trabajo, no sería en sí un hecho preocupante para analizar, ya que una proteína puede poseer buenos efectos emulsionantes y no necesariamente espumantes, de igual modo en lo que respecta a su acción como agente estabilizante de estos sistemas. En la misma **Figura 12**, puede observarse que para tiempos de calentamiento de 15 minutos, se provoca el colapso de la espuma correspondiente. La explicación de estos resultados residiría en que los tiempos iniciales requeridos para la formación de espumas ("short-term stabilization") son más largos que los requeridos para la formación de emulsiones y que, a pH cercanos a 7,0, las propiedades reológicas interfaciales de los films producidos en presencia de β-LG tratada térmicamente no influencian la estabilidad de las espumas formadas ("long-term stabilization") (Kim et al. 2005). De esta manera, el efecto retardador del incremento en el peso molecular no es suficiente para contrarrestar el beneficioso aumento en la hidrofobicidad superficial, viéndose

aumentada la adsorción en la interfase aire/agua durante el período inicial, y consiguientemente aumentando la estabilidad de la espuma formada.
Sin embargo, los agregados formados a tiempos de calentamiento a 85 ºC durante 15 minutos o más, son tan grandes que provocan el colapso de la espuma, de manera similar a lo producido por partículas de tamaño considerable sobre la estabilidad de las espumas.

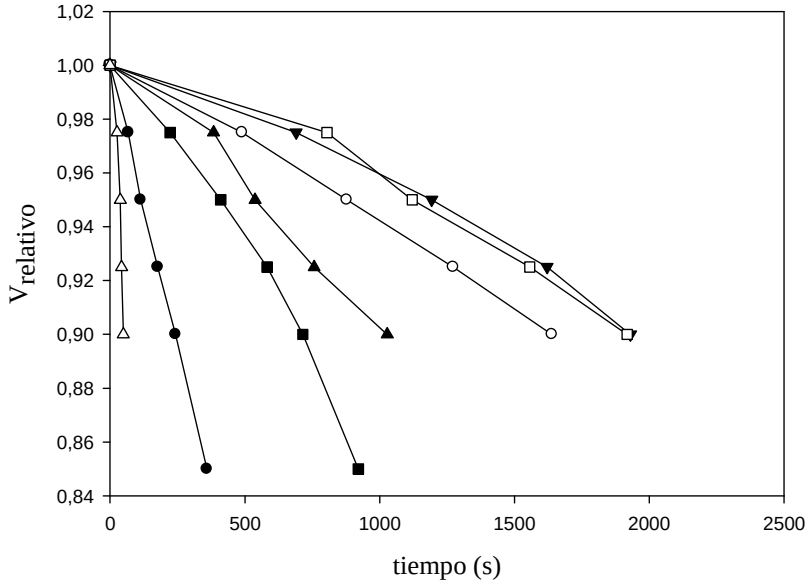


Figura 12. Estabilidad de las espumas formadas a partir de soluciones de β-LG calentadas previamente a 85 ºC durante distintos tiempos (min): (●) 0, (■) 1, (▲) 3, (▼) 5, (○) 7, (□) 10 y (Δ) 15. Las experiencias se realizaron por duplicado.

Vinculación de los cambios en las propiedades funcionales de la β-LG con sus modificaciones estructurales provocadas por efecto del tratamiento térmico

En la preparación de cualquier sistema disperso como una emulsión o una espuma, se distinguen dos tipos de ingredientes: el agente emulsionante o espumante y el agente estabilizador, sea de la emulsión o de la espuma respectivamente (Dickinson et al. 1987, Dickinson 1992, Dickinson 2003). Tanto unos como otros pueden ser especies químicas sencillas o una mezcla de especies químicas. Un agente emulsionante o espumante promueve la formación y estabilización a corto plazo de la emulsión o de la espuma ("short-term stabilization"), por acción en la interfase de los sistemas. Un agente estabilizador confiere estabilidad a largo plazo a la emulsión o espuma en cuestión ("long-term stabilization"), no necesariamente por el mecanismo de adsorción en sí en las interfases, sino también por formar películas viscoelásticas alrededor de las gotas de aceite o de las burbujas de aire, a través de interacciones intermoleculares no covalentes y covalentes, las que constituyen importantes factores en la estabilidad de las dispersiones coloidales (Murray et al. 1996).
Las proteínas tienen una gran tendencia a adsorberse en las interfases aceite/agua o aire/agua, formando capas alrededor de las gotas de emulsión o de las burbujas de espuma. Es por esto que son sustancias aptas para cumplir con ambos roles: emulsionantes o espumantes y estabilizantes de emulsiones y espumas.
Durante la formación de un sistema disperso, tales como los que se están analizando en el presente trabajo, la proteína debe adsorberse rápidamente a la interfase para prevenir la coalescencia de las gotas o burbujas. Además, la tensión interfacial (o tensión superficial) de la interfase disminuye durante la adsorción de la proteína, es decir, actúa como agente tensoactivo. Este hecho optimiza el aporte de energía necesario en los procesos de formación de emulsiones y espumas (Walstra 1993), y permite la presencia de gotas o burbujas más pequeñas, lo que es en sí mismo un importante factor para la estabilidad del sistema disperso (Dickinson 1992). En el caso de las emulsiones, el tamaño inicial de las gotas formadas influye fundamentalmente en la estabilidad de la emulsión, debido a la dependencia del cremado con el tamaño de gota (Barbut 1996) factor principal de desestabilización de

las emulsiones formadas en el presente trabajo. Según Rodríguez Patino et al. (1999), en la formación y estabilización a corto plazo de las emulsiones ("short-term stabilization"), la adsorción en la interfase aceite/agua es controlada por difusión. Debe recalcarse en este punto que en el proceso de homogeneización tiene que considerarse también el mecanismo de convección, que promueve el acercamiento de las proteínas hacia la interfase aceite/agua.
Otro proceso importante a tener en cuenta para el análisis de la adsorción superficial, es también la penetración misma en la interfase. Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que aumentan la afinidad por la interfase aceite/agua en los tiempos iniciales del proceso de formación de la emulsión son: bajo peso molecular, simetría de forma, alta hidrofobicidad superficial, alta flexibilidad, entre otros factores menores (Cayot et al. 1997).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo los tratamientos térmicos se aplicaron a soluciones de β-LG de concentración similar a la utilizada en la industria alimentaria, a diferencia de la mayoría de las publicaciones en las que se utilizan concentraciones menores (1 mg/mL).
El estudio de los cambios estructurales producidos en la β-LG como consecuencia del tratamiento térmico previo (a 65 °C y a 85 °C), arrojó las siguientes conclusiones: a 65 ºC aparecen monómeros no nativos parcialmente desnaturalizados (MNN65), con HS aumentada, con estructura secundaria inalterada y estructura terciaria modificada. A 85 °C, se presentaron monómeros no nativos parcialmente desnaturalizados (MNN85), aunque en mayor grado que los observados a 65 °C, con HS aún más aumentada y tanto su estructura secundaria como terciaria modificadas. Además, estos monómeros forman agregados intermoleculares unidos por puentes disulfuro (dímeros, trímeros, oligómeros y polímeros). Comparando los resultados homólogamente obtenidos con muestras de β-LG de menor concentración, se observó que los cambios conformacionales irreversibles son rápidos e independientes de la concentración, en tanto que la formación de especies de alto peso molecular es altamente dependiente de la concentración.
En las emulsiones ensayadas en el presente trabajo, el cremado fue el proceso de desestabilización principal, afectado fundamentalmente por lo que ocurre en los tiempos iniciales de formación de las emulsiones ("short-term stabilization"). En esta etapa hay dos factores influyentes: el tamaño de las proteínas y la HS que presenten, los que pueden sinerginarse o contraponerse entre sí. Estimando la actividad emulsionante de la β-LG a través de los EAI, a 65 ºC aumenta, lo que es coherente con la presencia de los ya citados monómeros con mayor HS, lo que les confiere mayor afinidad por la interfase. Contrariamente, a 85 ºC se observa una disminución de los EAI, lo que se justifica por la dificultad de las especies proteicas agregadas a esta temperatura (de mayor peso molecular) para llegar a la interfase y actuar en ella.
Los agregados de muy alto peso molecular, formados por tiempos de calentamiento a 85 ºC superiores a los 10 minutos, son arrastrados por las gotas de aceite durante el cremado hacia la parte superior de las emulsiones, estabilizando la crema.
Las mayores variaciones en la estabilidad de las espumas se dieron cuando la β-LG fue calentada a 85 °C, aumentando la estabilidad hasta los 10 minutos de calentamiento previo. Esta diferencia con lo observado en emulsiones se debe a que los tiempos iniciales para la formación de espumas son más largos, con lo cual el efecto retardador del incremento en el peso molecular no es suficiente para contrarrestar el beneficioso aumento en la HS, viéndose aumentada la adsorción en la interfase aire/agua durante el período inicial, y consiguientemente aumentando la estabilidad de la espuma formada.

AGRADECIMIENTOS:

Deseamos agradecer al grupo de trabajo del CIDCA La Plata (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos) por oportunamente habernos facilitado sus instalaciones y equipos para la realización de las experiencias de reflectancia difusa, especialmente al Dr. Jorge Wagner y al Dr. Gonzalo Palazolo, quienes siempre nos brindaron su valiosa colaboración.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbut, S. 1996. Determining water and fat holding. Cap. 7: 186-225, en: Methods of testing protein functionality. G.M. Hall. Departament of Chemical Engineering Loughborough University of Technology. Blackie Academic & Professional. 1996. Chapman & Hall.

Braunitzer, G, Chen, R, Schrank, B, Stangl, A. 1973. The sequence of β-lactoglobulin. Physiol. Chem., 354: 867-878.

Busti, PA, Gatti, CA, Delorenzi, NJ. 1998. Some aspects of β-lactoglobulin studied by fluorescence quenching. Int. J. Biol. Macromolecules, 23:143-148.

Busti, P, Gatti, C, Delorenzi, NJ. 2005. Thermal Unfolding of bovine β-lactoglobulin studied by UV spectroscopy and fluorescence quenching. Food Research International, 38, 5: 543-550.
Cambero Rodríguez, MI, Fernández Alvarez, L, García Sanz, ML, García de Fernando, GB, de la Hoz, L, Selgas, MD. 1998. Tecnología de los alimentos,Volumen II: Alimentos de origen animal. Editorial Síntesis, Madrid: 33-41.

Cameron, DR, Weber, ME, Idziak, ES, Neufeld, RJ y Cooper, DG. 1991. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data. Correction of the formula for emulsifying activity index. J. Agric. Food Chem., 39(4): 655-659.

Cayot, P, Lorient, D. 1997. Structure-function relationships of whey proteins. Cap. 8: 225 en: Food Proteins and their applications. Damodaran, S., Paraf, A. (editores).

Chang, CT, Wu, CS; Yang, JT. 1978. Circular dichroic analysis of protein conformation: Inclusion of the β-turns. Analytical Biochemistry, 91, 1: 13-31.

Cheftel, JC, Cuq, JL y Lorient, D. 1989. Propiedades funcionales de las proteínas alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España: 49-97; 179-182.

Creamer, LK. 1995. Effect of sodium dodecyl sulfate and palmitic acid in the equilibrium unfolding of bovine β-lactoglobulin. Biochemistry, 34: 7170-7176.

Croguennec, T, Mollé, D, Mehra, R, Bouhallab, S. 2004. Spectroscopic characterisation of heat-induced non-native β-lactoglobulin monomers. Prot. Sci., 13: 1340-1346.

Dalgleish, DG, Senaratne, V, Francois, S. 1997. Interactions between α-lactalbumin and β-lactoglobulin in the early stages of heat denaturation. J. Agric. Food Chem., 45: 3459-3464.

de la Fuente, MA, Singh, H y Hemar, Y. 2002. Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. Trends in Food Science & Technology, 13, 8: 262-274.

Dickinson, E, Stainsby, G. 1987. Progress in the formulation of food emulsions and foams. Food Technol. 45: 75-116.

Dickinson, E. 1992. Introduction to food colloids. Oxford University Press, Oxford.

Dickinson, E. 2003. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocoll. 17: 25-39.

Fessas, D, Iametti, S, Schiraldi, A, Bonomi, F. 2001. Thermal unfolding of monomérico and dimeric beta-lactoglobulins. Eur. J. Biochem. 268: 5439-5448.

Gast, K, Siemer, A, Zirwer, D y G. Damaschun. 2001. Fluoroalcoholinduced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. Eur. Biophys. J. 30: 273–283.

Greenfield, NJ. 2004. Circular dichroism análisis for proteína-protein interactions. Methods in Molecular Biology, 261: 55-77.

Griffin, WC, Griffin, MCA, Martin, SR, Price, J. 1993. Molecular basis of thermal aggregation of bovine beta-lactoglobulin A. J.Chem.Soc.Faraday Trans, 89: 3395-3405.

Hoffmann, MAM, Van Mil, PJJM. 1997. Heat-induced aggregation of beta-lctoglobulin: role of the free thiol group and disulfide bonds. J. Agric. Food Chem., 45: 2942-2948.

Iametti, S; Cairoli, S; De Gregori, B; Bonomi, F. 1995. Modifications of high-order structures upon heating of β-lactoglobulin: dependence on the protein concentration. J. Agric. Food Chem., 43: 53-58.

Iametti, S, De Gregori, B, Vecchio, G, Bonomi, F. 1996. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β-lactoglobulin. Eur.J.Biochem., 237:106-112.

Kim, DA, Cornec, M, Narsimhan, G. 2005. Effect of thermal treatment on interfacial properties of β-lactoglobulin. Journal of Colloid and Interface Science, 285, 1: 100-109.

Kinsella, JE, Whitehead, DM.1989. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. Adv. Food Nutr. Res., 33: 343-438.

Korhonen, H, Pihlanto-Leppälä, A, Ramantamäki, P y Tupasela, T. 1998. The functional and biological properties of whey proteins: prospects for the development of functional foods. Agricultural Research Centre of Finland, 7: 283-296.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins Turing the assembly of the head bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Manderson, GA; Hardman, MJ; Creamer, LK. 1998. Effect of heat treatment on the conformation and aggregation of β-lactoglobulin A, B, and C. J. Agric.Food Chem., 46: 5052-5061.

Manderson, GA, Hardman, MJ, Creamer, LK. 1999. Effect of heat treatment on bovine betalactoglobulin A, B and C explored using thiol availability and fluorescence. J. Agric. Food Chem., 46: 3617-3627.

McClements, DJ. 1999. Food Emulsions. Principles, Practice and Techniques. CRC Press.

Mengual, O, Meunier, G, Cayré, I, Puech, K & Snabre, P. 1999a.TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. Talanta, 50: 445 – 456.

Mengual, O, Meunier, G, Cayré, I, Puech, K & Snabre P. 1999b. Characterization of instability of concentrated dispersions by a new optical analyzer: the TURBISCAN MA 2000. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 152:111 – 123.

Murray, BS, Dickinson, E. 1996. Interfacial rheology and the dynamic properties of adsorbed films of food proteins and surfactants. Food Science and Technology International, 2:131.

Pagliarini, E, Iametti, S, Peri, C, Bonomi, F. 1990. An analytical approach to the evaluation of heat damage in comercial milks. J. Dairy Sci.,73: 41-44.

Palazolo, G; Rodriguez, F; Farruggia, B; Picó, G; Delorenzi, NJ. 2000. Heat treatment of β-lactoglobulin: structural changes studied by partitioning and fluorescence. J. Agric. Food Chem., 48: 3817-3822.

Pearce, KN; Kinsella, JE. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem., 26: 716-723.

Prabakaran, S, Damodaran, S. 1997. Thermal unfolding of β-lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat-induced aggregation. J.Agric. Food Chem., 45: 4303-4308.

Preaux, G, Braunitzer, G, Schrank, B, Stangl, A. 1979. The aminoacid sequence of goat β-lactoglobulin. Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem., 360:1595-1604.

Quaglia, G B, Orban, E y Patroni, E. 1993. Le propietá funzionalitecnologiche del siero di latte. Industrie Alimentari, 32: 337.

Relkin, P. 1996. Thermal unfolding of β-lactoglobulin, α-lactalbumin and bovine serum albumin: a thermodynamic approach. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nut.,36(6): 565-601.

Rodríguez Patino, JM, Rodríguez Niño, MR, Carrera Sanchez, C. 1999. Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study. J. Agric. Food Chem., 47 (6): 2241-2248.

Ruegg, M, Moor, U, Blanc, BA. 1977. A calorimetric study of termal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. J. Dairy Res., 44: 509-520.

Sawyer, L, Kontopidis, G. 2000. The core lipocalin, bovine β-lactoglobulin. Biochimistry Biophysics, 1482: 136-148.

Wagner, J R. 2000. Propiedades superficiales, en Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas, Pilosof, AMR, Bartholomai, GB (editores). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Editorial Universitaria de Buenos Aires (Eudeba):41-70.

Walstra, P. 1993. Principles of emulsion formation. Chemical Engineering Science, 48: 333.

Wong, DWS, Camirand, WM y Pavlath, AE. 1996. Structures and functionalities of milk proteins. CRC Crit. Rev. Food Science Nutrition, 36 (8): 807-844.

Disminución de lisina disponible por reacción de Maillard en leches en polvo común y de contenido reducido en lactosa

Drop of available lisine by Maillard reaction in dried milk with either normal or low lactose content

Naranjo GB, Pereyra Gonzales AS, Leiva GE, Malec LS.

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
malec@qo.fcen.uba.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar el daño proteico producido por reacción de Maillard en leche en polvo común y leche en polvo de contenido reducido en lactosa. Se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción y el efecto del aumento de la actividad de agua durante el almacenamiento por análisis de la pérdida de disponibilidad de lisina en ambos productos. Las leches analizadas fueron adquiridas en el mercado local. Las mismas se equilibraron a actividades de agua de 0,33 y 0,52 y fueron posteriormente almacenadas a 37, 50 y 60°C. A intervalos regulares de tiempo se determinó por duplicado el contenido de lisina disponible por el método espectrofotométrico con o-ftaldialdehído. Los valores de las constantes de velocidad correspondientes a la leche en polvo común a 50°C y 60ºC resultaron similares a ambas a_w. (Para 50ºC $7{,}14.10^{-3}$ h^{-1} y $6{,}35.10^{-3}$ h^{-1} a a_w 0,33 y 0,52 respectivamente y para 60ºC $1{,}75.10^{-2}$ h^{-1} y $2{,}60.10^{-2}$ h^{-1} a a_w 0,33 y 0,52 respectivamente). Sin embargo a 37ºC, el valor de la constante a a_w 0,33 ($1{,}98.10^{-5}$ h^{-1}) resultó 40 veces menor que a a_w 0,52 ($7{,}62\ .10^{-4}$ h^{-1}). Esta disminución tan pronunciada de la constante de velocidad estaría relacionada con la cercanía de la temperatura de almacenamiento a la temperatura de transición vítrea del producto (Tg = 33ºC a a_w 0,33). En estas condiciones, la reacción de Maillard se produciría de manera extremadamente lenta, debido a la limitada movilidad molecular. Las constantes de velocidad de pérdida de lisina del producto deslactosado a a_w 0,52, a 37ºC ($1{,}35.10^{-2}$ h^{-1}) y 50ºC ($7{,}06.10^{-2}$ h^{-1}), fueron mayores que a a_w 0,33 ($8{,}96.10^{-3}$ h^{-1} y $5{,}68.10^{-2}$ h^{-1}, a 37 y 50°C, respectivamente). A 60ºC, en cambio, no hubo diferencias significativas entre las constantes a las a_w de trabajo (0,356 h^{-1} y 0,376 h^{-1}, a a_w 0,33 y 0,52, respectivamente). Esto indicaría que, en este producto, la influencia del aumento de la actividad de agua en la reacción de Maillard se hace menos marcada al aumentar la temperatura. Al comparar las constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible entre ambos productos en las mismas condiciones de a_w y temperatura, se observa que éstas resultaron mucho mayores en la leche reducida en lactosa, debido a la presencia de monosacáridos reductores, productos de la hidrólisis de la lactosa. Los valores de energía de activación calculados para leche común y deslactosada almacenadas a a_w 0,52 fueron de 129 y 133 kJ. mol^{-1}, respectivamente. A a_w 0,33 el valor hallado para la leche de contenido reducido en lactosa fue de 136 kJ. mol^{-1}; en el caso de la leche común no se obtuvo una relación lineal entre el ln k y la inversa de la temperatura, debido a que en la cercanía de la Tg no se cumple la ecuación de Arrhenius.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of water activity and temperature on the loss of available lysine in regular powdered milk and low-lactose powdered milk during storage and to compare the protein damage due to Maillard reaction in both products. Milk products were purchased at the local market. They were equilibrated at 0.33 and 0.52 water activities and stored at 37, 50 and 60ºC. The reaction rate was determined by the loss of available lysine content using the o-phthaldialdehyde method. The rate constants for available lisyne loss in regular powdered milk at 50°C and 60ºC were similar at both a_w . (For 50ºC $7.14.10^{-3}$ h^{-1} and $6.35.10^{-3}$ h^{-1} at a_w 0.33 and 0.52 respectively and for 60ºC $1.75.10^{-2}$ h^{-1} and $2.60.10^{-2}$ h^{-1} at a_w 0.33 and 0.52 respectively) Nevertheless, at 37ºC the constant value at a_w 0.33 ($1.98.10^{-5}$ h^{-1}) was 40 fold lower than at a_w 0.52 ($7.64\ .10^{-4}$ h^{-1}). This substantial reduction in the rate constant at this temperature may be related to the limited molecular mobility of the system due to the vicinity of the glass transition temperature of the product

(Tg = 33ºC at a_w 0.33). The rate constants for available lisyne loss in low-lactose powdered milk at a_w 0.52, at 37ºC ($1.35.10^{-2}$ h^{-1}) and 50ºC ($7.06.10^{-2}$ h^{-1}), were higher than at a_w 0.33 at the same temperatures ($8.96.10^{-3}$ h^{-1} and $5.68.10^{-2}$ h^{-1}, at 37 and 50°C, respectively). Instead, at 60ºC there were no significative diferences between constants at both water activities (0.356 h^{-1} y 0.376 h^{-1}, at a_w 0.33 and 0.52, respectively), indicating that, in this product, the effect of the increase of a_w on Maillard reaction is less pronounced when temperature is raised. The rate constants of available lisyne loss for low-lactose powdered milk were much higher than those for the regular powdered milk at the same a_w and temperature conditions, due to higher reactivity of the monosaccharides present in this product. The activation energies for regular and low-lactose powdered milk at a_w 0.52 were 129 and 133 $kJ.mol^{-1}$, respectively. At a_w 0.33 it was 136 kJ. mol^{-1} for low-lactose powdered milk; regular powdered milk equilibrated at a_w 0.33 did not follow Arrhenius equation as no linear relationship was obtained when ln k was plotted against T^{-1} because of the vicinity of the Tg.

PALABRAS CLAVE: *Maillard, lisina disponible, leche deslactosada.*

KEYWORDS: *Maillard, available lysine, low-lactose milk.*

INTRODUCCIÓN

Las proteínas alimentarias pueden sufrir deterioro en su valor nutricional durante el procesamiento y/o almacenamiento de los alimentos, debido principalmente a la reacción de Maillard que se produce en presencia de azúcares reductores (Kaanane y Labuza 1989, Mauron 1990). Durante la etapa temprana de esta reacción se bloquean grupos amino de aminoácidos esenciales lo que impide su biodisponibilidad (Hurrell *et al.* 1983, Mauron 1990). Entre ellos el más afectado es la lisina por su grupo ε-amino libre, siendo éste un aminoácido esencial que suele ser limitante en muchos alimentos.

En la leche esta reacción ocurre por condensación de lactosa con proteínas, formándose lactulosil-lisina. Es principalmente inducida por tratamientos térmicos; sin embargo, se ha demostrado que la glicosilación de proteínas en la leche puede ocurrir también durante su almacenamiento (Kessler y Fink 1986, De Block *et al.* 1998, Guyomarc'h *et al.* 2000).

La velocidad de esta reacción es influida por diversos factores tales como la temperatura y la actividad de agua (a_w) (Labuza y Baisier 1992). Se ha reportado que las reacciones de pardeamiento no enzimático presentan un máximo a actividades de agua intermedias (Labuza y Saltmarch 1981, Kaanane y Labuza 1989). La transición vítrea también afecta la cinética de las reacciones químicas controladas por difusión tales como la reacción de Maillard. La elevada viscosidad del sistema por debajo de la temperatura de transición vítrea (Tg) ha sido asociada con una limitada movilidad molecular y la consecuente disminución de la velocidad de reacción (Karmas *et al.* 1992, Bell *et al.* 1998, Lievonen *et al.* 1998).

Otro factor que afecta la velocidad de la reacción de Maillard es el tipo de azúcar presente. En aquellos productos en los que la lactosa es el único azúcar reductor presente, el daño no suele ser importante, ya que este azúcar reacciona lentamente (Hurrell *et al.* 1983). Sin embargo, existen en el mercado productos lácteos destinados a personas que sufren intolerancia a la lactosa en los que este disacárido ha sido previamente hidrolizado. La presencia en éstos de glucosa y galactosa producto de la hidrólisis, los vuelve altamente susceptibles a la reacción de Maillard (Mittal *et al.* 1989, Paul y Mathur 1993) ya que los monosacáridos reaccionan a mayor velocidad que la lactosa con los grupos amino libres (Baxter 1995, Naranjo *et al.* 1998).

El objetivo de este trabajo fue comparar el daño proteico producido por reacción de Maillard en leche en polvo común y leche en polvo de contenido reducido en lactosa. Se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad de reacción y el efecto del aumento de la actividad de agua durante el almacenamiento por análisis de la pérdida de disponibilidad de lisina en ambos productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamiento de las muestras

Se utilizaron leche en polvo común y leche en polvo de contenido reducido en lactosa, adquiridas en el mercado local. Las mismas fueron equilibradas a valores de actividad de agua de 0,33 y 0,52 en desecadores utilizando soluciones saturadas de $MgCl_2$ y $Mg(NO_3)_2$ respectivamente.

Una vez equilibradas las muestras se determinó su humedad y contenido en lisina y nitrógeno. Luego se tomaron porciones de 500 mg que se colocaron en frascos de vidrio de 10 ml de capacidad con cierre hermético y se almacenaron a tres temperaturas: 37, 50 y 60ºC. Se retiraron frascos por duplicado a distintos tiempos de almacenamiento y se analizó en cada uno de ellos el contenido de lisina disponible por triplicado.

Determinaciones analíticas

La determinación de la actividad de agua de los sistemas se llevó a cabo con un higrómetro Vaisala Humicap HMI 31 (Vaisala OY, Helsinki, Finlandia) equipado con un sensor HMP 35.
La determinación de humedad se realizó por secado en estufa en vacío (100 mmHg) a 60 - 65ºC hasta peso constante.
El contenido de nitrógeno se determinó por duplicado por el método de Kjeldahl.
Para la valoración de lisina disponible se utilizó el método espectrofotométrico con o-ftaldialdehido y N-acetil-L-cisteína (Medina Hernández y García Alvarez-Coque 1992). Las muestras fueron disueltas en solución de SDS 2% y la absorbancia fue medida por triplicado a 335 nm en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453 (Palo Alto, USA).

Análisis estadístico

Las constantes de velocidad de primer orden para la pérdida de lisina (k_{lis}) y sus respectivos errores estándar se calcularon por análisis de regresión lineal a partir de la siguiente ecuación:

$$L_t = L_0 e^{-kt}$$

Donde L_t = concentración de lisina a tiempo t y L_0 = concentración de lisina a t = 0.
Los intervalos de confianza se estimaron para un nivel de significación del 95% por medio del test t de Student. Para estudiar si las constantes eran significativamente diferentes de cero se utilizó el análisis de varianza (ANOVA). Las energías de activación se analizaron punto a punto de acuerdo a lo sugerido por Labuza (1984), con límites de confianza del 95%. El utilitario empleado fue STATGRAPHICS Plus versión 5.1 (Statistical Graphics Corp.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las **Tablas 1** y **2** figuran los valores de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a las tres temperaturas analizadas y a las actividades de agua 0,33 y 0,52 respectivamente para la leche en polvo común. En la **Tabla 3** se presentan las constantes de velocidad de pérdida de lisina (k_{lis}) correspondientes calculadas para cada a_w y temperatura estudiadas con sus respectivos coeficientes de correlación (r^2).

Tabla 1. Contenido de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a 37, 50 y 60ºC para leche en polvo común equilibrada a a_w 0,33.

37ºC		50ºC		60ºC	
t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N
0,0	7,90	0,0	7,96	0,0	8,03
450,2	7,47	23,0	7,25	8,5	7,00
1464,0	7,19	45,3	5,77	18,0	6,02
1532,3	7,20	61,0	4,57	24,0	5,44
5332,8	6,37	75,9	4,81	30,0	5,23
8016,9	3,18	97,0	3,95	41,4	3,72
11220,0	5,82	113,3	3,49	48,2	3,14
14376,0	5,76	122,7	3,49	62,3	2,83
17997,0	5,55	141,2	2,72	71,0	2,36
25026,0	4,64				

Tabla 2. Contenido de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a 37, 50 y 60ºC para leche en polvo común equilibrada a a_w 0,52.

37ºC		50ºC		60ºC	
t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N
0,0	7,65	0,0	7,84	0,0	7,74
89,3	6,93	14,5	6,87	4,0	7,05
169,5	5,99	30,0	6,09	8,2	6,25
265,6	5,69	47,5	5,29	12,1	5,43
340,2	4,90	65,0	4,35	15,0	5,31
608,2	4,52	81,3	4,13	18,1	4,48
700,6	4,41	100,0	3,61	24,0	3,81
799,5	4,05	118,1	3,66	30,0	3,49
1000,0	3,58			39,0	2,89

Tabla 3. Constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible en leche en polvo común equilibrada a a_w 0,33 y 0,52 y almacenada a 37, 50 y 60ºC. Límite de confianza = 95 %.

	a_w 0,33		a_w 0,52	
T	k_{lis} (10^{-3}) h^{-1}	r^2	k_{lis} (10^{-3}) h^{-1}	r^2
37ºC	0.0198 ± 0.0020	0,96	0.762 ± 0.095	0,95
50ºC	7.14 ± 0.51	0,98	6.35 ± 0.32	0,98
60ºC	17.46 ± 0.93	0,99	26.0 ± 1.3	0,98

Al analizar estos valores, no se observaron diferencias significativas entre las constantes correspondientes a las a_w 0,33 y 0,52 ($p > 0.05$), por lo que a estas temperaturas, el aumento de la actividad de agua en la leche en polvo no afectaría el daño nutricional. Sin embargo a 37ºC, el valor de la constante a a_w 0,52 resultó 40 veces mayor que a a_w 0,33. Este incremento tan pronunciado de la constante de velocidad parece no estar completamente relacionada con las diferentes a_w de trabajo, sino con que a a_w 0,33 la temperatura de almacenamiento es muy cercana a la temperatura de transición vítrea del producto (33ºC; Jouppila y Roos 1994). Como fue explicado con anterioridad, en las cercanías del Tg las reacciones de difusión se ven muy afectadas debido a la limitada movilidad molecular, consecuencia de la alta viscosidad del sistema (Karmas *et al.* 1992, Lievonen *et al.* 1998, Craig *et al.* 2001), por lo cual la reacción de Maillard se produciría de manera extremadamente lenta. Un aumento de la a_w a 0,52 disminuye considerablemente la Tg, aumentando la movilidad de los reactantes y por consiguiente la velocidad de pardeamiento no enzimático.

En las **Tablas 4** y **5** figuran los valores de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a las tres temperaturas analizadas y a las actividades de agua 0,33 y 0,52 respectivamente, correspondientes a la leche en polvo deslactosada. En la **Tabla 6** se presentan las constantes de velocidad de reacción en este producto calculadas para cada a_w y temperatura analizadas y sus respectivos coeficientes de correlación (r^2). Las constantes de velocidad de pérdida de lisina a a_w 0,52, a 37ºC y 50ºC, fueron mayores que a a_w 0,33 ($p < 0,05$). Esto coincide con la mayor parte de los trabajos que analizaron la influencia de la a_w en la reacción de Maillard en los que se observó que la velocidad de reacción es máxima a valores de actividad de agua intermedios (Jokinen *et al.* 1976, Labuza y Saltmarch 1981, Lea y Hannan 1949, Loncin *et al.* 1968) y, en particular, con los resultados informados por Burvall *et al.* (1978), quienes observaron que la pérdida de lisina disponible en leche en polvo reducida en lactosa almacenada a a_w 0,62 fue mayor que la observada para dicho producto a a_w 0,11, ambos a 25ºC. A 60ºC, por el contrario, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las constantes a las a_w de trabajo. Estos resultados son similares a los reportados por Malec *et al.* (2002) y Vuataz (1988), quienes observaron que la influencia de la actividad de agua se hace menos marcada al aumentar la temperatura.

Tabla 4. Contenido de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a 37, 50 y 60ºC para leche en polvo deslactosada equilibrada a a_w 0,33.

37ºC		50ºC		60ºC	
t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N
0,0	7,80	0,0	7,80	0,0	7,80
5,5	7,20	1,5	7,03	0,2	7,09
24,0	5,86	3,0	6,07	0,6	6,11
31,5	5,35	4,5	5,49	1,0	5,30
40,2	4,83	6,0	5,40	1,2	4,70
56,0	4,42	7,5	5,34	1,4	4,90
72,0	3,86	9,0	4,65	1,6	4,24
78,9	4,10	11,0	4,12	1,8	4,08
		12,2	3,74		

Tabla 5. Contenido de lisina disponible en función del tiempo de almacenamiento a 37, 50 y 60ºC para leche en polvo deslactosada equilibrada a a_w 0,52.

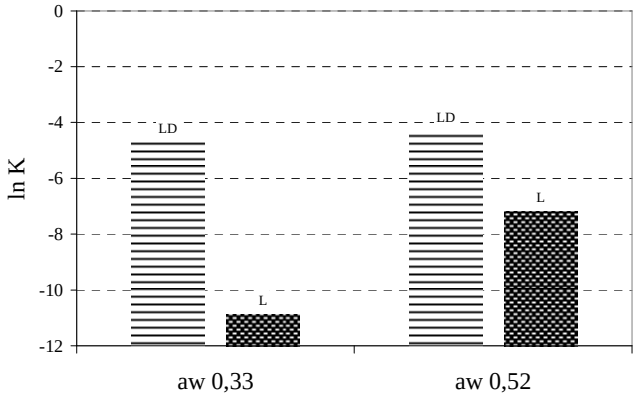
37ºC		50ºC		60ºC	
t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N	t (h)	g lis / 16 g N
0,0	7,44	0,0	7,44	0,0	7,55
8,0	6,02	1,2	6,96	0,3	6,18
16,9	5,32	2,3	6,73	0,5	6,13
24,0	4,73	3,5	6,23	0,8	4,91
28,3	4,90	4,7	5,59	1,0	4,98
35,2	4,36	5,8	5,09	1,3	4,35
39,8	3,73	7,0	4,61	1,5	4,25
44,0	4,00	8,2	4,45	1,8	3,72
48,0	3,62	9,4	3,86	2,0	3,59
		10,6	3,59	2,3	2,99

Tabla 6. Constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible en leche en polvo reducida en lactosa equilibrada a a_w 0,33 y 0,52 y almacenada a 37, 50 y 60ºC. Límite de confianza = 95 %

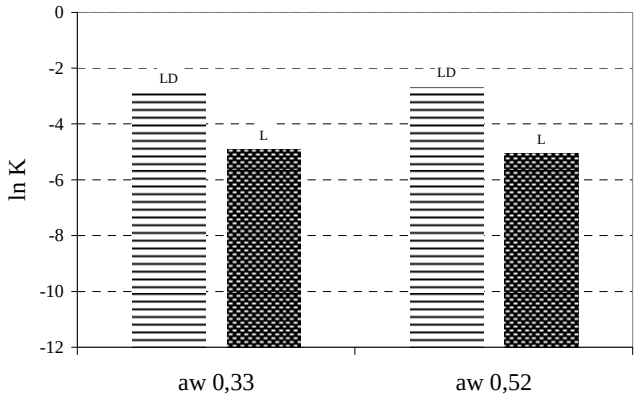
	a_w 0,33		a_w 0,52	
T	k_{lis} (10^{-3}) h^{-1}	r^2	k_{lis} (10^{-3}) h^{-1}	r^2
37ºC	8,96 ± 0,28	0,96	13,5 ± 0,5	0,93
50ºC	56,8 ± 1,23	0,98	70,6 ± 1,7	0,97
60ºC	355,8 ± 7,8	0,98	376,5 ± 9,3	0,97

A fin de comparar la pérdida de valor nutricional en la leche en polvo común con la leche en polvo reducida en lactosa, se presentan las **Figuras 1 a**, **b** y **c**, en las que se grafican los logaritmos de las constantes de pérdida de disponibilidad de lisina en función de las a_w de trabajo, a las tres temperaturas de almacenamiento. Al comparar las constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible entre ambos productos, se observa que resultaron mucho mayores en el caso de la leche reducida en lactosa, debido a la presencia de monosacáridos reductores, productos de la hidrólisis de la lactosa. Estos resultados coinciden con los hallados en literatura (Burvall *et al.* 1978, Fernández *et al.* 2003, Mittal *et al.* 1989). Sin embargo, esa diferencia es notablemente mayor en el caso de los productos equilibrados a a_w 0.33 y almacenados a 37ºC. Por ejemplo, la leche reducida en lactosa pierde un 10% de lisina disponible muy rápidamente, luego de 9 hs de almacenamiento, mientras que ese mismo porcentaje se pierde en alrededor de 4 meses de almacenamiento en el caso de una leche común. Esta diferencia no es tan notoria a temperaturas más elevadas, como 50 y 60ºC y tampoco a a_w 0,52; por lo tanto, no

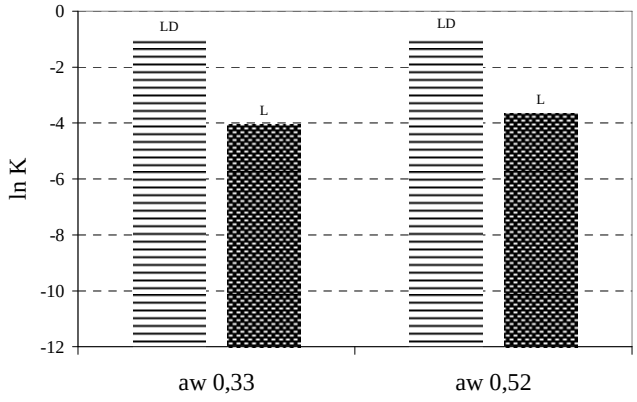
puede ser sólo atribuida a la distinta composición de dichos productos. Como se mencionó anteriormente, a a_w 0,33 y 37ºC la reacción de Maillard en la leche en polvo común ocurre muy lentamente debido a la elevada viscosidad del sistema. En el caso del producto deslactosado, su valor de Tg a a_w 0,33 es de -10ºC (Fernández *et al.* 2003), valor mucho menor que el de la leche común debido a que las Tg de los monosacáridos son menores que el de la lactosa. Esta temperatura está muy por debajo de 37ºC, por esta razón la velocidad de reacción no se ve tan disminuida y la diferencia con la constante de velocidad de la leche en polvo común es tan importante.



(a)



(b)



(c)

Figura 1. Logaritmos de constantes de velocidad de pérdida de lisina disponible a actividad de agua (a_w) 0,33 y 0,52 a 37ºC (a); 50ºC (b) y 60ºC (c) para: leche en polvo (L) y leche en polvo reducida en lactosa (LD).

La dependencia de la velocidad de reacción con la temperatura se analizó utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$k_{lis}. = k_0. e^{-Ea/RT}$$

Para la leche en polvo común, a a_w 0,52 se obtuvo una relación lineal al graficar el ln k_{lis} versus T^{-1}, siendo el valor de energía de activación calculado (Ea) 129,2 ± 3,7 kJ. mol^{-1}, coincidentes con los hallados en literatura para sistemas lácteos (Kessler y Fink 1986; Morales *et al.* 1995, Naranjo *et al.* 1998, Malec *et al.* 2002). Sin embargo, a a_w 0,33 no se obtuvo una relación lineal debido a que en la cercanía de la Tg no se cumple la ecuación de Arrhenius. Para la leche deslactosada, no se encontraron trabajos previos en los que se haya calculado la energía de activación para la pérdida de lisina disponible. En este estudio, al graficar ln k versus T^{-1}, se obtuvieron relaciones lineales para los sistemas equilibrados a ambas a_w. Los valores de las energías de activación (Ea) calculados fueron 136 ± 13 y 123 ± 10 kJ.mol^{-1}, para el producto equilibrado a a_w 0,33 y 0,52, respectivamente. No se registraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos valores y tampoco entre éstos y el obtenido para leche en polvo común a a_w 0,52. Las elevadas Ea observadas indican que la temperatura sería el factor más importante a controlar a fin de minimizar el daño nutricional durante el almacenamiento de ambos productos. De acuerdo a los datos de energía de activación obtenidos para la leche deslactosada, la pérdida de lisina a 20ºC (temperatura de una alacena fresca) y a a_w de 0.33 (que es alcanzada rápidamente cuando el producto toma contacto con el ambiente) sería muy elevada, alcanzando un 55% luego de 3 meses de almacenamiento y un 80% luego de 6 meses. Pero si calculamos la pérdida a temperaturas de refrigeración (4ºC), ésta llegaría sólo a un 3 y un 6% considerando los mismos tiempos de almacenamiento. Más aún, si el producto almacenado se mantuviera a esa temperatura durante toda su vida útil (un año), la pérdida sería del 12%.

Al comparar la pérdida de valor nutricional de la leche reducida en lactosa en polvo con la reportada para las leches líquidas (Burvall *et al.* 1978, Corradini *et al.* 2001, Evangelisti *et al.* 1999, Mittal *et al.* 1989), se observa que en estas últimas la reacción de Maillard ocurre a mucho menor velocidad, obviamente debido a su elevado valor de actividad de agua. Sin embargo, la vida útil de las leches ultrapasteurizadas reducidas en lactosa es muy limitada (de sólo 30 días) y los costos son considerablemente mayores que los del producto en polvo (un 50%). Por lo tanto, los esfuerzos en mejorar el valor nutricional de la leche reducida en lactosa deberían estar enfocados fundamentalmente hacia el producto en polvo.

CONCLUSIONES

Durante el almacenamiento de la leche en polvo común, la pérdida de lisina disponible se reduce considerablemente en condiciones de actividad de agua y temperatura cercanas a la de la transición vítrea debido a la elevada viscosidad que restringe la movilidad molecular. Por esta razón, resulta conveniente almacenar dicho producto en dichas condiciones para minimizar el daño nutricional.

El reemplazo de lactosa por sus productos de hidrólisis produce un aumento de la pérdida de lisina disponible en las leches deslactosadas, fundamentalmente cuando las condiciones de almacenamiento son cercanas a las de transición vítrea de la leche común.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado a través del subsidio UBACYT X062 de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baxter J.R. 1995. Free amino acid stability in reducing sugar systems. Journal of Food Science, 60: 405-408.

Bell LN, Touma DE, White KL, Chen YH. 1998. Glycine loss and Maillard browning as related to the glass transition in a model food system. Journal of Food Science, 63 (4): 625-627.

Burvall A, Asp NG, Bosson A, San José C, Dahlqvist A. 1978. Storage of lactose-hydrolyzed dried milk: effect of water activity on the protein nutritional value. Journal of Dairy Research: 45, 381-389.

Corradini, C, Canali, G, Nicoletti, I. 2001. Caratterizzazione di latte UHT delattosato con tecniche analitiche innovative. Industrie Alimentari. XL: 261-271.

Craig ID, Parker R, Rigby NM, Cairns P, Ring SG. 2001. Maillard reaction kinetics in model preservation systems in the vicinity of the glass transition: experiment and theory. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 4706-4712.

De Block J, Merchiers M, Van Renterghem R. 1998. Capillary Electrophoresis of the Whey Protein Fraction of Milk Powders. A Possible Method for Monitoring Storage Conditions. International Dairy Journal, 8: 787-792.

Evangelisti F, Calcagno C, Nardi S, Zunin P. 1999. Deterioration of protein fraction by Maillard reaction in dietetic milks. Journal of Dairy Research, 66: 237-243.

Fernández E, Schebor C, Chirife J. 2003. Glass transition temperature of regular and lactose hydrolyzed milk powders. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 36: 547–551.

Guyomarc'h F, Warin F, Muir DD, Leaver J. 2000. Lactosylation of milk proteins during the manufacture and storage of skim milk powders. International Dairy Journal, 10: 863-872.

Hurrell RF, Finot PA, Ford JE. 1983. Storage of milk powders under adverse conditions. 1. Losses of lysine and other essential amino acids as determined by chemical and microbiological methods. British Journal of Nutrition, 49: 343-354.

Jokinen JE, Reineccius GA, Thompson DR. 1976. Losses in available lysine during thermal processing of soy protein model systems. Journal of Food Science, 41: 816-819.

Jouppila K, Roos YH. 1994. Glass transition and crystallization in milk powders. Journal of Dairy Science, 77: 2907-2915.

Kaanane, A., Labuza, T.P., 1989. The Maillard reaction in foods. En J. Baynes (Ed.) The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition (pág. 301-327).. New York: A.R. Liss Press, Inc.

Karmas R, Buera MP, Karel M. 1992. Effect of glass transition on rates of nonenzymatic browning in food systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 873-879.

Kessler HG, Fink R. 1986. Changes in heated and stored milk with an interpretation by reaction kinetics. Journal of Food Science, 51: 1105-1111.

Labuza, T.P., Baisier, W. M. 1992. The kinetics of nonenzimatic browning. En H. Schwartzberg & R. Hartel (Eds.) Physical Chemistry of Foods (pág. 595-649). New York: Marcel Dekker.

Labuza TP, Saltmarch M. 1981. Kinetics of browning and protein quality loss in whey powders during steady state and nonsteady state storage conditions. Journal of Food Science, 47: 92-96, 113.

Lea CH, Hannan RS. 1949. Studies on the reaction between proteins and reducing sugars in the "dry" state. I. The effect of activity of water, of pH and of temperature on the primary reaction between casein and glucose. Biochimica et Biophysica Acta, 3: 315-325.

Lievonen SM, Laaksonen TJ, Roos YH. 1998. Glass transition and reaction rates: nonenzymatic browning in glassy and liquid systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 2778-2784.

Loncin H, Bimbenet M, Langes J. 1968. Influence of the activity of water on the spoilage of foodstuffs. Journal of Food Technology, 3: 331.

Malec LS, Pereyra Gonzales AS, Naranjo GB, Vigo MS. 2002. Influence of water activity and storage temperature on lysine availability of a milk like system. Food Research International, 35: 849-853.

Mauron J. 1990. Influence of processing on protein quality. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 36: S57-S69.

Medina Hernández MJ, García Alvarez-Coque MC. 1992. Available lysine in protein, assay using o-phthaladehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric method. Journal of Food Science, 57: 503-505.

Mittal SB, Hourigan JA, Zadow JG. 1989. Effect of UHT treatment, storage time and temperature on the available lysine of UHT recombined and UHT recombined lactose hydrolysed milk. The Australian Journal of Dairy Technology, 44 (nov): 88-90.

Morales FJ, Romero C, Jiménez-Pérez S. 1995. New methodologies for kinetic study of 5-(hydroxymethyl)-furfural formation and reactive lysine blockage in heat-treated milk and model systems. Journal of Food Protection, 58: 310-315.

Naranjo GB, Malec LS, Vigo MS. 1998. Reducing sugars effect on available lysine loss of casein by moderate heat treatment. Food Chemistry, 62: 309-313.

Paul SC, Mathur BN. 1993. Effect of lactose hydrolysis on some nutritional characteristics of spray-dried lactose-hydrolysed infant formula. The Australian Journal of Dairy Technology, 48 (nov): 49-51.

Vuataz, G. 1988. Preservation of skim-milk powders: role of water activity and temperature in lactose crystallization and lysine loss. En C. C. Seow (Ed.), Food Preservation by water activity control, (pág. 73-101). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Applied Science.

Fitoesteroles en híbridos de girasol cultivados en Argentina

Phytosterols present in hybrid sunflower seeds cultivated in Argentina

Nolasco SM[(1)], Carelli AA[(3)], Izquierdo N.[(2)], Cocconi M [(1)] ,Quiroz F [(2)], Aguirrezabal LAN[(2)]

(1) TECSE; Facultad de Ingeniería, UNCPBA. Avenida del Valle 5737, B7400JWI. Olavarría, Argentina.
@mail: snolasco@fio.unicen.edu.ar
(2) Unidad Integrada Facultad de Ciencias Agrarias (UNMdP)-Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce
(3) Planta Piloto de Ingeniería Química, PLAPIQUI (UNS-CONICET)

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, siendo un indicador de riesgo los niveles altos de colesterol plasmático. Entre los componentes de la alimentación que pueden actuar como aliados en el control del colesterol están los *fitoesteroles*, los cuales se encuentran en los alimentos vegetales, especialmente en aceites. No se han detectado en la literatura antecedentes de estudios sobre fitoesteroles en girasol cultivado en Argentina. En el presente trabajo se realiza una primera evaluación de la variabilidad de fitoesteroles en el aceite de híbridos de girasol cultivados en nuestro país. Se utilizaron muestras de la Red de Ensayos Comparativos de Rendimientos Buenos Aires Sur y La Pampa (INTA-ASAGIR). Se seleccionaron cinco ambientes contrastantes de la zona girasolera Argentina: Balcarce, San Francisco de Bellocq, Hilario Ascasubi, Manfredi y Vicuña Mackenna y cuatro híbridos de girasol: Agrobel 967 (Seminium), Dekasol 3920 (Dekalb-Monsanto S.A.), Macon RM (Syngenta) y Olisum 2 (Advanta Semillas S.A.I.C.). Se determinó el rendimiento de semilla en el surco central de cada parcela, (kg ha^{-1}), el porcentaje de aceite mediante Resonancia Magnético Nuclear y el contenido y composición de esteroles por Cromatografía Gaseosa. El porcentaje de aceite de los granos osciló entre 44,7-56,3%, valores superiores a la actual base de comercialización de Argentina (42%). La concentración promedio de fitoesteroles totales para el conjunto de muestras analizadas fue de 4095 ± 400 mg de esteroles kg $aceite^{-1}$ (rango 3513 - 4936 mg kg $aceite^{-1}$), detectándose concentraciones superiores a las reportadas en cultivos realizados en otros países. El coeficiente de variación para la concentración de fitoesteroles totales (conjunto de ambientes e híbridos, 9,8%) fue similar al del porcentaje de aceite (5,9%) y menor que el del rendimiento de grano (20,0%), esta última característica considerada extremadamente variable. El ANOVA mostró una significativa interacción híbrido x ambiente para la concentración de fitoesteroles totales en el aceite (P=0,0385) así como un efecto significativo del ambiente (P=0,0010), no detectándose diferencias significativas entre híbridos (P>0,3685). Las concentraciones más bajas se detectaron en Vicuña Mackenna e Hilario Ascasubi (híbridos Agrobel y Macon RM) y las mayores para Dekasol 3920 en la localidad de Manfredi. En todos los aceites los fitoesteroles mayoritarios fueron β-sitosterol, campesterol, estigmasterol, Δ-7-estigmastenol, Δ-7-avenasterol y Δ-5-avenasterol. Se detectaron bajas concentraciones de nueve fitoesteroles y dos fitoestanoles. En este primer estudio exploratorio se detectó una interesante variabilidad en la concentración de fitoesteroles en el aceite de híbridos cultivados en diferentes localidades de Argentina. Esta variación se debió principalmente a un efecto ambiental, considerándose necesario ampliar el estudio a una mayor cantidad de híbridos cultivados en el país.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death in the Western countries, being the high plasmatic cholesterol levels a risk indicator. Among the components of a diet that could help to control cholesterol are the phytosterols which are found in vegetables, mainly oils. Any previous literature research on phytosterols in sunflowers cultivated in Argentina has not been found. The present work carries out a first evaluation on the variation of phytosterols on sunflower hybrids oil cultivated in our country. Samples from “La Red de Ensayos Comparativos de Rendimientos Buenos Aires Sur y La Pampa” were used. Five contrasting environments that form the sunflower growing region Balcarce, San Francisco de Bellocq, Hilario Ascasubi, Manfredi and Vicuña Mackenna, and four sunflower

hybrids: Agrobel 967 (Seminium), Dekasol 3920 (Dekalb-Monsanto S.A.), Macon RM (Syngenta) y Olisum 2 (Advanta Semillas S.A.I.C.) were selected. There were determined the efficiency of the seed in the middle furrow on each parcel (kg ha^{-1}), the oil percentage on the grains through Nuclear-Magnetic Resonance and the content and composition of sterols through Gaseous Chromatography. The oil percentage in the grains ranged between 44.7 and 56.3 %, higher values than those from the present commercial base in Argentina (42 %). The average concentration of total phytosterols for the set of samples analyzed was 4095± 400 mg sterols kg oil $^{-1}$ (range 3513 – 4936 mg kg oil $^{-1}$), having been detected higher concentrations than those reported on crops produced in other countries. The coefficient of variation for the total phytosterols concentration (group of environments and hybrids, 9.8%) was similar to the oil percentage (5.9%) and minor to the grain yield (20.0 %), the latter being considered as extremely variable. The ANOVA showed a significant hybrid x environment interaction for the total phytosterols concentration in oil (P=0.0385) as well as a significant effect on the environment (P=0.0010), not being detected significant differences among hybrids (P>0.03685). The lowest concentrations were detected in Vicuña Mackenna and Hilario Ascasubi (Agrobel and Macon RM hybrids) and the highest in Dekasol 3920 in Manfredi. The main phytosterols present in all oils were beta-sitosterol, campesterol, stigmasterol, Δ-7-stigmastenol, Δ-7-avenasterol and Δ-5-avenasterol. Low concentrations of nine phytosterols and two phytostanols were detected. In this first exploratory research, an interesting variation in the concentration of phytosterols in hybrids oil cultivates in different Argentine regions was detected. This variation was mainly due to an environmental effect so it is considered necessary to broaden the study to a greater quantity of hybrids cultivated in Argentina.

PALABRAS CLAVE: *girasol, aceite, fitoesteroles, híbridos, ambientes.*

KEYWORDS: *sunflower, oil, phytosterols, hybrids, environment.*

INTRODUCCIÓN

Actualmente una de las primeras causas de muerte en el mundo occidental las constituyen las enfermedades cardiovasculares. Si bien el origen de esta patología es complejo y en ella intervienen muchos factores, es aceptado que un importante indicador de riesgo para su desarrollo los constituye los niveles altos de colesterol plasmático. Entre los componentes de la alimentación que pueden actuar como aliados en el control del colesterol plasmático están los *fitoesteroles* (Palou *et al*. 2005, Nolasco 2008) A los fitoesteroles se les atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas, fungicidas y efectos beneficiosos en el control de la hiperplasia prostática benigna (Ling y Jones 1995, Lowe y Ku 1996). Sin embargo, la función mejor caracterizada y científicamente demostrada es disminuir el colesterol total plasmático y las lipoproteínas de baja densidad (LDL-col, "colesterol malo"), sin modificar los niveles de las proteínas de alta densidad (HDL-col, "colesterol bueno") ni de los triglicéridos totales (Valenzuela y Ronco 2004, Nolasco 2008). A pesar de las similitudes en sus estructuras químicas, los esteroles vegetales y el colesterol difieren marcadamente en lo que respecta a su absorción intestinal. Mientras que el colesterol se absorbe entre un 34 a 70 %, los fitoesteroles los hacen en muy baja proporción (0,5-15 %).

Los fitoesteroles son esteroles derivados de plantas con estructuras similares y funciones análogas al colesterol de los vertebrados. Los fitoesteroles actúan como importantes componentes estructurales de las membranas vegetales estabilizando las bicapas lipídicas, al igual que lo hace el colesterol en las membranas animales (Moreau *et al.* 2002, Palou *et al.* 2005). Los esteroles vegetales son miembros de la familia de los triterpenos, siendo su base estructural el sistema cíclico del perhidro-1,2-ciclopenteno fenantreno. Difieren estructuralmente del colesterol (**Figura 1a.**) por la presencia de sustituyentes del tipo metilo o etilo en la cadena lateral de la molécula. Dentro del grupo de los esteroles vegetales encontramos dos categorías o subgrupos, los esteroles (**Figura 1b.**) con un doble enlace en la posición 5 y los estanoles (**Figura 1c.**) que no cuentan con dicho doble enlace (saturados).

Los fitoesteroles están presentes, de forma natural y en pequeñas cantidades en frutas, verduras, frutos secos, granos oleaginosos, leguminosas, hojas y tallos de prácticamente todos los vegetales conocidos. Los fitoestanoles se encuentran naturalmente en la pulpa de los árboles como el pino, en los cereales (trigo y maíz) y en aceites vegetales (tales como el aceite de oliva y maíz). Pueden ser obtenidos para uso comercial mediante la hidrogenación de los esteroles vegetales. La fuente más concentrada en

fitoesteroles son los aceites vegetales, como los de maíz, girasol, soja y colza (que contienen entre un 0,1% y 0,8%), con excepción del aceite de palma que es deficiente en esteroles vegetales tras el proceso de refinado. En el proceso de refinación de los aceites se pierden parte de sus fitoesteroles, fundamentalmente en la etapa de desodorización debido a las altas temperaturas y alto vacío. En esta etapa, los fitoesteroles libres destilan junto con los ácidos grasos libres y los tocoferoles. El aceite de soja es uno de los más utilizados industrialmente como fuente de obtención de fitoesteroles, siendo otras fuentes el girasol y el maíz.

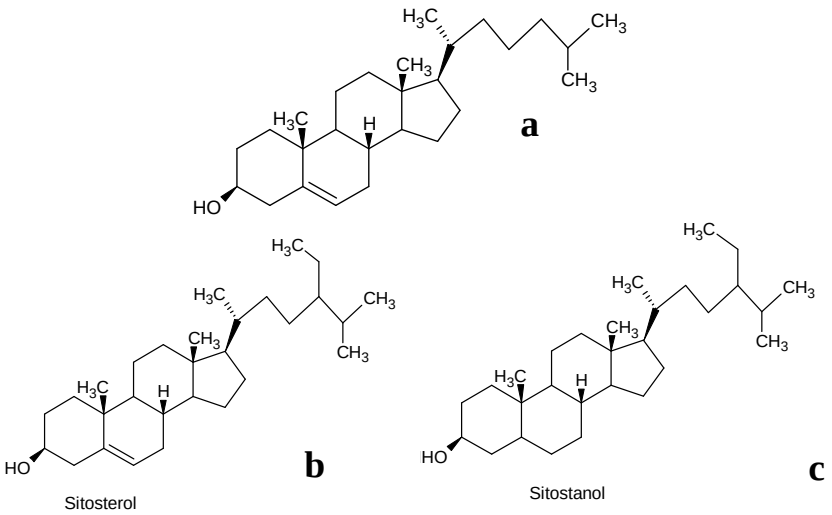


Figura 1. **a**: estructura del colesterol, **b**: estructura de un fitoesterol, **c**: estructura de un fitoestanol.

Si bien se han identificado más de 40 estructuras químicas diferentes de esteroles vegetales considerados GRAS (sustancias reconocidas por los expertos como seguras), tres son los que están en mayor proporción en sus fuentes de origen: el β-sitosterol, el campesterol y el stigmasterol, los que en conjunto constituyen entre 90-98% de los fitoesteroles identificables en extractos vegetales.
Vlahakis y Hazebroek (2000) realizando estudios sobre soja, girasol y canola, detectaron que la concentración y composición de fitoesteroles es afectada por factores genéticos, sugiriendo la posibilidad de obtener híbridos con mayor contenido de fitoesteroles, ya sea para obtener calidades específicas o mayor valor agregado de un subproducto de la refinación del aceite. Así como los factores genéticos pueden modificar significativamente el nivel de fitoesteroles en aceites vegetales, también se ha observado la influencia de factores ambientales sobre los mismos, por ejemplo en el grano de soja (Vlahakis y Hazebroek 2000, Roche *et al*., 2006).
El fitoesterol más abundante en el aceite de girasol es el β-sitosterol, seguido por el campesterol, estigmasterol, Δ-5-avenasterol, Δ-7-estigmastenol, Δ-7-avenasterol. El Δ-7-estigmastenol es bastante específico del girasol, habiéndose detectado aceites conteniendo al mismo en una proporción de alrededor del 20 % de los esteroles totales (Purdy 1986). No se han detectado en la literatura antecedentes de estudios sobre fitoesteroles en girasol cultivado en Argentina. En el presente trabajo se realiza una primera evaluación de la variabilidad de fitoesteroles en el aceite de híbridos de girasol cultivados en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de granos provenientes de la Red de Ensayos Comparativos de Rendimientos Buenos Aires Sur y La Pampa (campaña agrícola 2005/2006). Se seleccionaron cinco ambientes contrastantes de la zona girasolera Argentina: Balcarce, San Francisco de Bellocq, Hilario Ascasubi, Manfredi y Vicuña Mackenna. Estos ambientes poseen características contrastante de suelo y/o clima y por su situación geográfica cubren una amplia área de la zona girasolera de Argentina. Se trabajó con cuatro híbridos de girasol: Agrobel 967 (Seminium), Dekasol 3920 (Dekalb-Monsanto S.A.), Macon RM (Syngenta) y Olisum 2 (Advanta Semillas S.A.I.C.). En todas las localidades se empleó un diseño en bloques completos aleatorizado con dos repeticiones (número total de muestras = 40). Las

parcelas constaban de tres surcos de 6 m de longitud distanciadas entre si por 0,70 m. Se utilizó la densidad de planta recomendada para cada localidad.
La cosecha se realizó cuando los granos tenían 11 % de humedad (aproximadamente diez días después de madurez fisiológica, receptáculos amarillos con brácteas marrones, Farizo *et al.* 1982). Se determinó el rendimiento de semilla en el surco central de cada parcela, expresándose los valores en kg ha^{-1}. En cada una de las muestras se determinó el porcentaje de aceite y el contenido y composición de fitoesteroles. El porcentaje de aceite se determinó mediante Resonancia Magnético Nuclear (Robertson y Morrison 1979) con un Analyser Magnet Type 10 (Instruments, Buckinghamshire, England; 37), según normas AOCS Ai 2-75 (1998). El aceite de cada muestra (n=40) para la determinación de fitoesteroles se obtuvo mediante extracción por solvente (Soxhlet, n-hexano) según normas IUPAC 1.122 (IUPAC 1992). El contenido y composición de esteroles se realizó por cromatografía gaseosa (Normas COI/T20/Doc.N° 10/Rev.1). La materia grasa, conteniendo el patrón interno, se saponifica con una solución de hidróxido potásico, se extrae el insaponificable con éter etílico y se separa la fracción esterólica mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica. Los esteroles así recuperados se transforman en trimetilsililéteres y se analizan en un cromatógrafo gaseso HP4890 D (hewlett-Packard Company Palo Alto CA) provisto de detector de ionización de llama e inyector "Split/splitless" con una relación "Split" de 1:91, columna capilar SE 54 de 30 m x 0.25 mm (0,2 μm) (Supelco Inc., Bellefonte, PA). Las condiciones de operación fueron: hidrógeno como gas portador a 37 cm/s y una presión de 11 psi, temperatura programada de horno de la columna 260 ^{o}C (2 min)-1 ^{o}C/min-265 ^{o}C (20 min); temperatura de inyección: 280 °C, volumen de inyección 1 μl; temperatura de detector: 300°C). La identificación de los esteroles se realizó según indica la norma a partir de los valores publicados de tiempos de retención relativos al β-sitosterol y por comparación con el cromatograma obtenido de una solución de trimetilsililéteres de esteroles preparada en el momento de uso a partir de aceite de oliva extra virgen. La cuantificación se efectuó por el método del estándar interno utilizando α-colestanol como patrón interno. La determinación de fitoesteroles se realizó por duplicado, promediando los resultados.
Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el Software Infostat 6.0 (Universidad Nacional de Córdoba, 2003). Se utilizó un Diseño Bifactorial, en el cual uno de los factores eran los ambientes (cinco) y el otro factor los híbridos (cuatro), con dos repeticiones. Cuando se observaron diferencias significativas entre medias de variables estudiadas, las mismas se analizaron según la prueba de Duncan ($P<0,05$), teniendo en cuenta la significancia de la interacción ambiente x híbrido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las **Tablas 1** y **2** se presentan las medias del rendimiento de granos y porcentaje de aceite obtenidas para cada híbrido en los diferentes ambientes, respectivamente. Para el conjunto de híbridos y ambientes analizados el promedio de rendimiento de granos fue de 3345 kg ha^{-1} (coeficiente de variación del 20%). El porcentaje de aceite de los granos osciló entre 44,7-56,3%, valores superiores a la actual base de comercialización de Argentina (42%). El promedio de los porcentajes de aceite fue máximo en Hilario Ascasubi y mínimo en San Francisco de Bellocq, siendo el valor de la diferencia relativa de 15,5%. El promedio del porcentaje de aceite de cada genotipo ensayado, calculado a través de todos los ambientes en los que se los analizó superó ampliamente la base de comercialización antes mencionada (Agrobel 967: 52,2%, Macon RM: 49,6%, Dekasol 3920: 48,9% y Olisum 2: 49,0%).

Tabla 1. Rendimiento de granos (kg ha^{-1}) para cada híbrido y en cinco ambientes

Híbridos	**Localidad**					
	Balcarce	**San Francisco de Bellocq**	**Hilario Ascasubi**	**Manfredi**	**V. Mackenna**	**Promedio**
Agrobel 967	3430	2529	4129	2443	3265	3159
Macon RM	3401	2463	4709	3064	3389	3405
Dekasol 3920	3770	3037	4681	2992	3885	3673
Olisum2	3503	2171	3922	2796	3311	3141
Promedio	3526	2550	4360	2824	3463	3345

Tabla 2. Porcentaje de aceite (promedio ± desvío estándar) para cada híbrido en las seis ambientes.

Híbridos	Localidad				
	Balcarce	**San Francisco de Bellocq**	**Hilario Ascasubi**	**Manfredi**	**V. Mackenna**
Agrobel 967	51,0 ± 1,3	49,3 ± 10,6	56,3 ± 2,4	49,9 ± 0	54,7 ± 0
Macon RM	49,0 ± 1,2	46,8 ± 0,3	53,0 ± 0,3	50,2 ± 0	49,0 ± 0
Dekasol 3920	48,3 ± 1,8	45,5 ± 2,4	52,9 ± 1,4	49,0 ± 0	48,9 ± 0
Olisum2	49,1 ± 2,5	44,7 ± 0,5	52,7 ± 0,6	47,2 ± 0	51,2 ± 0
Promedio	49,4 ± 1,4	46,5 ± 2,1	53,7 ± 1,9	49,1 ± 1,3	51,0 ± 2,5

La concentración promedio de fitoesteroles totales para el conjunto de muestras analizadas fue de 4095 ± 400 mg de esteroles kg aceite^{-1} (rango 3513 - 4936 mg kg aceite^{-1}, **Figuras 2** y **3**), detectándose concentraciones superiores a las reportadas en cultivos realizados en otros países (Gunstone *et al*. 1994). El coeficiente de variación para la concentración de fitoesteroles totales (conjunto de ambientes e híbridos, 9,8%) fue similar al del porcentaje de aceite (5,9%) y menor que el del rendimiento de grano (20,0%), esta última característica considerada extremadamente variable.

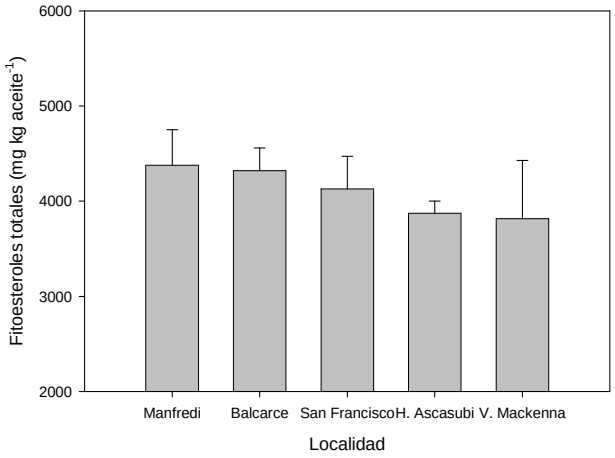


Figura 2.Concentración promedio de fitoesteroles totales en el aceite (mg kg aceite^{-1}) de los cinco ambientes considerando el conjunto de los cuatro híbridos. Las líneas verticales representan el desvío estándar.

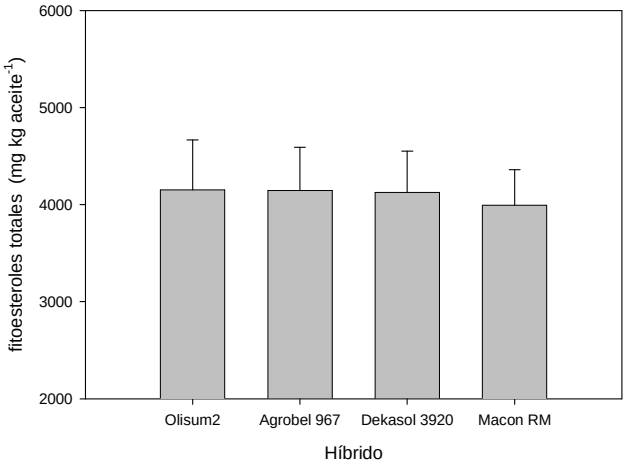


Figura 3. Concentración promedio de fitoesteroles totales en el aceite (mg kg aceite^{-1}) de los cuatro híbridos considerando el conjunto de los ambientes. Las líneas verticales representan el desvío estándar.

El análisis de la varianza mostró una significativa interacción híbrido x ambiente para la concentración de fitoesteroles totales en el aceite (P=0,0385) así como un efecto significativo del ambiente (P=0,0010), no detectándose diferencias significativas entre híbridos (P>0,3685). Las concentraciones más bajas se detectaron en Vicuña Mackenna e Hilario Ascasubi (híbridos Agrobel 967 y Macon RM) y las mayores para Dekasol 3920 en la localidad de Manfredi (**Figuras 2** y **3, Tabla 3**).

Tabla 3. Fitoesteroles totales en el aceite (mg kg^{-1} de aceite) para cada híbrido y en cinco ambientes

Híbridos	Ambiente				
	Balcarce	**San Francisco de Bellocq**	**Hilario Ascasubi**	**Manfredi**	**V. Mackenna**
Agrobel 967	4623 de	4639 de	3864 abc	3970 abcd	3596 a
Macon RM	4151 abcd	4071 abcd	3611 ab	4432 cde	3513 a
Dekasol 3920	4359 bcde	3937 abcd	3992 abcd	4936 e	3709 abc
Olisum2	4151 abcd	3982 abcd	3720 abc	4454 cde	4445 cde

Letras iguales indican diferencia no significativa (Duncan, $p \leq 0,05$)

En todos los aceites, los fitoesteroles mayoritarios fueron β-sitosterol, seguido por el campesterol, stigmasterol, Δ-7-estigmastenol, Δ-7-avenasterol y Δ-5-avenasterol, dentro de los parámetros sugeridos por el CODEX y del rango informado por Gustone *et al*. (1994) (**Tabla 4**). Asimismo, se detectaron bajas concentraciones de colesterol y brasicasterol. El Δ-7-estigmastenol, esterol que se considera bastante específico del girasol, se encuentra en cantidades moderadas. Como puede observarse en la **Tabla 4**, también se detectaron bajas proporciones (<2%) de otros siete fitoesteroles y dos fitoestanoles (sitostanol, campestanol).

Tabla 4. Composición promedio de fitoesteroles (% de esteroles totales) en los aceites de girasol, para el conjunto de híbridos y ambientes.

Esteroles-Estanoles (% esteroles totales)	Argentina	Gustone *et al.* (1994)	CODEX-STAN 210
β- Sitosterol	59,76 ± 2,25	56,2-62,8	50-70
Campesterol	9,31 ± 0,89	7,4-12,9	6,5-13
Estigmasterol	8,68 ± 1,19	8,6-10,8	6,0-13,0
Δ-7-Estigmastenol	8,99 ± 2,17	7,0-13,4	6,5-24
Δ-7-Avenasterol	3,74 ± 0,59	3,1-6,5	3,0-7,5
Δ-5-Avenasterol	2,83 ± 0,56	1,9-6,9	ND-6,9
Δ-5,23-Estigmastadienol	1,99 ± 0,40	---	---
Δ-5,24-Estigmastadienol	1,59 ± 0,13	---	---
Clerosterol	1,22 ± 0,08	---	---
Δ-7 Campesterol	0,63 ± 0,36	---	---
Sitostanol	0,54 ± 0,11	---	---
Campestanol	0,20 ± 0,05	---	---
24-Metilen colesterol	0,23 ± 0,12	---	---
Colesterol	0,25 ± 0,18	0,2-1,3	ND-0,7
Brasicasterol	0,05 ± 0,04	ND-0,2	ND-0,2

ND: no detectado

CONCLUSIONES

En este primer estudio exploratorio se detectó una interesante variabilidad en la concentración de fitoesteroles en el aceite de híbridos cultivados en diferentes localidades de Argentina (rango entre 3513 a 4936 mg kg $aceite^{-1}$), detectándose concentraciones superiores a las reportadas en cultivos realizados en otros países. Esta variación se debió principalmente a un efecto ambiental, no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre híbridos. Se sugiere ampliar este estudio a una mayor cantidad de híbridos cultivados en el país.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el apoyo económico de la Asociación de Grasas y Aceites (ASAGA), Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Universidad Nacional de Mar del Plata, INTA-Balcarce, Universidad Nacional del Sur y CONICET. Aguirrezábal, Carelli e Izquierdo son investigadores del CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS. 1998. Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society, Fifteen edition, AOCS Press, Champaing, Illinois.

Farizo CL, Pereyra VR, Cardinali F, Orioli G. 1982. Determinación de madurez fisiológica y su relación con la cosecha en cultivares de girasol. *Boletín Técnico Nº 86*, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce (INTA), Balcarce, Buenos Aires, Argentina.

Gustone FD, Harwood JL, Padley FB. 1994. *The Lipid Handbook*. Second Edition Chapman & Hall. London.

Ling WH, Jones PJ. 1995. Dietary Phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci*., 57:195-206.

Lowe F, Ku JC. 1996. Phytoterapy in treatment of benign prostatic hyperplasia: a critical review. *Urology*, 48:12-20.

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Re*,41: 457-500.

Nolasco SM. 2008. La naturaleza al servicio de la salud. Énfasis. Alimentación Latinoamericana. XIV(4): 68-74.

Palou A, Picó C, Bonet ML, Oliver P, Serra F, Rodríguez AM, Robot J. 2005. El Libro Blanco de los Esteroles Vegetales. Segunda Edición, Unilever Food S.A.

Paquot C y Haugenne A (eds.). 1992. IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, Blackell Scientific Publications Inc., Oxford.

Purdy RH. 1986. High oleic sunflower: physical and chemical characteristics, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 63: 1062-1066.

Robertson J, Morrison W. 1979. Analysis of oil content of sunflower seed by wide-line NMR. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 56: 961-964.

Roche J, Bouniols A, Moulungui Z, Barranco T, Cerny M. 2006. Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower oil components, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 18: 287-297.

Valenzuela AB, Ronco AM. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr*, 21(1): 161-169.

Vlahakis C y Hazebroek J. 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower and soybean oils: effects of genetics, planting location and temperature. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 77(1):49- 53.

Caracterización del músculo comestible de una especie marina sub-utilizada, saraca (*Brevoortia aurea*)

Characterization of edible muscle from a sub-utilized marine species, saraca (*Brevoortia aurea*)

Pennisi Forell SC [1-2], Califano AN [2-3], Manca EA [1]

[1]INIDEP-Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero.
Paseo Victoria Ocampo N°1-Escollera Norte. Mar del Plata (7600).
[2]CONICET
[3]CIDCA, CONICET, Fac. Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata
cpennisi@inidep.edu.ar

RESUMEN

Existe un creciente interés en el consumo de especies pelágicas como anchoa, caballa, bonito y atún, que se caracterizan por su elevado contenido de lípidos poli-insaturados (n-3 y n-6) benéficos para la salud. Una alternativa para desarrollar nuevos alimentos saludables es la utilización de especies sub-explotadas. La saraca, (*Brevoortia aurea)* cumple estas características, y además se descarta en grandes volúmenes durante la zafra de la corvina rubia (julio-octubre) en las costas de Buenos Aires. En las especies pelágicas, la calidad y composición de las grasas y proteínas varían según los ciclos de desove e influyen directamente en la capacidad tecnológica para desarrollar productos.

En este trabajo se caracterizó la composición química del músculo en ejemplares de saraca, a fin de utilizarlo posteriormente como materia prima alternativa para el desarrollo de productos formulados con especies tradicionales.

Se trabajó con individuos frescos de saracas, en igual estadio sexual y factor de condición (peso evisceradox100/largo^3: 1,2-1,3). Los análisis se realizaron con 45 días de diferencia (julio-octubre, 2008).

Se analizó el contenido de *lípidos* por el método Bligh & Dyer, proteínas microkjeldhal, humedad AOAC (1997) y cenizas AOAC (1990), obteniéndose los siguientes valores promedios con su correspondiente error estándard para los tres períodos considerados:

Lípidos:23,2±1,7%, 19,42±1,04% y 11,99±1,65%

Humedad:62,5±1,6%, 63,4±0,78% y 69,2±0,95%

Proteínas:15,07±0,36%, 18,59±0,36% y 18,61±0,39%

Cenizas:1,01±0,03%, 1,31±0,07 y 1,35±0,05%

Asimismo se estudió el desarrollo gonadal de los ejemplares mediante la observación microscópica de cortes histológicos, y se determinaron los índices somáticos y gonadosomáticos.

Se observó que los ejemplares de julio con las gónadas en reposo (estadioV) presentaban un mayor contenido de lípidos en el músculo. En el mes de septiembre las gónadas se encontraron en los inicios de la maduración (estadioII) y el contenido lipídico en músculo tendía a disminuir con respecto a la etapa anterior, mientras que en octubre, donde ya habían alcanzado el desove y post-desove el contenido lipídico llegó a un mínimo (aproximadamente 50% del contenido de julio). Está reducción de lípidos en músculo y el desarrollo gonadal se cree está asociado con la migración de lípidos desde el músculo a las gónadas para su desarrollo, también es mayor el requerimiento energético debido al estado fisiológico; además el aumento en el tamaño de los órganos reproductivos disminuye el espacio de la cavidad abdominal y el individuo no puede alimentarse correctamente, por lo que la energía que requiere proviene de los lípidos almacenados.

El estadio gonadal también afectó el contenido de humedad, aumentaron a medida que disminuyó el porcentaje de grasas. Los valores de proteína y ceniza se incrementaron de julio a septiembre permaneciendo constantes posteriormente.

Se analizó por cromatografía gaseosa el perfil de ácidos grasos correspondiente a los distintos períodos, observándose que la relación n-3/n-6 se mantuvo entre 5 y 6. La incorporación de músculo de *Brevoortia aurea* como complemento de especies tradicionales, produciría alimentos saludables debido al importante contenido de ácidos grasos mono y poli-insaturados, especialmente docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y oleico.

ABSTRACT

There is an increasing interest in the consumption of pelagic species like anchovy, mackerel, atlantic bonito, and tuna, characterized by their high polyunsaturated lipid content (n-3 and n-6) which are beneficial to health. The used of subexploited species is an alternative to develop new healthy products. Brazilian menhaden (*Brevoortia aurea*) fulfills these characteristics and great volumes are discarded during the caught of the white croaker (July-October) along Buenos Aires coastline. In the pelagic species quality and composition of lipids and proteins vary according to the spawning and these changes have direct influence on the technological feasibility to develop new products.

In the present work chemical composition of the muscle of Brazilian menahem was characterized to used it as an alternative raw material for the development of products formulated with traditional species.

The work was carried out on fresh individuals at the same stage of sexual maturity and condition factor (eviscerated weightx100/length^3: 1,2-1,3). Analysis were done every 45 days between July and October, 2008).

Lipid content was analyzed according to the method of Bligh & Dyer, proteins by microkjeldhal, water content AOAC(1997), and ashes AOAC(1990); the following mean values and their corresponding standard error for the three periods considered were obtained:

Lipids: 23,2±1,7%, 19,42±1,04% y 11,99±1,65%

Water content: 62,5±1,6%, 63,4±0,78% y 69,2±0,95%

Proteins: 15,07±0,36%, 18,59±0,36% y 18,61±0,39%

Ashes: 1,01±0,03%, 1,31±0,07 y 1,35±0,05%

The gonadal development of individuals was studied through microscopic observations of histological samples and the somatic and gonadosomatic indexes were determined.

It was observed that in July individuals with gonads at rest (stage V) presented a higher muscle lipid content. In September gonads were at the initial stage of maturation (stage II) and muscle lipid content showed a tendency to decrease with respect to (stage V), while in October, after reaching the egg-laying and post egg-laying stage, lipid content was minimum (approximately 50% of July content). This decrease of lipid content in the muscle and the gonadal development is thought to be associated with lipid migration from the muscle to the gonads for their development. Energy requirements also greater due to the physiological stage; besides the increase in size of the reproductive organs diminishes the abdominal cavity and the individual cannot feed himself adequately, thus the required energy is provided by the stored lipids.

PALABRAS CLAVE: *Brevoortia aurea, composición, perfil ácidos graso*.

KEYWORDS: *Brevoortia aurea, composition, fatty acid profiles*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se observan cambios en los hábitos de consumo de alimentos. Se observa un mayor interés por parte del consumidor en elegir productos que le otorguen algún tipo de beneficio para la salud. Esto se debe a que son concientes de la necesidad de mantener una dieta saludable.

Se sabe, los productos de origen marino son alimentos nutricionalmente muy completos, ricos en proteínas, ácidos grasos poli-insaturados (AGPI), vitamina y minerales, y a su vez bajos en hidratos de carbono. Entre los AGPI presentes en los peces se encuentran los ácidos grasos de la familia de los n-3. El consumo de los mismos es importante para la salud desde la gestación (Valenzuela y Nieto 2003) y durante toda la vida de las personas. Son componentes estructurales del cerebro y de la retina

durante el desarrollo del feto por lo que una madre debe incorporarlos desde antes de concebir el embarazo. Se ha observado que niños alimentados con fuentes ricas en n-3 poseen una mejor agudeza visual y una mejor capacidad para responder a la luz, lo cual está asociado con una mejor habilidad cognitiva para integrar información y exhiben mejores coeficientes intelectuales (Connor *et al.* 1996). Los beneficios del consumo de alimentos ricos en n-3 también son importantes en adultos, intervienen en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades del sistema cardiovascular, reduciendo los niveles de colesterol LDL en sangre y evitando que se acumulen plaquetas en arterias. Mejoran el desarrollo y funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso, en la habilidad en el aprendizaje y memoria. Reducen problemas de depresión y violencia, diabetes tipo 2, cáncer, obstrucción pulmonar crónica, enfermedades renales, psoriasis, artritis reumatoide (Castro-Gonzalez 2002).

Las especies marinas pelágicas como: anchoa, arenque, caballa, bonito y atún, se caracterizan por ser pescados grasos, con valores que pueden ser superiores al 20% de grasa en el músculo, y compuesta principalmente por ácidos grasos poli-insaturados (n-3 y n-6) benéficos para la salud. Son la base de la dieta Mediterránea, reconocida mundialmente como un patrón de alimentación saludable, considerado ideal para la prevención de las enfermedades cardiovasculares y cáncer (Royo 2004). A su vez la Asociación Americana del Corazón (AHA) recomienda para una nutrición saludable consumir al menos dos raciones de pescado, preferiblemente graso, a la semana (AHA 2006). Una alternativa para desarrollar nuevos alimentos saludables, a precios accesibles y por lo tanto disponibles para la población, es utilizar materia prima, a partir de especies sub-explotadas. En el mar argentino, principalmente en el estuario del Río de la Plata y la costa de la provincia de Buenos Aires, se encuentra una especie conocida por el nombre popular de saraca o lacha, (*Brevoortia aurea*) (Acha y Macchi 2000). Esta especie, es pelágica, pertenece a la familia Clupeidae (Cousseau y Perrota 2000). Es familiar de la sardina y del arenque, y por poseer poco valor comercial, se descarta en grandes volúmenes, principalmente ocurre durante la zafra de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) (julio-octubre). Tiene escasa importancia comercial, debido a la gran cantidad de espinas en toda su estructura muscular; por lo que existe poca información sobre su composición proximal y sus variaciones estacionales.

Para el desarrollo de productos de origen marino es importante conocer la composición de la materia prima durante el ciclo biológico, principalmente en las especies pelágicas ya que sufren grandes variaciones en la cantidad y calidad de sus lípidos (Larsen *et al.* 1997). Estos cambios pueden influir notablemente en las propiedades para desarrollar productos.

Se sabe que es muy marcada la relación entre las variaciones del estado fisiológico y la composición muscular (Encina y Granado-Lorencio 1997). Los biólogos marinos utilizan índices morfológicos para expresar la dinámica en la utilización de la energía endógena de órganos tales como gónadas, hígado y la masa corporal (Collins y Anderson 1995). Estos indicadores son el Factor de Condición (FC) para definir el estado físico, fisiológico que expresa el estado de bienestar de cada ejemplar. También se determinan el Índice o Factor Somático (IS) que indica el estado nutricional, la energía almacenada como lípidos corporales y proteínas que pueden ser movilizados para enfrentar los requerimientos en períodos sin alimentación (Jobling 1995). Finalmente el Índice Gonadosomático (IG) que expresa el estado y grado de desarrollo de las gónadas del animal.

En este trabajo se caracterizó la composición química del músculo en ejemplares de saraca, capturadas durante la zafra de la corvina rubia. Se evaluaron los aspectos biológicos como el factor de condición, estados de madurez, índice gonadosomático y somático con el objeto de comprender el estado biológico y su relación con la composición del músculo de saraca. A fin de utilizarlo posteriormente como materia prima alternativa, en los distintos periodos, para el desarrollo de productos conformados formulados actualmente con especies blancas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Empleado

Se trabajó con individuos frescos de saracas (*Brevoortia aurea*), obtenidos en el puerto de Mar del Plata. Las muestras se recolectaron cada 45 días, durante los meses de julio a octubre de 2008 (invierno-primavera). Los mismos fueron capturados por la flota costera en la zona de pesca de la Bahía de Samborombon-Provincia de Buenos Aires. De cada muestreo se analizaron 20 ejemplares en posrigor y de talla mayor a 32 cm, para asegurar trabajo con individuos adultos (Acha 1999).

Análisis Morfométrico

Se registraron datos de talla y peso para todos los ejemplares. Las medidas tomadas fueron: Largo Total (LT), Peso Entero (PE), Peso Eviscerado (PEv) y Peso de las Gónadas (PG). Utilizando instrumentos de medición ictiómetro de 1000 mm para las medidas de longitud total y una balanza eléctrica Mettler PK 4800 de precisión 0.001g. A su vez se guardaron las gónadas en formol para su evaluación en el laboratorio de histología, donde se determinó el sexo y estadio sexual a cada uno. A partir de estos datos se determinaron los índices morfológicos de los individuos.

Índices Morfológicos

Factor de condición eviscerado (FCev). Relaciona el peso del cuerpo sin los órganos y el largo al cubo expresado en porcentaje. Factor de Fulton modificado por Clark.

$$FCev = \frac{PEv}{LT^3} \times 100$$

Ecuación 1

Índice gonadosomático (IGS). Que es una relación entre el peso total de las gónadas y el peso total del animal sin las gónadas expresada en porcentaje.

$$IGS = \frac{PG}{(PT - PG)} \times 100$$

Ecuación 2

Índice somático (IS). Es una relación entre el cuerpo eviscerado y el cuerpo entero expresado en porcentaje:

$$IS = \frac{PEv}{PT} \times 100$$

Ecuación 3

Los análisis histológicos fueron realizados por el departamento de Histología del INIDEP. Las muestras formalizadas fueron deshidratadas en un equipo Histoquinet y observadas al microscopio. Las gónadas se clasificaron según el grado de madurez e hidratación de los ovocitos. Se clasificaron en gónadas en maduración (estadio II), desoves parciales (estadio III), posdesove (estadio IV) y reposo (estadio V) (Acha 1999).

Preparación y Acondicionamiento de las Muestras

Se obtuvieron los filetes de cada ejemplar, evitando retirar la grasa subcutánea visible durante el corte. Los filetes de cada individuo se homogenizaron y se almacenaron en bolsas de polietileno de 100g, en freezer a -25°C.

Para el análisis de composición se utilizaron 6 individuos con FCev entre 1,2 y 1,3 y de igual estadio sexual (predominante de cada periodo).

Análisis Químicos

Se determinó por duplicado el contenido de lípidos por el método Bligh & Dyer modificado por Underland (Tanamati *et al* 2005), humedad AOAC (1997), cenizas AOAC (1990) y por cuadruplicado proteínas microkjeldhal utilizando el factor de corrección 6,25.

El perfil de ácidos grasos se realizó sobre fases grasas extraídas por el método Bligh & Dyer. Se determinó en el Laboratorio de Calidad de Omega Sur, Parque Industrial Savio, Batán-Mar del Plata en cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17A, con inyector Split, y detector de ionización de llama con columna capilar de sílica fundida Omegawax Supelco 320 (30 m/0,32mm id/0,25 µm), gas transportador Nitrogeno a un flujo de 25cm/seg y las condiciones cromatográficas fueron: temperatura detector 250ºC, temperatura del puesto de inyección 260ºC y temperatura inicial del horno de 190ºC y aumentando progresivamente hasta 225°C.

Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y test de Tuckey para las comparaciones por pares. Se realizaron regresiones lineales de los parámetros bioquímicos y morfométricos con la talla de los individuos de cada estadio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el análisis histológico se observó que las muestras pertenecientes al mes de julio se encontraban en reposo (estadio V) por la presencia de estructuras en previtelogénesis. Mientras que las muestras correspondientes al mes septiembre presentaron ovocitos vitelado, lo que indica el comienzo de la maduración de estos órganos (estadio II). Las muestras correspondientes al mes de octubre mostraron, además de ovocitos vitelados, atresias alfa y folículos post-ovulatorios lo que indica que ya habían realizado algunas puestas parciales.

Los resultados de las mediciones morfométricas se detallan en la **Tabla 1** y de los índices morfométricos en la **Tabla 2**. Los índices FCev, IGS como el IS no presentaron correlación con la talla ($p>0,01$) en ningún estadio.

Tabla 1. Valores promedio y desvío estándar de los Parámetros Morfométricos.

MUESTRA	LARGO TOTAL (cm)	PESO TOTAL (g)	PESO GONADAS (g)	PESO EVISCERADO (g)
Reposo	38.17±0.52	687.36±26.82	30.24±2.36	615.42±24.82
Maduración	34.24±0.56	559.62±29.49	44.15±44.52	475.53±23.64
Desove	34.39±0.48	576.46±26.60	71.01±5.16	474.39±20.80

Tabla 2. Valores promedio y desvíos estándar de Índices Morfológicos.*

Estadio	FCEv	IGS	IS
Reposo	$1.1±0.03^a$	$4.64±0.34^a$	$89.47±0.42^a$
Maduración	$1.16±0.02^a$	$8.27±0.59^b$	$85.34±0.47^b$
Desove	$1.16±0.02^a$	$13.50±0.61^c$	$82.73±0.44^c$

* Diferentes superíndices en la misma columna, indican diferencias significativas. ($p<0.001$)

En el análisis de FCev en cada estadio, no se observaron diferencias significativas ($p>0,01$) lo que indica que todos los ejemplares utilizados presentaban buen estado fisiológico. Por otro lado el IGS presentó diferencias significativas ($p<0,001$) entre los distintos periodos **(Tabla 2)**. Se encontraron gónadas pequeñas durante el reposo, menores de 15 g, mientras que en el desove se encontraron gónadas de mayor tamaño, de 110 g. El aumento en el peso de las gónadas se debe al desarrollo y crecimiento de las células sexuales (formación de organelas, acumulación de nutrientes durante el desarrollo de gametos femeninos y masculinos, crecimiento del vitelo, formación de vacuolas lipídicas en ovoplasma e hidratación previa al desove). El IS presentó un comportamiento inverso al IGS también con diferencias significativas ($p<0,001$) **(Tabla 2)**. El elevado índice somático durante el reposo, indica la alta cantidad de energía de reserva que almacena en músculo la especie, para destinarlo a las diferentes necesidades durante el periodo de reproducción y llegar con éxito al desove. El IS va disminuyendo a medida que el individuo va consumiendo, principalmente, los lípidos durante el ciclo biológico. A su vez, el IG y el IS presentaron una correlación significativa entre sí **(Figura 1)**.

Se observó que la composición de los individuos no presenta variaciones debidas a la talla. Huss (1988) explica que el contenido de grasa en algunas especies pelágicas varía levemente con el tamaño, así, los peces de mayor porte pueden llegar a contener solo 1 % más de grasa que peces pequeños.

Se encontraron diferencias significativas de la composición entre los meses analizados (**Figura 2**) ($p<0,01$). Los lípidos disminuyeron significativamente ($p<0,01$), en la **Figura 2** se observa en descenso. Las muestras de reposo presentaron mayor contenido de lípidos 23% en músculo, y fue disminuyendo a medida que progresaba el ciclo, llegando a 12% de lípidos en músculo en el desove (50 % menos que los datos de julio). El elevado porcentaje de los lípidos que alcanzan los peces durante el reposo se debe a la buena alimentación que logran en dicha etapa. La cantidad y calidad del

alimento disponible les permite recuperarse tanto fisiológica como biológicamente y acumular energía para el siguiente ciclo reproductivo. La reducción del contenido lipídico se debe al esfuerzo energético y la movilización de los lípidos que invierte los peces para el desarrollo de los huevos y el esperma (Tocher 2003), con el fin de asegurar la descendencia. El gasto energético está dado por la migración hasta las áreas de puesta y por la inadecuada alimentación durante la migración, debido a escasez de alimento hasta llegar a las áreas adecuadas. Otra causa esta dada por el aumento en el tamaño de los órganos reproductivos, que disminuyen el espacio de la cavidad abdominal y el individuo no puede alimentarse correctamente, por lo que la energía que requiere para todo el proceso proviene principalmente de los lípidos de reserva (Huss 1988). Otros autores encontraron variaciones similares en la composición en otras especies pelágicas. Nielsen *et al.* (2005) encontró este comportamiento para arenque (*Clupea haerngus*), Zaboukas *et al.* (2006) observo una reducción similar del 59,2 % de los lípidos en bonito (*Sarda sarda*) y Huss (1998) en el arenque del Mar del Norte.

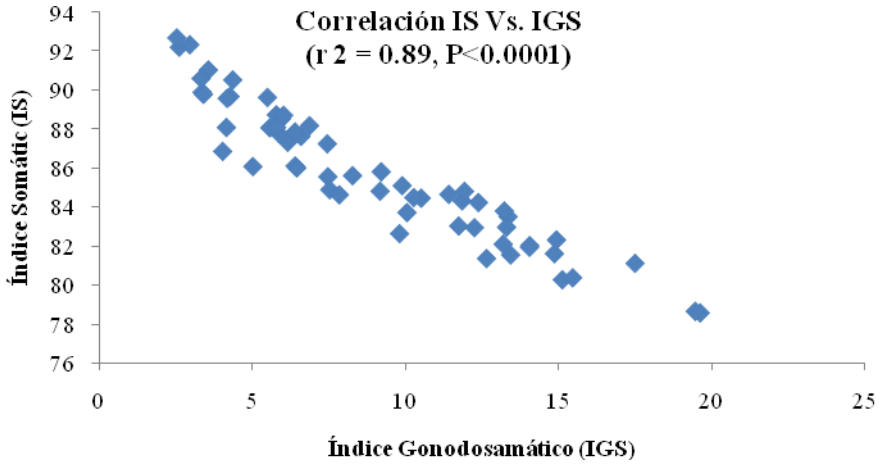


Figura 1. Regresión lineal entre Índice Somático e Índice Gonodosomático de ejemplares de *Brevootia aurea* durante el periodo de Julio a Octubre. La ecuación del modelo se escribe: y = 92.33 -0.73*x (r^2 = 0.89, P<0.0001, n=59.).

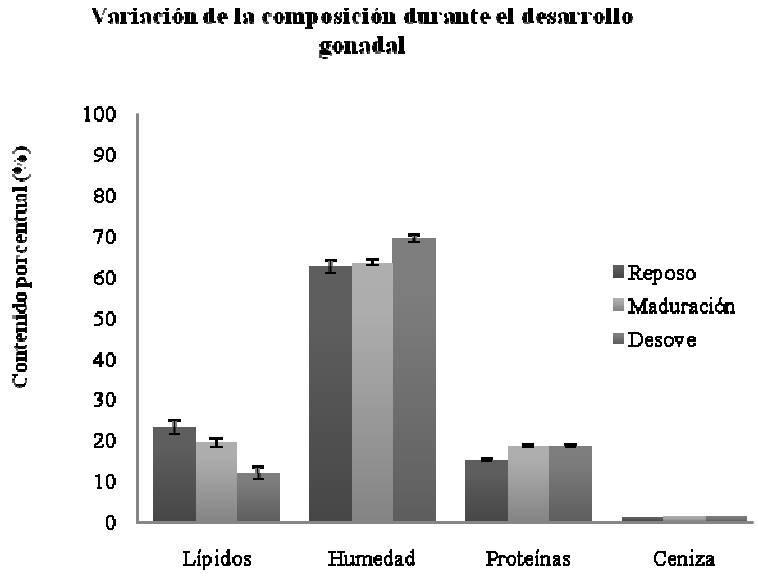


Figura 2. Variación en el contenido de lípidos, humedad, proteínas y cenizas de músculo de *Brevoortia aurea* durante el desarrollo gonadal.

Inversamente al comportamiento de los lípidos en el periodo señalado, la humedad aumentó significativamente de 62,5% en el reposo, a 63,5% en la maduración y alcanzó 70% durante el desove (**Figura 2)** ($p<0,01$). Esto representó un incremento del 12% del contenido agua en músculo. Los aumentos no fueron significativos entre el mes en reposo y la maduración, pero sí lo fueron ambos estadios con respecto al desove.
A su vez se observó una fuerte correlación entre el contenido de lípidos y el de agua $r^2=0,9349$ ($p<0,001$). En la **Figura 3** se observa la relación entre ambas variables. La relación agua-grasa constituyen cerca del 80% del contenido en el músculo de algunas especies marinas (Huss 1988), mientras que las proteínas, los minerales y fibras se mantienen constantes (Nielsen *et al.* 2005). Algunos autores proponen utilizar estas ecuaciones para predecir el contenido de lípidos de cada especie en función del contenido de humedad, la cual, a diferencia de la extracción de lípidos, es rápida de determinar. La ecuación obtenida para este periodo en *Brevoortia aurea* es la siguiente:

$$y = -1,3775\ x + 107,77 \qquad \textbf{Ecuación 4}$$

donde x corresponde al contenido de agua e y al de lípidos, ambos expresados en %. Relaciones similares fueron encontradas en arenques, por Nielsen *et al.* (2005) ($y = -1,014\ x + 82,274$) y por Kent et al. (1992b) ($y = -1,25\ x + 100,4$).

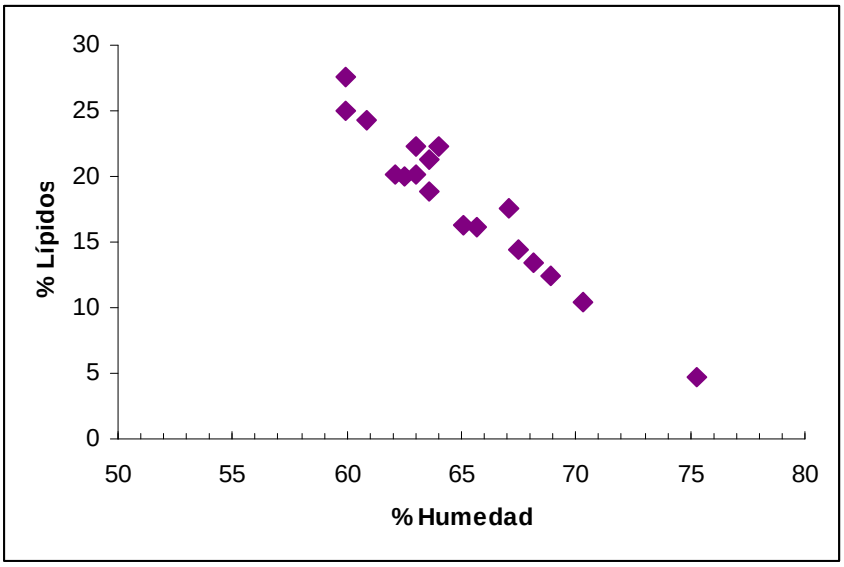


Figura 3. Relación entre contenido de lípidos y contenido de agua en músculo de *Brevoortia Aurea*. ($r^2=0,9349$, $P<0,001$).

Los contenidos de proteína y ceniza presentaron aumentos levemente significativos ($p<0,001$), sólo en el paso de los ejemplares en reposo a la maduración y luego se mantuvieron constantes. El contenido de proteínas aumento de 15% en julio, 18,6% en septiembre y se mantuvo constante en octubre.
En la **Tabla 3** se observa el perfil de ácidos grasos. En esta especie, se encontró un elevado contenido de AGPI en los ejemplares en reposo. Los principales ácidos grasos del músculo de saraca son el palmítico 24%, palmitoléico 15%, oleico 18%, DHA 9% y EPA 6%. Además se observó que la relación de n3/n6 fue elevada (6,27), por lo que el consumo del mismo permitiría mejorar el balance 20/1 de la relación n6/n3 que actualmente se incorpora en las dietas occidentales. Los expertos de FAO-OMS (1997) recomiendan consumir 5/1 de n-6/n3. Valores similares de los ácidos grasos principales como de la relación n3/n6 encontró Huynh *et al.* (2007) en músculo arenques del pacífico durante el periodo de reposo post desoves.

Tabla 3: Valores promedios y desvíos estándar del perfíl de ácidos grasos.

Perfil Ácidos Grasos[a]	
∑ n-3	20.69±1.18
∑ n-6	3.34±0.15
n3/n6	6.27±0.45
EPA (C20:5n-3)	6.04±0.44
DHA (C22:6n-3)	9.76±0.86
∑ Insaturados	62.15±0.52
∑ Mono-insaturados	39.29±1.82
∑ Poli-insaturados	23.75±1.37
∑ Saturados	37.75±0.99

a Valores promedio ± desvío estándar.

CONCLUSIONES

La incorporación de músculo de *Brevoortia aurea* como complemento de especies blancas tradicionales, desde el punto de vista nutricional, es una buena opción para realizar productos saludables. Esto se debe al importante contenido de ácidos grasos poli-insaturados, especialmente docosahexaenoico (DHA), eicosapentaenoico (EPA) y oleico que presenta. Además el elevado contenido de n-3 frente al contenido de n-6 permite mejorar el balance nutricional en el consumo de ácidos grasos. También es una fuente de proteínas alto valor biológico y de excelente digestibilidad. Es importante evaluar la composición de la materia prima en cada estadio, para definir en que tipo de producto es más apta tecnológicamente. De esta manera, las saraca pescadas en octubre y hasta que finaliza el desove podrían ser utilizadas para desarrollar productos tipo hamburguesas, nuggets. Mientras que las capturadas desde el fin del periodo de desove y hasta llegar a julio se podrían utilizar para desarrollar productos del tipo de salchichas o pastas untables, aprovechando la variación estacional del contenido lipídico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr Macchi y al grupo de trabajo del Gabinete de Histología del INIDEP. A la Lic. Silvana Guccione del Laboratorio de Calidad-Omega Sur. Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha Eduardo Marcelo y Macchi Gustavo J. 2000. Spawning of Brazilian menhaden, *Brevoortia aurea*, in the Río de la Plata estuary off Argentina and Uruguay. Fishery Bullitin, 98:227-235.

Acha Eduardo Marcelo, 1999. Estrategia reproductiva de la saraca, Brazilian menhaden, *Brevoortia aurea* (Pisces: *Clupeidae*), en el estuario del Río de la Plata. Tesis (Doctorado) Mar del Plata, pág 174, Biblioteca INIDEP.

AHA (Asociación Amaricana del Corazón). 2006. Aprenda y viva más, conozca su corazón. [online]. [citado octubre 2009]. Disponible en: http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1165854028272CSC_Nuticion_Repros.pdf .

Castro-González MI. 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. [online]. Interciencia 27: 128-136. [citado noviembre 2009]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442002000300005&lng=es&nrm=iso>.

Collins AL and Anderson TA. 1995. The regulation of endogenous energy stores during starvation and refeeding in the somatic tissues of the golden perch. Journal of Fish Biology. 47:1004-1015.

Connor WE, Lowensohn R and Hatcher L. 1996. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. Lipids 31: S183-S187.

Cousseau M. y Perrotta R. 2000. Peces marinos de Argentina, biología, distribución, pesca. Mar del Plata, INIDEP. pag 167.

Encina L and Granado-Lorencio C. 1997. Seasonal variation in the physiological status and energy content of somatic and reproductive tissues of chub. Journal of fish biology 50: 511-522.

FAO (Food and Agriculture Orgabization of the United Nations). 1997. Grasas y aceites en la nutrición humana. 3. Consulta FAO/OMS de expertos. [on line] [citado noviembre 2009]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V4700S/v4700s00.HTM>.

Huss H. 1988. Composición química. En: Colección FAO. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. Manual de capacitación preparado por el programa de capacitación FAO/DANIDA. En: Tecnología Pesquera y Control de Calidad. Colección FAO N°: 29. pag 15-24.

Huynh MD, Kitts D, Hu C and Trites AW. 2007. Comparison of fatty acid profiles of spawning and non.spawning Pacific herring, Clupea harengus pallasi. Journal Comparative and Phisiology, Part B 146: 504-511.

Kent M, Lees A and Christie R. 1992 b. Use of a portable microwave fat meter with herring (*Clupea harengus*). En: J. R Burt, R. Hardy &K J Whittle (Eds). Pelagic fish, the resource and its exploitation Farnham, Surrey, UK : Fishing News Books. pag. 157-164.

Larsen E, Jensen S and Zappey H. 1997. Quality management and measurement in the fish industry. En: Luten JB, Borrensen T, Oehlenschlager J (Eds), Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality. Amsterdam, Elsevier. pag. 403-410.

Malcolm J. 1995. Environmental biology of fishes. Fisheries & Fisheries Series No. 16. London. Chapman & Hall. pag 455.

Nielsen D, Hyldig G, Nielsen J and Nierlsen H. 2005. Lipid content in herring (*Clupea harengus L.*)-influence of biological factors and comparison of different methods of analyses: solvent extraction, Fatmeter, NIR and NMR. LWT 38: 537-548.

Royo Miguel A. 2004. Recomendaciones nutricionales y alimentarias para una dieta cardiosaludable. Revista Española de Nutrición Comunitaria 10(3):122-143

Tanamati A, Oliveira C, Visentainer J, Matsushita M and Souza E. 2005. Comparative study of total lipids in beef using chlorinated solvent and low-toxicity solvent methods. JAOCS 82: 393-397.

Tocher D. 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Reviews in fisheries Science 11: 107-184.

Valenzuela A y NIETO S. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. Revista chilena de pediatría. [online], 74: 149-157. [citado abril 2009]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-10620030002000002&lng=es&nrm=iso.

Zaboukas N, Miliou H, Megalofonou P and Moraitou M. 2006. Biochemical composition of the Atlantic bonito *Sarda sarda* for the Aegean Sea (eastern Mediterranean Sea) in different stages of sexual maturity. Journal of fish biology 69: 347-362.

Efecto combinado del pH y la homogeneización sobre la dispersibilidad de compuestos nitrogenados y polisacáridos de pared celular de levadura

Combined effect of pH and homogenization on dispersibility of nitrogen compounds and polysaccharides from yeast cell wall

Rabey M, Palazolo GG, Sceni P, Wagner JR

Departamento de Ciencia y Tecnología – Universidad Nacional de Quilmes, Argentina
jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

Se estudió la dispersibilidad de proteínas y carbohidratos en dispersiones acuosas de pared celular de levadura de cerveza deshidratada en función del pH (3-11) y sometida a distintos métodos de homogenización (agitación magnética, homogeneizador de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax y homogeneizador a válvula de alta presión). Las dispersiones obtenidas se caracterizaron además, por medidas de tamaño de partícula y capacidad de retención de agua. Los resultados mostraron que la dispersibilidad de proteínas y polisacáridos aumentó con el incremento del pH y la potencia del homogeneizador empleado. Además, se observó que la combinación del aumento del pH y la potencia de la homogeneización favoreció notablemente la dispersibilidad de compuestos nitrogenados e hidratos de carbono; a pH 7,0 el pasaje de una homogenización con Ultraturrax a una con alta presión provocó una aumento del 40 y 48% en la dispersibilidad de nitrógeno y carbohidratos respectivamente. Las distribuciones de tamaño de partícula en las dispersiones a pH constante mostraron una marcada disminución del diámetro promedio (D_{43}) por la influencia del método de homogeneización. Además, se observó un aumento de D_{43} de la fracción insoluble en función del pH para la dispersión circulada en el homogeneizador a válvula de alta presión. Por otra parte, la capacidad de retención de agua del insoluble también se vio incrementada en función del pH y muy marcadamente por la energía de homogenización a la que fueron sometidas las dispersiones de pared celular. La micronización reduce el tamaño de partícula mejorando la dispersibilidad proteica y de polisacáridos en el extracto de pared.

ABSTRACT

It has been studied the dispersibility of protein and carbohydrates in aqueous dispersions of cell wall of dried brewer's yeast as a function of pH (3-11). Such dispersions have been subjected to various methods of homogenization (magnetic stirring, high-speed homogenizer rotor / stator homogenizer and a Ultraturrax High pressure valve). The dispersions obtained were characterized further by measurement of particle size and water holding capacity. The results showed that dispersibility of protein and polysaccharides increased with increasing pH and the power of the homogenizer used. It was also noticed that the combination of higher pH and the strength of the homogenization enhanced the dispersibility of nitrogen compounds and carbohydrates; pH 7.0 the passage of a homogenization Ultraturrax with a high pressure caused an increase in the 40 and 48% in nitrogen and carbohydrate dispersibility respectively. The distribution of particle size in dispersions at pH constant showed a marked decrease in the average diameter (D_{43}) caused by the influence of the method of homogenization. In addition, there was an increase in the insoluble fraction of D_{43} as a function of pH for the circulated dispersion in the high-pressure valve homogeniser. Moreover, the water holding capacity of insoluble was also increased as a function of pH. Such increase was even higher due to the energy of the homogenization to which the dispersions of the cell wall were subjected. Micronization reduces the particle size improving dispersibility of protein and polysaccharide in the wall extract.

PALABRAS CLAVE: *dispersibilidad, homogeneización, pared de levadura, proteína.*

KEYWORDS: *dispersibility, homogenization, protein, yeast cell.*

INTRODUCCIÓN

Las propiedades funcionales son aquellas propiedades no nutricionales que permiten el uso de un ingrediente en la formulación de alimentos. La industria alimenticia está en continua búsqueda de fuentes proteicas alternativas que puedan competir con las que actualmente están en el mercado, como las proteínas de origen animal, las de origen vegetal (por ejemplo, los aislados proteicos de soja), y que posean características nutritivas, funcionales y sensoriales adecuadas para utilizarse en el desarrollo de nuevos productos alimenticios. Existen diversas formas de clasificar las propiedades funcionales (Fennema 1996); en este trabajo, sólo se tendrán en cuenta las propiedades de hidratación que están vinculadas a la interacción de las proteínas y polisacáridos con el agua tales como la solubilidad, dispersibilidad y retención de agua. Las levaduras y compuestos derivados de levaduras son ampliamente utilizados por la industria alimenticia debido a que son fuente de muchos compuestos de interés nutricional y comercial como lo son las proteínas, vitaminas del complejo B, fosfolípidos, polisacáridos, extractos, autolisados, entre otros (Dziezak 1987a, b). En la actualidad, existen investigaciones relacionadas a las propiedades funcionales de las proteínas de levadura residual o de crecimiento primario. En la mayoría de estos trabajos se buscaba la obtención de aislados proteicos, descartando partes de la célula, como es la pared celular (Guzmán-Juárez 1982, Kinsella 1986, Pacheco y Sgarbieri 1998, Otero el al 2000a). En los últimos años se comenzó a valorar la pared celular por contener compuestos de importancia funcional como son los polisacáridos (glucanos y mananos) y se han propuesto muchos métodos para su aislamiento y purificación, tanto a partir de levadura entera como de muestras aisladas de pared celular. La mayoría de ellos apuntan a la obtención de glucanos por su función inmunopotenciadora, pero son escasos los estudios relacionados a las propiedades funcionales de sus proteínas constitutivas (Cameron *et al*. 1988, Barriga *et al*. 1999, Hromádová et al. 2003, Vasallo *et al*. 2006). Por otro lado, se comenzó a prestar atención a las proteínas de pared (libres o ligadas a manano-oligosacáridos); trabajos recientes informan sobre las buenas propiedades emulsificantes de mananoproteínas extraídas por esterilización de la célula entera o extracción alcalina de la pared que pueden tener potenciales aplicaciones como aditivos en alimentos (Cameron *et al*. 1988, Torabizadeh 1996, Barriga *et al*. 1999, Vasallo *et al*. 2006).

La industria de extractos de levadura de cerveza (*Saccharomyces cereviseae*) por autólisis, genera un residual líquido que contiene principalmente restos insolubles de pared celular. El secado industrial de este residual produce un subproducto en polvo, denominado "cáscara de levadura", el cual posee alrededor de 49% p/p de polisacáridos (principalmente glucanos y mananos), 35% p/p de proteínas (libres o ligadas a manano-oligosacáridos) y 6% p/p de lípidos. La pared de levadura residual, sea líquida o en polvo, es descartada o a lo sumo utilizada en alimentos balanceados por sus propiedades inmunopotenciadoras. Sin embargo, puede utilizarse como ingrediente por sus propiedades emulsionantes y estabilizantes en la formulación de mayonesas, salsas, helados, entre otros (Otero et al. 2000b, Torabizadeh et al. 1996).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la dispersibilidad en agua de los complejos proteínas-polisacáridos de una muestra de pared celular comercial ("cáscara de levadura"), en función del pH y la homogenización con distintos métodos. Las dispersiones obtenidas se caracterizaron, además por medidas de tamaño de partícula y capacidad de retención de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

Se utilizó pared celular de levadura de cerveza *Saccharomyces cereviseae* deshidratada ("cáscara de levadura", CALSA S.A.) la cual fue almacenada a temperatura ambiente y en recipiente hermético. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Métodos

Obtención de las dispersiones

Se prepararon dispersiones acuosas de pared celular al 10% p/v que fueron ajustadas a diferentes pH en el rango de 3-11; luego se homogeneizaron por tres métodos diferentes: agitación magnética durante 1 hora, homogeneizador de alta velocidad rotor/estator Ultraturrax T-25 a 20000 rpm por 2 minutos (IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) y homogeneizador a válvula de alta presión Panda 2K (GEA Niro Soavi, Parma Italia) a una presión de 1.000 y 100 bar en la primera y segunda válvula respectivamente. Luego, las dispersiones se centrifugaron a 15.300 g durante 20 minutos a 4°C

(Centrífuga Beckman Coulter Avanti J2-MC, rotor JA-14, Beckman Coulter, Fullerton, Estados Unidos), separándose el sobrenadante y la fracción insoluble para posteriores ensayos de caracterización.

Dispersibilidad de proteínas y polisacáridos

En los sobrenadantes se determinó el índice de dispersibilidad de nitrógeno, % IDN (100×N_{total} en el sobrenadante/N_{total} en la pared) empleando el método de Kjeldahl y los hidratos de carbono dispersables por la técnica de Dubois (Dubois *et al*. 1956). Por precipitación con ácido tricloroacético (TCA) 12% p/v se estimó el % N no proteico. Además se realizaron espectros de absorción UV-visible en el rango de longitudes de onda de 220 a 650 nm de los extractos (dilución 1/100 y posterior centrifugación) que permitieron estimar la proteína soluble a partir de la absorbancia a 280 nm corregida por turbidez (valores obtenidos por extrapolación entre 350 y 650 nm, espectrofotómetro UV-visible T60, PC Instruments, Reino Unido). Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio.

Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula (Malvern Mastersizer 2000E, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), expresada como % en volumen, se determinó por difracción láser (λ = 683 nm y λ= 455 nm) en las dispersiones y fracciones insolubles obtenidas a distintas condiciones de pH y homogeneización. La velocidad de agitación en la unidad de dispersión (Hydro 2000MU, Worcestershire, Reino Unido) se seleccionó a 2.000 rpm. Los parámetros ópticos seleccionados para transformar los patrones de difracción láser en las distribuciones de tamaño de partícula fueron: índices de refracción de la fase dispersa y del agua: 1,52 y 1,33, respectivamente; coeficiente de absorción: 0,1. A partir de dichas distribuciones se obtuvieron los valores de diámetro promedio de De Broukere (D_{43}).

Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua, CRA (g agua/ 100 g extracto seco) se determinó midiendo la cantidad de agua retenida en la fracción insoluble por diferencia de peso antes y después de secado (103 ± 2° C, 3 horas, hasta peso constante) (Pilosof 2000). Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se informaron como el valor promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La solubilidad de las proteínas en una dispersión acuosa depende de las condiciones del medio, del procesamiento y fundamentalmente del pH (Pilosof 2000). Dado que en este trabajo se emplearon métodos de homogeneización de alta energía, hay algunos componentes de la pared celular que se solubilizan y otros que sin ser totalmente solubles quedan en suspensión (sobrenadante turbio después de la centrifugación) por lo cual es más correcto hablar de dispersibilidad en lugar de solubilidad. En la **Figura 1**, se muestran las curvas de %IDN en función del pH para los tres métodos de homogeneización empleados. El %IDN aumentó con el incremento del pH y la potencia de la homogeneización. En las muestras tratadas por agitación magnética y con el dispositivo Ultraturrax, en medio ácido el % IDN fue similar en tanto que en medio alcalino se observó un leve incremento de este parámetro. Este resultado sugiere que en medio ácido sólo se solubilizarían compuestos nitrogenados de naturaleza no proteica, dado que el porcentaje de nitrógeno no proteico se mantuvo constante en todo el rango de pH. En medio alcalino, el incremento de % IDN se atribuiría a la solubilización de proteínas ligadas a manano-oligosacáridos (mananoproteínas). Estas proteínas presentes en la parte más externa de la pared celular, constituyen la fracción álcali-soluble (Vasallo *et al*. 2006, Wagner *et al*. 2008). Con el método de homogeneización más enérgico, se logró valores de %IDN significativamente superiores, alcanzando el 60% a pH 7,0, 9,0 y 11,0. Si se realiza un análisis comparativo entre los ensayos a pH 7,0, el pasaje de la homogeneización con el equipo Ultraturrax a la de alta presión provocó un incremento aproximado del 40% en el %IDN, atribuible a la solubilización y la presencia de pequeñas partículas en suspensión que le otorgó turbidez al sobrenadante después de la centrifugación de las dispersiones.

La dispersibilidad de hidratos de carbono en el rango de pH 3-7 fue mínima (7,2%) con agitación magnética, alcanzando un valor de 15% con la homogeneización a alta presión (**Figura 2**). En el rango alcalino de pH, los valores fueron superiores y exhibieron la misma tendencia que el % IDN en función del método de homogeneización (**Figuras 1** y **2**). A pH 7,0, el pasaje de un tratamiento con el homogeneizador Ultraturrax a uno con el de alta presión, provocó un aumento cercano al 48% en el

porcentaje de hidratos de carbono, acorde a la mayor dispersibilidad de polisacáridos de pared. Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de dispersibilidad de compuestos nitrogenados y de hidratos de carbono (**Figuras 1** y **2**) ponen en evidencia que las partículas que permanecen en suspensión en el sobrenadante después de la centrifugación de las dispersiones tratadas a alta presión, estarían formadas por proteínas y polisacáridos que forman complejos de baja solubilidad. El pequeño tamaño de estas partículas impide la sedimentación por influencia del campo gravitatorio durante el proceso de centrifugación.

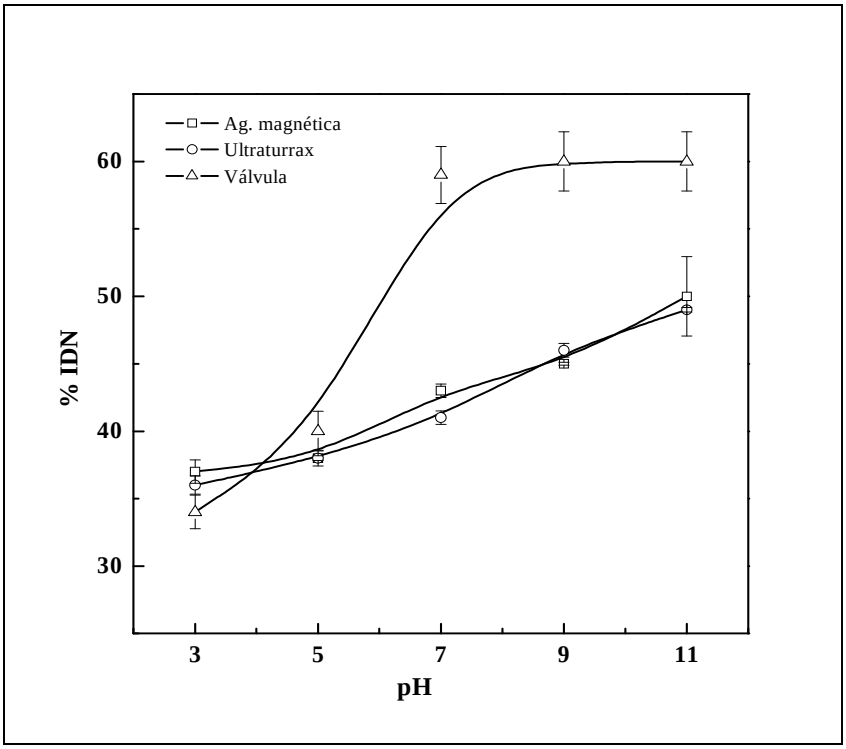


Figura 1. Índice de dispersibilidad de nitrógeno en función del pH en las diferentes fracciones acuosas de pared celular de levadura.

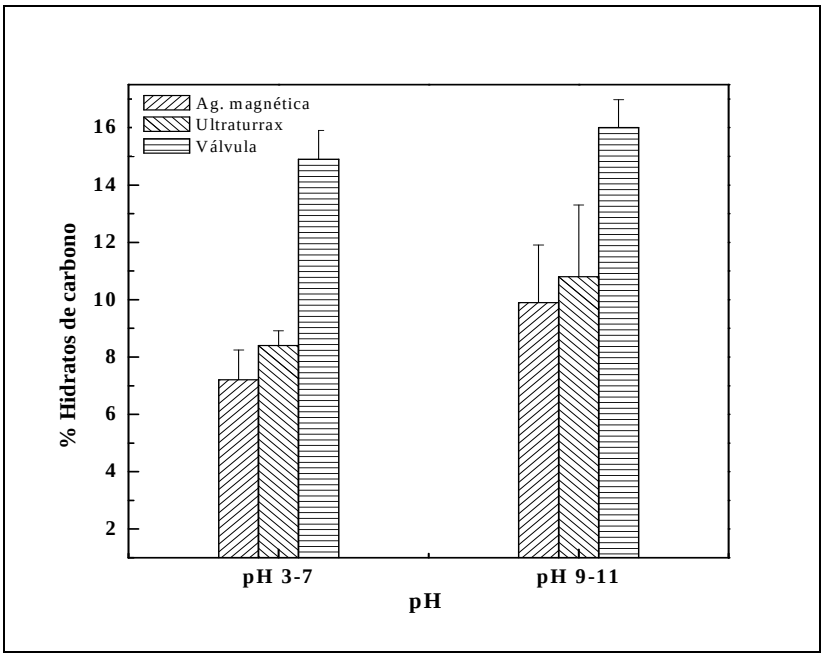


Figura 2. Porcentaje de hidratos de carbono en el sobrenadante (centrifugación a 15300g) de las dispersiones acuosas de pared celular de levadura a distintos pH.

Además, para corroborar la presencia de proteínas solubles en muestras de pared en medio alcalino se realizaron análisis comparativos de los espectros de absorción UV-visible (220-650 nm). La comparación entre las muestras tratadas con diferentes métodos de homogeneización permitió ver que el incremento en la energía de homogeneización (energía creciente en el orden, agitación magnética < homogenización a alta velocidad < homogeneización a alta presión) provocó un aumento de la turbidez del sobrenadante, resultado atribuible a la fragmentación y micronización de partículas insolubles. Como ejemplo, en la **Figura 3** se observa que para una homogeneización a válvula, la absorbancia a 500 nm (turbidez) se incrementó levemente en función del pH. Por otro lado, los valores de absorbancia a 280 nm (**Figura 4**), que dan idea del contenido de proteína soluble, exhibieron una buena correlación con los datos de % IDN (**Figura 1**) pero sólo para las muestras tratadas por homogenización magnética y con el equipo Ultraturrax.

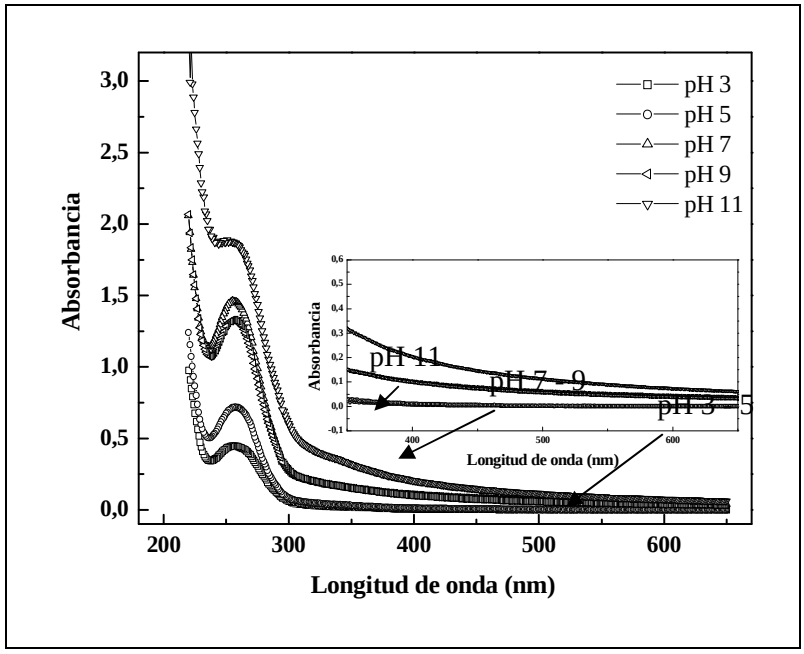


Figura 3. Espectros de absorción UV-visible en extractos de dispersiones de pared celular de levadura homogeneizadas a alta presión, a distintos pH.

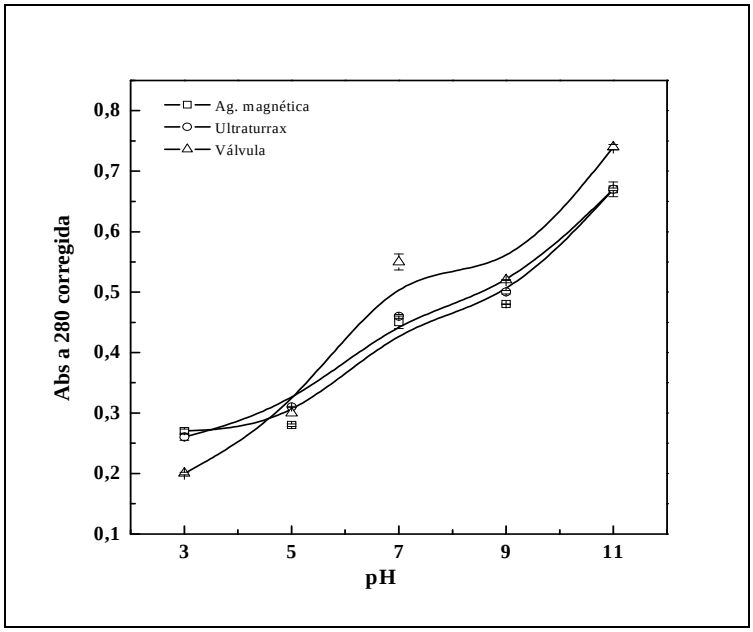


Figura 4. Absorbancia corregida (280 nm) en función del pH en las diferentes fracciones acuosas obtenidas por homogeneización con distintos métodos. Las fracciones se obtuvieron como el sobrenadante de una centrifugación a 15300g de las dispersiones iniciales (ver sección Materiales y Métodos).

Las medidas de espectroscopía UV-visible permitieron corroborar los valores de % IDN obtenidos por el método de Kjeldahl. La mayor absorbancia observada en medio alcalino está de acuerdo con el incremento del contenido de proteínas solubles, que correspondería a las mananoproteínas (Wagner et al. 2008). Además, el incremento de la turbidez en el rango visible del espectro se atribuye a la presencia de partículas de pequeño tamaño, lo cual fue especialmente evidente en el tratamiento con el homogeneizador de alta presión. Las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas por difracción láser de las dispersiones a pH constante y con diferentes métodos de homogeneización apoyan esta idea, ya que se observó claramente la disminución de tamaño de partícula con el incremento de la energía de homogeneización. Esto se muestra en la **Figura 5** para pH 7,0 y se ve que el valor de D_{43} fue significativamente inferior para la homogeneización con válvula respecto a los demás métodos: aunque la mayor parte del volumen de fase dispersa se distribuyó en partículas en el rango 2-40 μm, también se observó una población de partículas entre 0,5 y 1 μm. Estas partículas de pequeño tamaño, si bien no representan una parte importante del volumen de fase dispersa, son mayoritarias en número y serían las responsables de la apariencia turbia del sobrenadante después de la centrifugación y del incremento de % IDN y de hidratos de carbono. Si se analiza el comportamiento en función del pH, la variación de este parámetro no produjo cambios marcados en las distribuciones, las cuales mostraron partículas en el mismo rango de diámetros, pero sí diferencias en los valores de D_{43} de las partículas insolubles homogeneizadas a válvula: 7,0; 5,3; 5,8; 6,6 y 9,7 μm para pH 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 y 11,0 respectivamente.

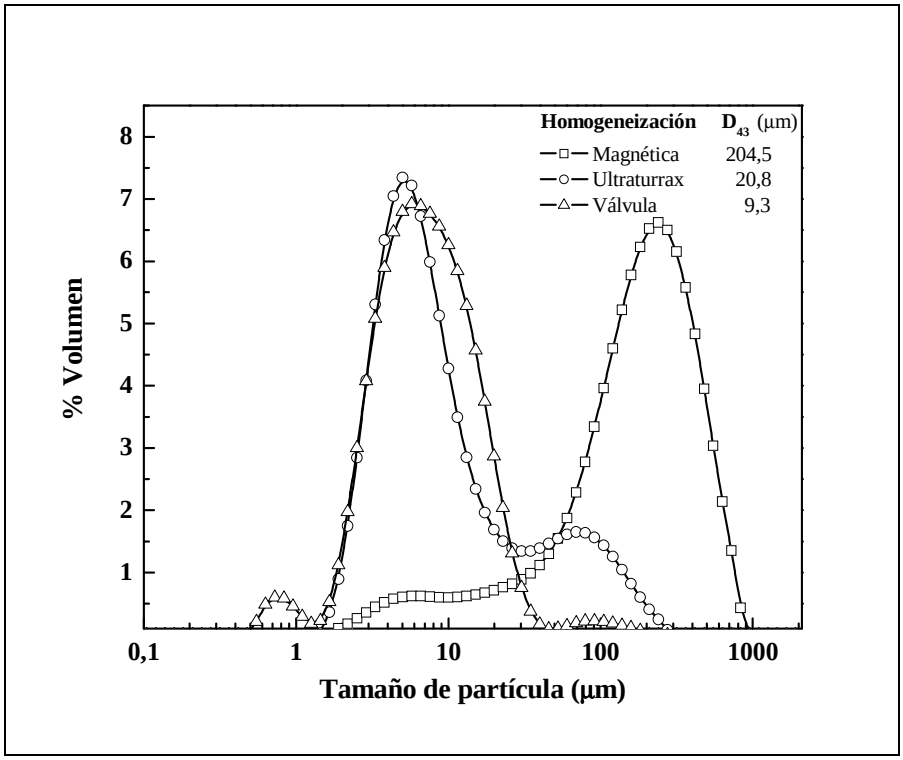


Figura 5. Distribuciones de tamaño de partícula de dispersiones homogeneizadas con diferentes métodos a pH 7,0.

En la **Figura 6** se observa el efecto del pH y de las condiciones de homogeneización de una de las propiedades ligadas a la interacción del agua con proteínas y polisacáridos insolubles de pared: la capacidad de retención de agua (CRA). La CRA en la fracción insoluble se incrementó levemente en medio alcalino lo que correlaciona con el incremento observado de D_{43} atribuible a la mayor hidratación de las partículas. El efecto de la homogeneización sobre CRA fue mucho más evidente: mientras las muestras tratadas con los métodos más suaves mostraron valores de CRA comprendidos entre 200 y 350 g agua/100 g extracto seco en todo el rango de pH, la CRA de la muestra tratada a alta presión fue en todos los casos superior a 500 g/100 g extracto seco. Dado que en el rango de pH 3-5, la composición de las partículas insolubles es equivalente entre los diferentes métodos de

homogeneización, la alta capacidad de retención de agua observada en la fracción insoluble obtenida por tratamiento a alta presión se debe exclusivamente a la reducción del tamaño de partícula (D_{43} < 10 μm, **Figura 5**).

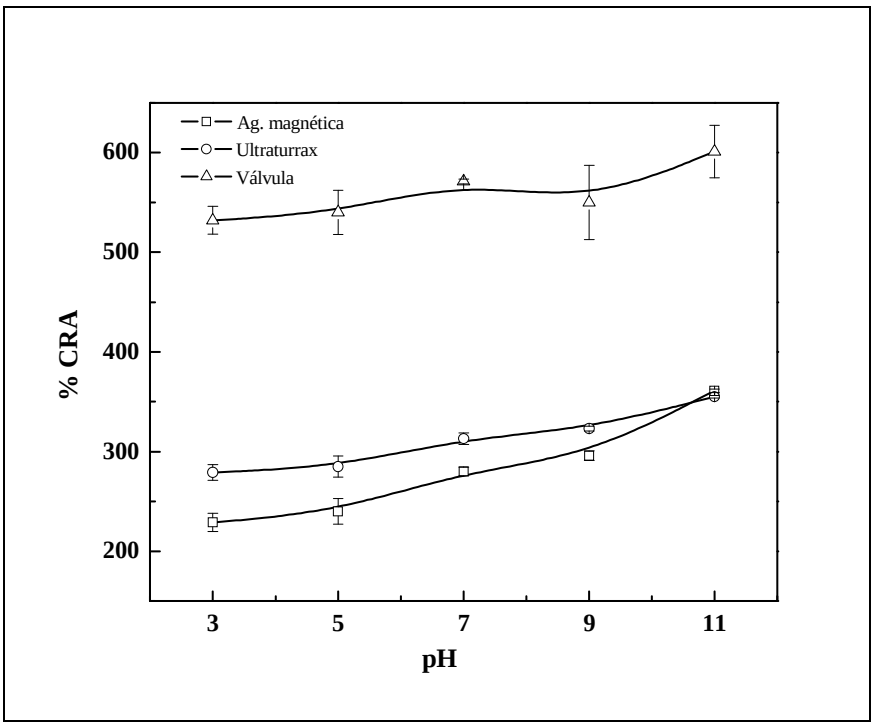


Figura 6. % CRA (g agua/ 100 g extracto seco) en función del pH para dispersiones homogeneizadas con diferentes métodos

CONCLUSIONES

El aumento de la energía de homogeneización incrementa la dispersibilidad y solubilización de proteínas. La tendencia similar observada con los resultados de hidratos de carbono indicaría que la micronización favorece la dispersibilidad de los complejos proteínas-polisacáridos de pared. A pH alcalino el incremento de la carga neta negativa provocaría una repulsión entre cadenas de complejos insolubles. Esto se ve reflejado en el aumento de tamaño promedio de partícula y en la capacidad de retención de agua en el insoluble.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la pared celular de levadura, subproducto prácticamente insoluble en agua y por ende, con muy limitadas propiedades funcionales, puede mejorar su dispersibilidad y retención de agua si es sometida a una micronización en medio alcalino.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, PICTO-UNQ 2006 34673: Ingredientes con propiedades funcionales de fuentes no convencionales para la industria alimentaria) y a la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D: Investigaciones aplicadas al desarrollo del sector alimentario) por el apoyo financiero.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cameron DR, Cooper D G, Nufeld RJ. 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1420-1425.

Barriga JAT, Cooper DG, Idziak ES, Cameron DR. 1999. Components of the bioemulsifier from S. cerevisiae. Enzyme and Microbial Ttechnology, 25: 96- 102.

Dubois M, Gilles KH, Hamilton J, Rebers F, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 349-356.

Dziezak JD. 1987a. Yeast and yeast derivatives: applications. Food Technology, 32: 122-124.

Dziezak JD. 1987b. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. Food Technology, 42: 104-121.

Fennema OR. 1996. Food Chemistry. 3th edition New York: Marcel Dekker, Inc. Nueva York. USA. pag 1067.

Guzmán-Juárez M. 1982. Yeast proteins. En: Development in Food Proteins-2. Hudson, BJF, edditor. Applied Science Publishers. London. Capítulo 7, pag 263-291.

Hromádová Z, Ebringerová A, Sasinková V, Sandula J, Hribalová V, Omelková. 2003. Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1→3)-β-D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers, 51: 9-15.

Kinsella JE. 1986. Functional properties from yeast nucleoprotein for uses. Methods for isolation. In Food Biochemistry. Knorr D editor. Marcel Dekker, New York. pag. 363-391.

Otero MA, Wagner JR, Vasallo MC, García L; Añón MC. 2000a. Thermal behavior and hydration properties of yeast protein from Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces fragilis. Food Chemistry. 69: 161-165.

Otero MA, Cabello A, Vasallo MC, García L; López J. 2000b. Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50: 361-365.

Pacheco MTB, Sgarbieri V. 1998. Hydrophilic and rheological properties of brewer's yeast protein concentrates. Journal of Food Science, 63: 238-243.

Pilosof AMR. Propiedades de hidratación. 2000. En: Pilosof AMR, Bartholomai GB, editores. Caracterización functional y estructural de proteínas. Buenos Aires: Editorial Universitaria de Buenos Aires. pag 17-29.

Torabizadeh H, Shojaosadati SA, Tehrani HA. 1996. Preparation and characterisation of bioemulsifier from Saccharomyces cerevisiae and its application in food. Lebensmittel, Wissenschaft und Tecnologie, 29: 734-737.

Vasallo MC, Puppo MC, Palazolo GG, Otero MA, Beress L, Wagner JR. 2006. Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*. Surface and emulsifying properties. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 39: 729-739.

Wagner JR, Sceni P, Otero Rambla, MA. 2008. Polisacáridos estructurales de levadura. Glucanos y mananos. En: Wagner JR, Otero Rambla MA, Guerrero Legarreta I, editores. Las levaduras y sus productos derivados como ingredientes en la industria de alimentos. Bernal: Editorial de la Universidad Nacional de Quilmes. pag 233-246.

Determinación por RP-HPLC de aminoácidos libres presentes en matrices alimenticias

Determination of free amino acids in foods by RP-HPLC

Ramo P, Rubiolo AC, Zorrilla SE y Sihufe GA

INTEC (UNL - CONICET), Santa Fe, Argentina
E-mail: gsihufe@intec.unl.edu.ar

RESUMEN

En los últimos años el análisis de aminoácidos libres se ha extendido a diversos productos alimenticios y nutricionales, ya sea porque resultan indicadores del proceso tecnológico empleado en la elaboración, o porque se trata de productos que han sido fortificados para satisfacer requerimientos nutricionales específicos, entre otras razones. En general, la metodología predominante para cuantificar aminoácidos presentes en una muestra está basada en técnicas cromatográficas, las cuales se complementan frecuentemente con el uso de un detector de fluorescencia, tal como la cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) con el uso de agentes derivatizantes. El objetivo del presente estudio fue validar una metodología para la determinación del contenido de aminoácidos libres presentes en matrices alimenticias de interés. Se analizaron muestras de queso Reggianito y Gouda (en quesos, los aminoácidos libres contribuyen al desarrollo del flavor) y muestras de cerveza (en cerveza, los aminoácidos son indicadores de calidad). En todos los casos las muestras fueron adquiridas en comercios de la zona. Se obtuvieron las curvas de calibración para los aminoácidos: valina, leucina, glicina, tirosina, fenilalanina, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, serina y treonina. Además de los parámetros de validación asociados a las curvas de calibración (precisión, linealidad, sensibilidad, rango lineal), se determinó el porcentaje de recuperación (%R) para las muestras analizadas. La metodología cromatográfica consistió en la derivatización pre-columna con o-ftalaldehído y uso de un gradiente de 2 solventes: *solvente A*, tetrahidrofurano: metanol: acetato de sodio 0.05 M pH 5.9 (1:19:80), y *solvente B*, metanol: acetato de sodio 0.05 M pH 5.9 (80:20). En queso Gouda se observó una cantidad total de aminoácidos libres de 356 $mg_{AA}/100g_{queso}$, mientras que en queso Reggianito dicha concentración fue de 1919 $mg_{AA}/100g_{queso}$, siendo los aminoácidos mayoritarios Leu, Glu, Asn y Phe en el queso Gouda y Glu, Lys, Leu y Val en el caso del queso Reggianito. La cantidad total de aminoácidos libres determinada en 3 marcas de cervezas analizadas, fue similar, encontrándose valores de aproximadamente 400 $mg_{AA}/l_{cerveza}$. Los porcentajes de recuperación obtenidos tanto en muestras de queso como de cerveza fueron satisfactorios, con valores cercanos o mayores al 70% para todos los aminoácidos analizados en queso y cercanos o mayores al 55% para los aminoácidos analizados en cerveza. La metodología propuesta se utilizó con éxito para determinar los aminoácidos libres presentes en muestras de queso y de cerveza. Dicha metodología podría ser de gran utilidad para determinar los perfiles de aminoácidos en otras matrices de alimentos.

ABSTRACT

In recent years, the analysis of the content of free amino acids was extended to various foods and nutritional products because amino acids are good indicators of the technological process used during the manufacture or because specific nutritional requirements must be satisfied in the case of fortified products. In general, the methods used for the determination of amino acids in foods are based on chromatographic techniques usually complemented with a fluorescence detector, such as reverse phase chromatography (RP-HPLC) with the use of derivatizing agents. The objective of this work was to validate a methodology to determine the content of free amino acids in foods of interest. Samples of Reggianito and Gouda cheeses (in cheeses, amino acids contribute to flavor development) and samples of beer (in beer, amino acids are indicators of quality), were analyzed. In all cases, samples were obtained in a local market. Calibration curves for the amino acids: valine, leucine, glycine, tyrosine, phenylalanine, alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glutamine, histidine, isoleucine, lysine, methionine, serine, and threonine, were obtained. Besides validation parameters

associated with calibration curves (accuracy, linearity, sensitivity, linear range), the recovery percentage (%R) was determined for the samples analyzed. Chromatographic conditions consisted of a precolumn derivatization with o-phtaldialdehyde and the use of a binary gradient: *solvent A*, tetrahydrofuran: methanol: 0.05 M sodium acetate, pH 5.9 (1:19:80), and *solvent B*, methanol: 0.05 M sodium acetate, pH 5.9 (80:20). In Gouda cheese, a total content of 356 $mg_{AA}/100g_{cheese}$ was observed, while in Reggianito cheese that content was 1919 $mg_{AA}/100g_{cheese}$, the most important amino acids being Leu, Glu, Asn, and Phe in Gouda cheese and Glu, Lys, Leu and Val in Reggianito cheese. The total content of free amino acids determined in the beer samples analyzed was similar and approximately of 400 mg_{AA}/l_{beer}. Recovery percentages obtained were satisfactory and higher than approximately 70% and 55% for all the amino acids analyzed in cheese and in beer samples, respectively. The proposed methodology was successfully used to determine amino acids in samples of cheese and beer, and it could be useful to determine amino acid profiles in different food matrixes.

PALABRAS CLAVE: *aminoácidos, RP-HPLC, alimentos.*

KEYWORDS: *amino acids, RP-HPLC, foods.*

INTRODUCCIÓN

Si bien la determinación del contenido de aminoácidos libres estuvo habitualmente vinculada a la industria de bebidas (jugos, cerveza, vinos), en los últimos años dicho análisis se ha extendido a diversos productos alimenticios y nutricionales (Kivi 2000). Dado que muchos de estos productos han sido fortificados con el agregado de aminoácidos para satisfacer requerimientos nutricionales específicos, resulta de destacada importancia establecer los niveles de fortificación en los mismos. Por otro lado, en muchos productos alimenticios especiales resulta imprescindible realizar un control de la ausencia de determinados aminoácidos, los cuales deben ser estrictamente analizados para que sus valores límites no sean excedidos.

En el caso de los quesos, la determinación del contenido de aminoácidos libres es de destacada importancia, ya que los mismos contribuyen directamente al *flavor* y también indirectamente como precursores de una serie de complejas reacciones catabólicas que producen muchos compuestos volátiles (McSweeney 2004). Por otro lado, el contenido de aminoácidos contribuye al valor alimenticio, a la estabilidad y a las características organolépticas además de ser un indicador del avance del proceso de fermentación durante la elaboración de cerveza (Sikorska *et al.* 2008). Es decir, los casos en los cuales resulta de importancia la determinación del contenido de aminoácidos libres en diferentes matrices alimenticias son muy diversos.

Para obtener el perfil de aminoácidos libres en un alimento generalmente se trabaja en dos etapas: la primera involucra la preparación de muestra, mientras que la segunda etapa consiste en el análisis propiamente dicho. En gran medida, los métodos predominantes para la determinación de aminoácidos en alimentos se basan en técnicas cromatográficas, y el aumento de las determinaciones de aminoácidos por RP-HPLC está ligado a la proliferación de agentes derivatizantes precolumna. Particularmente, la técnica de derivatización con o-ftalaldehído en presencia de un agente reductor (2-mercaptoetanol) es uno de los métodos pre-columna más utilizados. Los derivados fluorescentes son separados por RP-HPLC y la cuantificación se basa en las propiedades fluorescentes de los mismos (Fountoulakis y Lahm 1998).

El objetivo del presente estudio fue validar una metodología para la determinación del contenido de aminoácidos libres presentes en diferentes matrices alimenticias de interés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron dos variedades de queso: Gouda de La Serenísima (Mastellone San Luis SA, Villa Mercedes, San Luis) y Reggianito de Verónica (Verónica SA, Capital Federal). Ambos quesos fueron fraccionados y envasados en origen y las muestras fueron adquiridas en un comercio local. De cada muestra de queso se obtuvo una fracción soluble en agua a pH 4.6 (FS) utilizando el método propuesto por Kuchroo y Fox (1982). El ácido sulfosalicílico (SSA) es un precipitante proteico que ha sido muy utilizado (Kivi 2000). A 10 ml de FS se agregaron 2 ml de SSA al 15% y se centrifugó a 4800 rpm durante 30 min a 20 ºC. El sobrenadante, cuyo pH fue ajustado a un

valor cercano a 4 con NaOH 1 N, constituyó la fracción soluble en ácido sulfosalicílico (FS-SSA). Dicha fracción se almacenó a -22 ºC para su posterior análisis.
Por otro lado, las marcas de las cervezas analizadas fueron: Budweiser (CICSA, Santa Fe, Argentina), Heineken (CICSA, Santa Fe, Argentina) y Quilmes (QUINSA, Buenos Aires, Argentina). Las mismas fueron adquiridas en comercios de la zona. A 10 ml de cerveza desgasificada se le agregaron 2 ml de SSA al 15%. Se centrifugó a 4800 rpm durante 30 min a 20 ºC utilizando una centrífuga Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania). El sobrenadante se llevó a pH 3-4 con NaOH 1 N y se conservó a -22 ºC hasta su análisis.
La preparación de los reactivos que intervienen en la reacción de derivatización de los aminoácidos se realizó según Jones y col. (1981). Los pasos que se siguieron para realizar la reacción de derivatización de los aminoácidos fueron: a 200 µl del estándar o de la muestra se agregaron 200 µl de solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% en buffer de borato de sodio 0.4 M (pH 9.5) y 200 µl de la solución del reactivo derivatizante (OPA), se mezcló y se dejó reaccionar por 1 min. Luego se adicionaron 400 µl de la solución de buffer fosfato de sodio 0.1 M (pH 4) para interrumpir la reacción. Inmediatamente después, se filtró por membrana de 0.2 µm Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, USA) y se inyectó en el equipo cromatográfico.
La separación cromatográfica de los aminoácidos se llevó a cabo utilizando un gradiente binario y una columna de C_{18} VARIAN (Varian, Inc., Palo Alto, USA) de 4.6 mm x 250 mm, con 5 µm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro. Los estándares, las muestras y las fases móviles (desgasificadas por vacío) se filtraron a través de una membrana de nylon de 0.2 µm Alltech (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, USA) antes de ser utilizados. Como punto de partida para el presente estudio se tomaron las condiciones de trabajo originales propuestas por Jones *et al.* (1981).
Para la cuantificación de los aminoácidos se utilizaron curvas de calibración preparadas con los siguientes estándares: valina (Val), leucina (Leu), glicina (Gly), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), glutamina (Gln), histidina (His), isoleucina (Ile), lisina (Lys), metionina (Met), serina (Ser), triptofano (Trp) y treonina (Thr). Además de los parámetros de validación asociados a las curvas de calibración (precisión, linealidad, sensibilidad, rango lineal), se determinó el porcentaje de recuperación (%R) para las muestras analizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al operar el cromatógrafo en las condiciones de trabajo propuestas por Jones *et al.* (1981) surgieron inconvenientes relacionados con un aumento de la presión de operación y la falta de resolución de algunos picos. Así, se observaron valores de presión cercanos al valor crítico de la columna utilizada (4500 psi) y falta de resolución de los aminoácidos Trp y Met.
Para disminuir la presión del sistema se modificaron la temperatura de la columna y el caudal. Una temperatura de operación más alta resulta en una disminución de la presión, debido a una disminución de la viscosidad de la fase móvil (Snyder *et al.* 1997). Similarmente, una disminución del caudal disminuye la presión de operación. Luego de evaluar diferentes alternativas, se seleccionó una temperatura de la columna de 40 ºC y un caudal de 1.30 ml/min, con lo cual se obtuvieron presiones de operación menores y leves mejoras en la resolución.
Para evitar la coelución de Trp y Met se modificaron las condiciones del gradiente, ya que esta variable de operación influye notablemente sobre la separación de los compuestos (Snyder *et al.* 1997). Luego de evaluar diferentes alternativas se seleccionaron las condiciones del gradiente que se muestran en la **Tabla 1**.
En la **Tabla 2**, se muestran los parámetros relacionados con la validación de la metodología propuesta obtenidos a partir del análisis de las curvas de calibración de los estándares de aminoácidos: límite de detección (LD), límite de cuantificación (LQ), sensibilidad analítica (γ), rango lineal de calibración, coeficiente de variación (CV%) y coeficiente de correlación (r), para cada uno de los aminoácidos estudiados.

Tabla 1. Condiciones de trabajo para el análisis cromatográfico de los aminoácidos libres.

Solvente A	tetrahidrofurano : metanol : acetato de sodio 0.05 M pH 5.9 (1 : 19 : 80)		
Solvente B	metanol : acetato de sodio 0.05 M pH 5.9 (80 : 20)		
Gradiente	Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
	1	100	0
	5	86	14
	5	86	14
	5	50	50
	4	50	50
	6	25	75
	4	25	75
	6	0	100
	4	0	100
Caudal	1.3 ml/min		
Volumen de inyección	10 µl		
Temperatura de la columna	40 ºC		
Longitud de onda del detector	$\lambda_{excitación}$ = 305-395 nm; $\lambda_{emisión}$ = 430-470 nm		
Sensibilidad del detector	0.02 unidades de absorbancia (AUF) Constante de tiempo = 0.5 s		

Tabla 2. Parámetros de validación de la técnica propuesta*.

AA	**LD**	**LQ**	**γ**	**Rango lineal**			**CV%**	**r**
	(10^{-3} g/l)	**(10^{-3} g/l)**	**(10^{3} g/l)**	**(10^{-3} g/l)**				
Asp	1.08	3.28	1.23	3.28	-	31.54	11.53	0.9978
Glu	2.47	7.49	0.44	7.49	-	124.47	8.23	0.9989
Asn	1.53	4.64	2.28	4.64	-	44.54	7.32	0.9997
Ser	0.25	0.75	6.50	0.75	-	23.42	12.73	0.9999
His	6.55	19.84	0.20	19.84	-	144.46	20.50	0.9960
Gln	0.64	1.93	0.67	1.93	-	51.63	2.09	0.9972
Gly	1.07	3.25	1.46	3.25	-	27.35	15.05	0.9979
Ala	0.89	2.71	1.99	2.71	-	41.49	9.25	0.9995
Tyr	0.53	1.61	1.48	1.61	-	49.04	9.55	0.9994
Trp	1.54	4.67	0.70	4.67	-	69.46	11.63	0.9986
Met	0.52	1.58	1.49	1.58	-	42.31	8.02	0.9992
Val	0.44	1.32	2.32	1.32	-	31.54	7.71	0.9994
Phe	0.69	2.09	1.35	2.09	-	39.19	11.58	0.9988
Ile	0.17	0.52	3.77	0.52	-	23.92	8.17	0.9996
Leu	0.23	0.70	1.99	0.70	-	33.38	10.29	0.9992
Lys	2.94	8.90	0.44	8.90	-	106.01	16.05	0.9985

* LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación; γ: sensibilidad analítica; CV%: coeficiente de variación máximo observado para las distintas diluciones analizadas; r: coeficiente de correlación.

Aminoácidos libres en muestras de queso

En la **Figura 1**, se observa un cromatograma característico obtenido para las muestras de queso. Los resultados del análisis por duplicado de cada muestra de queso Reggianito y Gouda se muestran en la **Tabla 3**. Los aminoácidos mayoritarios determinados en queso Reggianito fueron Glu, Lys, Leu y Val, constituyendo este grupo más del 50% del total de aminoácidos libres presentes en la muestra. Estos resultados son comparables con los observados por Sihufe *et al.* (2007) para este tipo de queso, quienes informaron que Glu, His, Val, Leu y Lys fueron los aminoácidos presentes en mayor concentración. En el caso del queso Gouda, los aminoácidos presentes en mayor proporción fueron

Leu, Glu, Asn y Phe, constituyendo en forma conjunta un porcentaje mayor al 55% del total de los aminoácidos libres cuantificados.

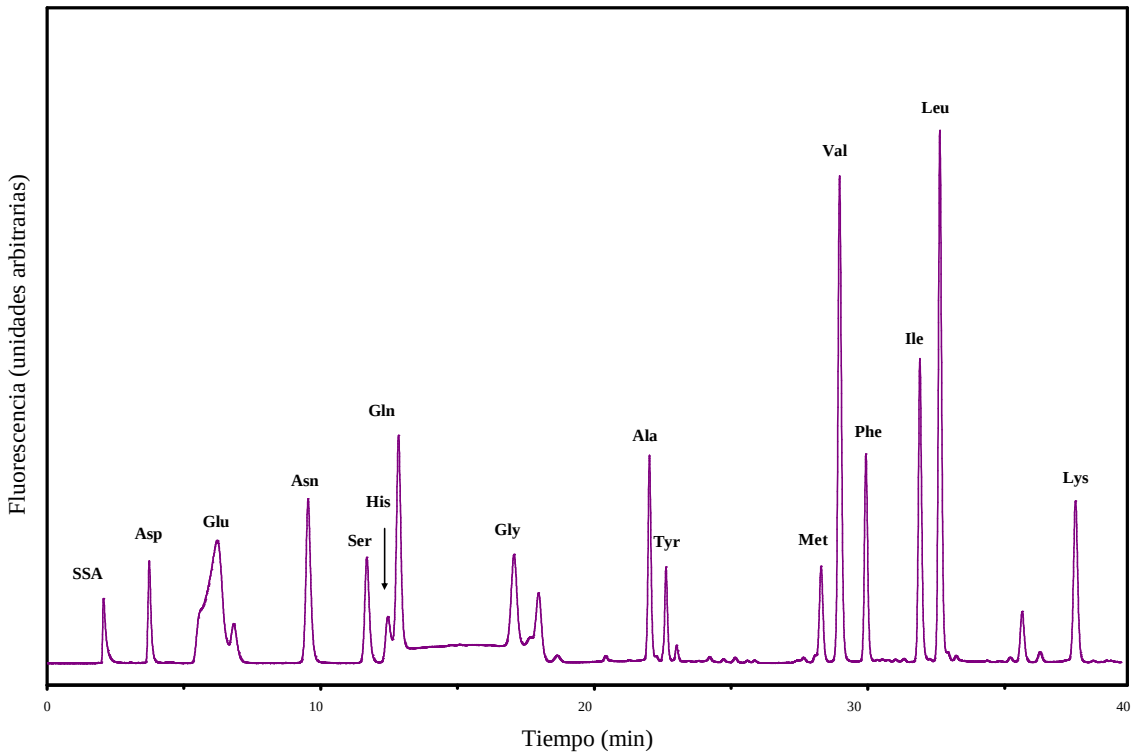


Figura 1. Cromatograma característico para las muestras de queso analizadas.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos libres determinados en las muestras analizadas.

AA	Muestras de queso ($mg_{AA}/100g_{queso}$)		Muestras de cerveza ($mg_{AA}/L_{cerveza}$)		
	Reggianito	**Gouda**	**Budweiser**	**Heineken**	**Quilmes**
Asp	45.8 ± 1.6	3.3 ± 0.2	32.2 ± 2.6	6.6 ± 0.4	7.9 ± 0.4
Glu	340.3 ± 13.9	55.7 ± 3.5	44.6 ± 2.7	22.2 ± 0.8	21.9 ± 1.0
Asn	112.6 ± 9.9	42.4 ± 2.0	37.3 ± 2.3	4.3 ± 0.1	3.8 ± 0.2
Ser	56.1 ± 5.1	8.4 ± 0.9	10.1 ± 0.3	5.3 ± 2.3	2.9 ± 0.9
His	136.4 ± 7.8	ND	27.4 ± 1.1	38.8 ± 1.8	31.2 ± 1.7
Gln	126.7 ± 4.3	23.1 ± 1.1	14.1 ± 0.7	9.3 ± 0.3	5.9 ± 0.1
Gly	53.8 ± 2.6	9.1 ± 0.4	24.7 ± 1.5	28.7 ± 1.8	23.3 ± 2.8
Ala	69.9 ± 2.1	9.1 ± 0.7	63.0 ± 0.7	65.3 ± 0.9	58.2 ± 2.1
Tyr	55.2 ± 3.0	22.4 ± 1.4	47.1 ± 2.6	59.3 ± 3.6	38.7 ± 2.3
Trp	ND	ND	18.7 ± 0.6	32.7 ± 2.2	24.8 ± 1.3
Met	52.0 ± 3.0	7.8 ± 0.4	5.1 ± 0.2	6.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1
Val	151.7 ± 5.9	23.9 ± 1.4	41.5 ± 2.3	57.5 ± 2.3	38.3 ± 2.0
Phe	132.9 ± 7.5	40.9 ± 2.2	40.1 ± 2.1	56.1 ± 3.4	34.1 ± 2.3
Ile	90.2 ± 2.8	9.6 ± 0.7	12.4 ± 0.6	16.8 ± 1.1	9.9 ± 0.6
Leu	221.3 ± 12.0	65.7 ± 3.5	24.5 ± 1.2	27.7 ± 1.8	16.9 ± 1.2
Lys	273.9 ± 13.6	35.0 ± 2.8	19.4 ± 0.6	16.1 ± 0.4	11.3 ± 0.1

ND: no detectado

Dado que el queso Reggianito posee un período de almacenamiento más extenso que el del queso Gouda, el grado de proteólisis alcanzado en queso Reggianito suele ser también superior. Esto se ve reflejado en el presente estudio en la comparación de aminoácidos libres determinados para cada tipo de queso, ya que se observó en queso Gouda una cantidad total de aminoácidos libres de 356 $mg_{AA}/100g_{queso}$, mientras que en queso Reggianito dicha concentración fue de 1919 $mg_{AA}/100g_{queso}$.

Aminoácidos libres en muestras de cerveza

En la **Figura 2**, se observa el cromatograma característico correspondiente a una de las muestras de cerveza analizadas. En la **Tabla 3**, se observan los valores promedios y desviaciones estándar para las 3 marcas de cerveza estudiadas. En promedio, la cerveza contiene entre 0.2 y 0.6 g de material proteico / 100 ml. La mayor parte del material proteico presente proviene de la cebada y está en forma de péptidos y polipéptidos, los cuales son fácilmente digeridos por las levaduras durante la fermentación. De todas maneras, la cantidad de proteínas, aminoácidos y zinc presentes en una cerveza suele estar íntimamente relacionado con los procesos tecnológicos empleados durante la preparación (Gorinstein *et al.* 1999).

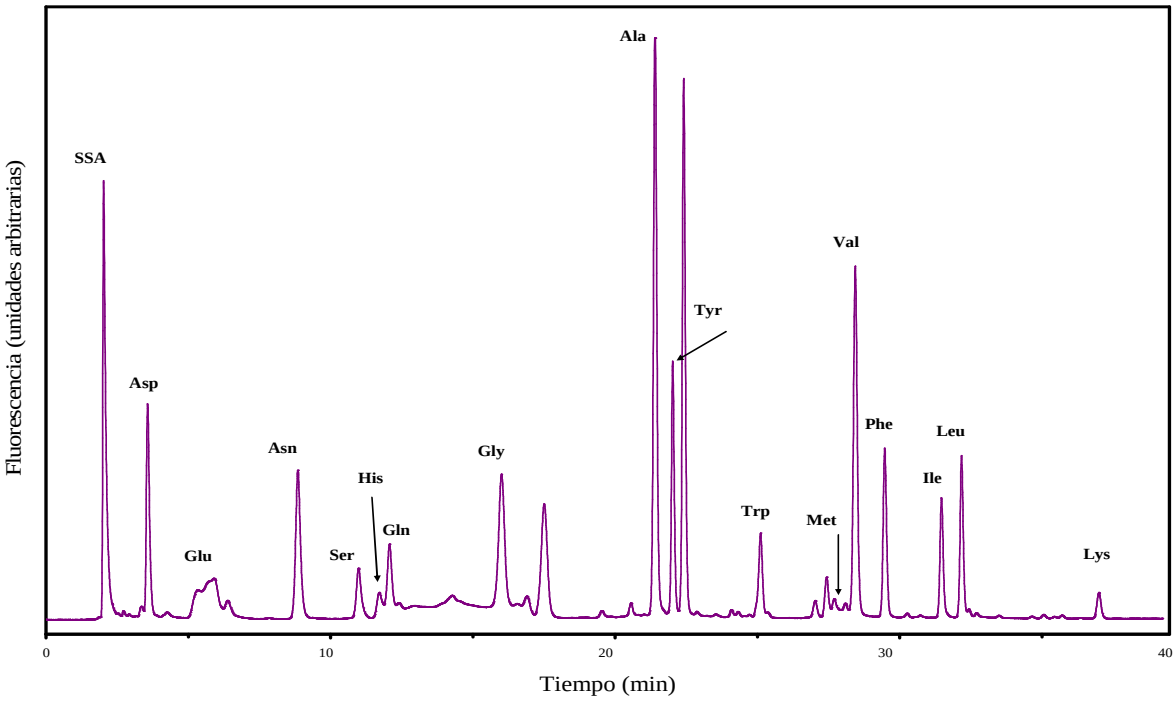


Figura 2. Cromatograma característico para las muestras de cerveza analizadas.

En el presente estudio, los aminoácidos mayoritarios determinados en cerveza Budweiser fueron Ala, Tyr, Glu, Val y Phe, constituyendo este grupo más del 50% del total de aminoácidos libres presentes en la muestra. En el caso de las cervezas Heineken y Quilmes, los aminoácidos presentes en mayor proporción fueron Ala, Tyr, Val, Phe e His, constituyendo en forma conjunta un porcentaje mayor al 60% del total de los aminoácidos libres cuantificados. En general, se puede afirmar que los aminoácidos mayoritarios encontrados en las tres marcas de cerveza fueron prácticamente los mismos, excepto que en la cerveza Budweiser aparece el ácido glutámico y en las cervezas Heineken y Quilmes está histidina entre los más importantes.

En lo que refiere a la cantidad total de aminoácidos libres determinados en las muestras analizadas, las mismas fueron similares para las cervezas Budweiser y Heineken (462 mg/l y 453 mg/l, respectivamente), mientras que en el caso de la cerveza Quilmes dicha cantidad fue menor (332 mg/l).

Porcentaje de recuperación

Para evaluar el porcentaje de recuperación de aminoácidos libres a través de la metodología empleada se usaron tres muestras de una misma matriz, de las cuales una de ellas se dejó como blanco de muestra, a otra se le agregó una cantidad conocida de cada uno de los aminoácidos y a la restante se le agregó una cantidad que se encontraba cercana al doble de la anterior. En la **Tabla 4**, se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para el caso de muestras de queso Reggianito y cerveza Budweiser, respectivamente.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para todos los aminoácidos analizados fueron satisfactorios, observándose valores superiores al 67.8% para el queso Reggianito y mayores al 54.2% para la cerveza Budweiser. Estos valores de %R están de acuerdo con los informados en la bibliografía cuando se usa SSA como agente desproteinizante (Kivi 2000).

Tabla 4. Porcentajes de recuperación (%R) de los aminoácidos libres determinados en las muestras analizadas.

AA	Muestras de queso	Muestras de cerveza
Asp	76.8 ± 6.8	67.7 ± 5.1
Glu	71.7 ± 4.5	79.6 ± 8.4
Asn	70.9 ± 2.7	74.2 ± 6.0
Ser	67.8 ± 7.1	81.4 ± 9.4
His	80.4 ± 10.9	81.7 ± 13.2
Gln	76.0 ± 4.2	104.0 ± 13.5
Gly	82.7 ± 3.6	69.8 ± 7.4
Ala	76.7 ± 6.5	54.2 ± 12.6
Tyr	76.1 ± 9.1	58.4 ± 7.6
Trp	112.2 ± 15.6	78.8 ± 6.4
Met	80.1 ± 5.2	151.8 ± 17.0
Val	73.1 ± 4.2	74.0 ± 2.9
Phe	68.8 ± 8.5	63.6 ± 4.7
Ile	68.7 ± 3.8	82.5 ± 5.7
Leu	68.6 ± 8.4	73.7 ± 5.6
Lys	71.8 ± 10	105.7 ± 7.7

CONCLUSIONES

En el presente estudio se usó satisfactoriamente la técnica de RP-HPLC para la determinación de aminoácidos libres en matrices alimenticias. Se realizaron cambios a la metodología propuesta por Jones *et al.* (1981) para solucionar algunos inconvenientes, lo cual permitió establecer las condiciones para la cuantificación de los aminoácidos libres presentes en una muestra mediante RP-HPLC.

La metodología propuesta fue utilizada con éxito para determinar los aminoácidos libres en muestras pertenecientes a 2 variedades de quesos argentinos y a 3 marcas comerciales de cerveza. En queso Gouda se observó una cantidad total de aminoácidos libres de 356 $mg_{AA}/100g_{queso}$, mientras que en queso Reggianito dicha concentración fue de 1919 $mg_{AA}/100g_{queso}$. En las tres marcas de cerveza, los aminoácidos mayoritarios fueron prácticamente los mismos, a excepción del ácido glutámico que sólo fue importante en la cerveza Budweiser y de la histidina que sólo fue importante en las cervezas Heineken y Quilmes. Se determinaron los porcentajes de recuperación tanto en muestras de queso como de cerveza, siendo los resultados obtenidos satisfactorios, ya que se observaron valores cercanos o mayores al 70% para todos los aminoácidos analizados en queso y cercanos o mayores al 55% para los aminoácidos cuantificados en cerveza.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado parcialmente por la Universidad Nacional del Litoral, por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, de la República Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fountoulakis M, Lahm HW. 1998. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A, 826: 109-134.

Gorinstein S, Zemser M, Vargas Albores F, Ochoa JL, Paredes Lopez O, Scheler C, Salnikow J, Martin Belloso O, Trakhtenberg S. 1999. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. Food Chemistry, 67: 71-78.

Jones BN, Pääbo S, Stein S. 1981. Amino acid analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved o-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure. Journal of Liquid Chromatography, 4 (4): 565-586.

Kivi JT. 2000. Amino Acids. En: Food Analysis by HPLC. Nollet LM, editor. 2ª ed. New York: Marcel Dekker, Inc. pag 55-97.

Kuchroo CN, Fox PF. 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. Milchwissenschaft, 37 (6): 331-335.

McSweeney PLH. 2004. Biochemistry of cheese ripening: Introduction and overview. En Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volumen 1: General aspects. Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. 3ª ed. Oxford, Elsevier Ltd. pag 347-361.

Sihufe GA, Zorrilla SE, Rubiolo AC. 2007. Perfiles de aminoácidos libres en queso Reggianito Argentino madurado a 12 y 18 °C. XI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL), Septiembre de 2007, Buenos Aires, Argentina.

Sikorska E, Gliszcyńska Świglo A, Insińska Rak M, Khmelinskii I, de Keudeleire D, Sikorski M. 2008. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. Analytica Chimica Acta, 613 (2): 207-217.

Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL. 1997. Practical HPLC method development. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. pag 765.

Aplicación del Análisis Cromatográfico y Quimiométrico para Predecir Adulteraciones en Grasa Láctea.

Application of Chromatographic and Quimimetric Analysis for the Predict Adulterations in Milk Fat.

Rebechi, S R, Perotti, M C, Bernal, S M y Zalazar, C A

Instituto de Lactología Industrial (UNL/CONICET)
Facultad de Ingeniería Química – 1º de Mayo 3250
S3000AOM Santa Fe (Argentina) – E-mail: srebechi@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

La grasa láctea es un componente valioso de la leche y es por ello que ha sido objeto de fraudes tales como la adulteración con grasas extrañas. Los índices fisicoquímicos comúnmente utilizados para ponerla en evidencia, no son útiles para detectar bajos niveles de adulteración. El análisis de la composición de los ácidos grasos presentes en la grasa de leche puede usarse como una estrategia más eficaz para lograr este objetivo.

Debido a ello en este trabajo se planteó el análisis del perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases, el cálculo de relaciones de concentración de dos o más ácidos y la aplicación de herramientas estadísticas multivariadas para procesar la información cromatográfica de una manera más eficiente.

Para ello se caracterizaron muestras de grasas lácteas genuinas, determinando los rangos de concentración de sus ácidos grasos constituyentes, y materias grasas no lácteas de origen animal (grasa vacuna y porcina) y vegetal (aceite de soja, girasol y coco) usadas como adulterantes.

Se simularon muestras adulteradas de las grasas lácteas con distintos niveles de las grasas adulterantes (2, 5, 10 y 15%), estableciendo la concentración de cada ácido graso en las mezclas mediante balance de masa.

Para estas muestras adulteradas se calcularon relaciones de ácidos grasos y se compararon con las obtenidas para las grasas lácteas genuinas. Para el caso del agregado de grasas de origen vegetal se encontraron 3 relaciones que resultaron útiles, ya que detectaron un bajo porcentaje de adulteración (2%) en el 100% de las mezclas. Estas relaciones fueron $C_{14:0}/C_{18:2}$ y $C_{18:2}/C_{8:0}$ para aceite de soja y de girasol, y $C_{12:0}/C_{10:0}$ para grasa (o aceite) de coco. Para el caso de las muestras adulteradas con grasas de origen animal no se encontraron relaciones que sirvan para detectar bajos niveles de adulteración.

En vista de los resultados obtenidos y con el propósito de mejorar el poder predictivo en especial para las grasas animales, se diseñaron modelos matemáticos utilizando Regresión Lineal Múltiple (RLM). Para ello se armaron matrices de calibración y de predicción para cada adulterante, en las que se combinaron los datos cromatográficos de las grasas lácteas genuinas (0% de adulteración) con los de las mezclas en los distintos niveles de adulteración. Las ecuaciones obtenidas en la calibración tuvieron buenos coeficientes de determinación. Los límites de detección para los adulterantes de origen vegetal fueron mejores que para los de origen animal: menores al 2% para girasol, soja y coco, 6% para grasa porcina y 10% para grasa vacuna. Si bien la presencia de grasas animales en grasa láctea presentó mayor dificultad debido a la similitud de los perfiles de ácidos grasos, se logró mejorar la detección al aplicar técnicas estadísticas multivariadas en comparación con el análisis de relaciones.

ABSTRACT

The milk fat is a valuable component of the milk and for this reason it is vulnerable to fraudulent practices such as adulteration with foreign fat. The classical physicochemical parameters are often used for authentification, but are not useful to detect low levels of adulteration.

The fatty acid analysis of milk fat can be proposed as a strategy more efficient in order to acquire this subject.

Therefore in this work, was proposed the fatty acid analysis by gas chromatography, the calculation of concentration ratios of two or more fatty acids and the application of multivariate methods.

For that purpose, the concentration ranges of the fatty acids of genuine milk fat samples were determined. Also, non milk fat of animal (bovine and porcine fats) and vegetable origin (sunflower, soybean and coconut oils) used as adulterants were analyzed.
Mixtures of milk fats and non milk fats were simulated mathematically in different levels (2, 5, 10 and 15%), setting the concentration of each fatty acid in the mixtures by mass balance.
The fatty acid ratios were calculated for this adulterated milk fat and were compared with the respective values of the genuine milk fat. Three ratios were effective in detecting all adulterated samples with 2% of vegetable fats. This ratios were $C_{14:0}/C_{18:2}$ and $C_{18:2}/C_{8:0}$ for soybean and sunflower oils, and $C_{12:0}/C_{10:0}$ for coconut oils. This approach failed to detect low levels of adulteration when animal fats were used.
Therefore, to improve the detection of animal fats, mathematical models were obtained using multiple linear regression. For that, matrixes of calibration and prediction were built for each adulterant. They consisted in a combination of chromatographic data of genuine milk fat (0% adulteration) and different levels of adulterated milk fat.
Good correlation coefficients were obtained in all calibration models. The detection limits of vegetable adulterant models were better than those obtained for animal origin: lower than 2% for sunflower, soybean and coconut, 6% for porcine fat and 10% for bovine fat.
Although it was difficult to detect animal fat in milk fat, multivariate methods improved the detection in contrast to fatty acid ratios.

PALABRAS CLAVE: *adulteración en grasa láctea-ácidos grasos-relaciones de ácidos grasos-regresión multivariada.*

KEYWORDS: *adulteration in milk fat-fatty acids-fatty acid ratios-multivariate regression.*

INTRODUCCIÓN

Para detectar adulteraciones realizadas en la grasa láctea se han estudiado diferentes estrategias analíticas tales como los índices clásicos definidos en función de los ácidos grasos de bajo peso molecular (Reichert – Meissl, Polenske, saponificación, refracción, (Código Alimentario Argentino 2008)), el análisis de la fracción insaponificable, el análisis de los triglicéridos o el de los ácidos grasos constituyentes por cromatografía de gases y otros. La combinación de estas últimas técnicas con la evaluación estadística multivariada de los resultados se ha empleado con este propósito como una herramienta útil y muy sensible.
Los productos lácteos según la reglamentación nacional vigente (CAA), deben ser elaborados con grasa de leche exclusivamente, por lo tanto el agregado de grasas de origen no lácteo constituye una adulteración del producto que la contenga. La detección de este fraude presenta dificultades para poder detectar bajos porcentajes de adulteración debido a la variabilidad que presenta la composición de ácidos grasos de la grasa láctea y al empleo de grasas de características similares a la grasa láctea (Timms 1980, Toppino *et al*. 1982, Duthie *et al*. 1988, Fox *et al*. 1988, Lercker *et al*. 1992, Mariani *et al*. 1994, Ulberth 1994 y 1995, Pinto *et al*. 1996 y 2002, Molkentin y Precht 2000, EU 2001).
Con el propósito de lograr una metodología que permita detectar adulteraciones en productos lácteos, se trabajó en su puesta a punto con muestras genuinas de grasas lácteas y con grasas de origen no lácteo que se utilizaron para simular adulterantes, y se determinó por cromatografía gaseosa el perfil de ácidos grasos de las grasas lácteas y de las grasas no lácteas.
Para estudiar la adulteración se empleó el análisis de ácidos grasos al que se le aplicó una técnica de regresión multivariada, la Regresión Lineal Múltiple y también se obtuvieron distintas relaciones de dichos ácidos grasos que son utilizadas con esta finalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras empleadas y procesamiento

Se analizaron 62 grasas lácteas genuinas, de las cuales 16 fueron leches fluidas procedentes de tambos controlados, 44 muestras de mantecas comerciales y 2 muestras de cremas de leche comerciales provenientes de industrias lácteas reconocidas. Las mismas se obtuvieron durante 3 años y pertenecen a la cuenca lechera central de la República Argentina. También se analizaron grasas no lácteas de

origen animal y vegetal de primera línea que se utilizaron como adulterantes y que fueron obtenidas del comercio. Las grasas de origen animal empleadas en este trabajo fueron grasas vacunas (10 muestras) y grasas porcinas (7 muestras), las mismas son muy económicas y de alta producción en nuestro país. Las materias grasas de origen vegetal que se seleccionaron fueron: dos aceites vegetales de gran producción en nuestro país y bajo costo como el de girasol (5 muestras) y el de soja (2 muestras) y grasa de coco (2 muestras) que si bien es de baja producción y consumo en nuestro país, presenta cantidades apreciables de ácidos grasos de cadena corta y media en comparación con las otras grasas no lácteas analizadas.

Para extraer la materia grasa de la leche se procedió según Murphy *et al*. 1990. La metodología consistió en una centrifugación (200*g*) seguida de una refrigeración, procedimiento que permitió separar la grasa emulsionada en agua y solidificada en la fase sobrenadante. Esta emulsión se batió enérgicamente para desestabilizar la emulsión y liberar la grasa que queda en otro estado de estado de emulsión, de agua en grasa. El proceso de batido se utilizó también para las cremas de leche. Las emulsiones de agua en grasa obtenidas de las leches y las cremas se procesaron de igual manera que las mantecas, según norma ISO 14156. Se fundieron a una temperatura entre 50 - 60°C y se filtraron en presencia de $NaSO_4$ anhidro luego de 2 horas de reposo a la misma temperatura.

Las grasas de origen animal y la grasa de coco se fundieron entre 50 - 60°C, se dejaron en reposo y luego de 2 horas se filtraron a la misma temperatura. Los aceites se sometieron solamente a filtración a la misma temperatura. Todas las muestras se conservaron a –18°C hasta el momento del análisis.

Análisis del perfil de ácidos grasos

Para determinar el perfil de ácidos grasos las muestras de grasas se sometieron al método de transesterificación en medio ácido donde los triglicéridos reaccionan en caliente con un alcohol en presencia de un ácido fuerte como catalizador, produciéndose el intercambio del glicerol por dicho alcohol. Para ello se utilizó ácido sulfúrico en etanol absoluto, se adicionó sulfato de sodio anhidro en el medio de reacción de manera de trabajar en condiciones anhidras para favorecer la reacción (Christie 1982). Los ésteres etílicos obtenidos se analizaron por cromatografía de gases (CG) y se cuantificaron con el método del estándar interno usándose para ello los ácidos enántico ($C_{7:0}$) y margárico ($C_{17:0}$) (Rebechi *et al*. 2003). Se determinaron los 15 ácidos grasos que se encuentran en cantidades mayores a 1%, $C_{4:0}$, $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{14:1,}$ $C_{15:0,}$ $C_{16:0}$, $C_{16:1,}$ $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2,}$ $C_{18:2\ conj.}$ y $C_{18:3}$, y también se analizó el $C_{10:1,}$ que está en menor proporción pero es característico de la grasa láctea (MacGibbon y Taylor 2006), resultando un total de 16 ácidos grasos analizados.

El procedimiento de transesterificación que fue desarrollado para este trabajo fue el siguiente: se realizó una dilución de la grasa en n-hexano (150 mg en 10 ml). Se colocó en un tubo con tapa a rosca de 40 ml de capacidad conteniendo aproximadamente 1g de Na_2SO_4 anhidro, 1 mL de la solución de grasa en n-hexano, se adicionaron 3,2 ml del reactivo de transesterificación (EtOH – H_2SO_4 10%), 0,8 mL de una solución de concentración conocida de $C_{7:0}$ (aprox. 0,5 mg / mL de EtOH) y 4 mL de una solución de concentración conocida de $C_{17:0}$ (aprox. 0,5 mg / mL de EtOH). Los tubos se mantuvieron a 70 ± 2ºC durante 3 horas (Rebechi *et al*. 2003). Luego se dejó enfriar la solución, se adicionó 6 ml de agua destilada y se dejó en reposo en condiciones refrigeradas para lograr la separación de fases. La fase superior de hexano con los ésteres etílicos disueltos se trasvasó a otro tubo de vidrio con tapa a rosca conteniendo Na_2SO_4 para eliminar posibles vestigios de agua que pudieran estar presentes, y se inyectó (0,6-0,8 µl) por triplicado en el cromatógrafo de gases. Los ácidos grasos de bajo peso molecular ($C_{4:0,}$ $C_{6:0}$, $C_{8:0,}$ $C_{10:0}$, $C_{10:1}$ y $C_{12:0}$) se cuantificaron con el $C_{7:0}$ y los de alto peso molecular ($C_{14:0}$, $C_{14:1,}$ $C_{15:0,}$ $C_{16:0}$, $C_{16:1,}$$C_{18:0}$, $C_{18:1,}$ $C_{18:2,}$ $C_{18:3}$ y $C_{18:2\ conj.}$) con el $C_{17:0}$. Para la cuantificación se realizaron curvas de calibrado para la mayoría de los ácidos empleando mezclas de soluciones patrones de los mismos (1 mg / mL de cada ácido en isopropanol) y los 2 estándares internos que se agregaron en las mismas cantidades que las empleadas en el procedimiento de transesterificación (Rebechi *et al*. 2003). Los otros ácidos se identificaron empleando datos bibliográficos (Antila 1983) y se cuantificaron con la curva de calibrado del ácido graso más próximo en la serie homóloga. De esta manera para el $C_{10:1}$ se empleó la curva de $C_{10:0}$, para $C_{14:1}$ la de $C_{14:0}$, para $C_{15:0}$ se promediaron los resultados obtenidos con las curvas de $C_{14:0}$ y $C_{16:0}$, para $C_{16:1}$ la de $C_{16:0}$, y para $C_{18:3}$ y $C_{18:2\ conj.}$ la de $C_{18:2}$. Se representó la relación de respuesta (área compuesto incógnita/área estándar interno, A_i /$A_{est.int.}$) en función de la relación de concentraciones (concentración compuesto incógnita/concentración estándar interno, C_i /$C_{est.int}$) (Myers 1986, Willard *et al*. 1992) y se obtuvo la función de la recta para cada compuesto: A_i /$A_{est.int.}$ = a +b C_i /$C_{est.int}$ (mg / mL).. Finalmente, las

concentraciones de los ácidos grasos se expresaron en g /100 de grasa anhidra, según la siguiente expresión:

$$\text{g AG / 100 g de grasa anhidra} = \frac{\text{Ci (mg / mL)}}{\text{PM (g)}}$$

$$\text{Ci (mg / mL)} = \{ (Y - a) / b \} \text{ Cest.int. (mg / mL)}$$

Donde :
Ci : concentración del AG de interés.
Cest. int.: concentración del estándar interno adicionado a la muestra, ácido enántico o margárico dependiendo del ácido graso cuantificado.
Y: relación de áreas, Ai / Aest. int. correspondiente
a: ordenada al origen.
b: pendiente.
PM: peso de la muestra (~ 0,15 g)
Se empleó un cromatógrafo de gases, Perkin-Elmer XL series 9000, equipado con sistema de inyección split – splitless, un detector de ionización de llama (FID) y software TurboChrom v.4.0 que permitió la recolección y el procesamiento de los datos. Se utilizó una columna capilar con una fase estacionaria de polaridad intermedia, PE- Wax (30m x 0,25 mm diámetro interno x 0,25 µm espesor film). El programa de temperaturas del horno fue el siguiente: 50 °C (4 min.), 10°C/min., 150°C (3 min.), 10°C/min., 230°C (5 min.). El inyector se termostatizó a 220°C en modo split (relación de split 1/52), el FID se mantuvo a 275°C y se empleó nitrógeno (3,3 ml min^{-1}) como gas carrier.

Grasas lácteas adulteradas

Se prepararon grasas lácteas adulteradas combinando cada uno de los perfiles de las grasas lácteas genuinas con cada uno de los perfiles de los adulterantes en diferentes proporciones (2, 5, 10 y 15%), obteniéndose con la siguiente ecuación el perfil correspondiente a las grasas lácteas adulteradas:

$$\%\ AG_n \text{ (mezcla)} = \%\ GL \times AG_n \text{ (en grasa láctea)} + \%A \times AG_n \text{ (en grasa adulterante)}$$

Donde AG_n es la concentración del ácido graso "n", %GL es el porcentaje de grasa de leche en la mezcla y % A es el porcentaje del adulterante en la mezcla.

Análisis de relaciones de ácidos grasos

Las relaciones de concentración de dos o más ácidos grasos es una de las herramientas utilizadas para la detección de adulteración de la grasa láctea. El CAA en su artículo 555 bis propone las relaciones $C_{10:0}/C_{8:0}$, $C_{12:0}/C_{10:0}$, $C_{14:0}/C_{12:0}$ y $C_{14:0}/C_{18:1}$ para detectar en la misma la presencia de grasa no láctea de origen animal.
Además diferentes autores (Juárez y Martínez – Castro 1980, Toppino *et al*. 1982, Ulberth 1994, Pinto *et al*. 2002) también proponen relaciones de ácidos grasos para detectar adulteraciones de la grasa láctea con materias grasas tanto de origen animal como vegetal.
En primer lugar se calcularon las relaciones establecidas en el CAA y las otras de bibliografía para las muestras de grasas lácteas genuinas para establecer un rango normal de valores.
Las mismas relaciones se calcularon posteriormente para las grasas lácteas adulteradas con el propósito de encontrar aquellas que pudieran detectar el agregado del adulterante.

Análisis multivariado

Con el mismo objetivo de detectar adulteraciones en la grasa láctea, en este estudio se aplicó a los datos cromatográficos una técnica de regresión multivariada. Se construyeron matrices de calibración, una para cada adulterante, que se armaron con los datos obtenidos de las grasas lácteas genuinas y las respectivas grasas lácteas adulteradas.
Con la aplicación de la Regresión Lineal Múltiple (RLM) a cada matriz de calibración se obtuvieron las funciones matemáticas que relacionaron para cada adulterante, el porcentaje de adulteración, A% (variable respuesta o dependiente), con los ácidos grasos seleccionados, C_i (variables independientes o predictoras), de acuerdo al siguiente modelo general.

$$\%A = b_0 + b_1C_i + \ldots\ldots\ldots\ldots + b_KC_K$$

Las ecuaciones obtenidas para cada adulterante se validaron con el método de validación cruzada (cross-validation) (Myers 1986, Massart *et. al*. 1988, Hair 1999) y con la matriz de predicción.
Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software Statistix 7.0 (Analytical Software, Tallahasse, FL, Estados Unidos) y The Unscrumbler, versión 7.6 (CAMO ASA).
Para las ecuaciones obtenidas se calcularon el coeficiente de determinación R^2, la raíz cuadrada del error medio cuadrático (RMSEC) para evaluar el buen ajuste del modelo de calibración, la raíz cuadrada del error medio cuadrático de la validación cruzada ($RMSE_{CV}$), y para la validación externa la raíz cuadrada del error medio cuadrático de predicción (RMSEP), el que sirve como un criterio para validar el modelo construido (Amador-Hernádez *et al*. 1999, Rodríguez-Nogales 2006, Rodríguez-Nogales y Vázquez 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se presentan las concentraciones promedio en g /100 g de grasa y los valores mínimos y máximos para los ácidos grasos identificados en las 62 grasas lácteas.

Tabla 1. Valores en g de ácidos grasos / 100 g grasa para las grasas lácteas genuinas.

Ácidos grasos	Media	Valor mínimo	Valor máximo
$C_{4:0}$	3,56	2,83	4,30
$C_{6:0}$	2,13	1,86	2,37
$C_{8:0}$	1,11	0,91	1,31
$C_{10:0}$	2,38	1,74	3,03
$C_{10:1}$	0,29	0,22	0,35
$C_{12:0}$	2,96	2,14	3,89
$C_{14:0}$	10,20	8,69	11,27
$C_{14:1}$	0,86	0,65	1,01
$C_{15:0}$	1,36	1,14	1,66
$C_{16:0}$	24,10	22,78	25,63
$C_{16:1}$	1,21	0,87	1,42
$C_{18:0}$	10,71	9,61	12,19
$C_{18:1}^{(*)}$	25,78	23,05	28,87
$C_{18:2}$	1,68	1,28	2,19
$C_{18:3}$	0,93	0,49	1,43
$C_{18:2conj.}^{(**)}$	1,45	0,85	2,03

Relaciones de ácidos grasos

En la **Tabla 2** se muestran el valor mínimo y el máximo para cada una de las 22 relaciones calculadas para las 62 grasas lácteas genuinas.
Con el propósito de determinar las relaciones que permitan detectar la adulteración de la grasa láctea, se calcularon las relaciones mencionadas para las grasas lácteas adulteradas.
En primer lugar se calcularon para las grasas lácteas adulteradas con grasas de origen animal las relaciones establecidas por el CAA de manera de establecer el porcentaje de muestras adulteradas que se encontraron fuera de los límites establecidos legalmente para cada nivel de adulteración. Luego se calcularon las otras relaciones mencionadas y se calculó para cada una de ellas el porcentaje de muestras que se encontraron fuera de los valores que se obtuvieron para las grasas lácteas genuinas.
Se verificó que las relaciones propuestas por el CAA no fueron de utilidad para detectar la adición de grasas de origen animal y que las otras relaciones no fueron de utilidad para detectar el agregado de grasa vacuna, sin embargo para grasa porcina, dos de ellas $C_{14:0}/C_{18:2}$ y $C_{18:2}/C_{8:0}$ lograron detectar el 15% de adulteración en la totalidad de las muestras adulteradas a ese nivel.
Posteriormente se calcularon las relaciones para las grasas lácteas adulteradas con materias grasas de origen vegetal y para cada una de ellas el porcentaje de muestras que se encuentran fuera de los valores obtenidos para las grasas lácteas genuinas.

Para el agregado de materias grasas de origen vegetal se encontraron relaciones que detectaron el 2% de adulteración en la totalidad de las muestras, que fueron la relación $C_{14:0}/C_{18:2}$ para aceite de girasol y de soja y la relación $C_{12:0}/C_{10:0}$ para grasa de coco.

Tabla 2. Relaciones de ácidos grasos calculadas para las grasas lácteas genuinas.

Relación de Ácidos grasos		Valor Mínimo	Valor Máximo
R1	$C_{4:0}/C_{6:0}$	**1,40**	**1,93**
R2	$C_{6:0}/C_{8:0}$	**1,70**	**2,15**
R3	$C_{10:0}/C_{8:0}$ (*)	**1,91**	**2,39**
R4	$C_{12:0}/C_{8:0}$	**2,33**	**3,07**
R5	$C_{12:0}/C_{10:0}$ (*)	**1,13**	**1,29**
R6	$C_{14:0}/C_{12:0}$ (*)	**2,89**	**4,22**
R7	$C_{14:0}/C_{18:0}$	**0,72**	**1,16**
R8	$C_{14:0}/C_{18:1}$ (*)	**0,31**	**0,48**
R9	$C_{14:0}/C_{18:2}$	**4,52**	**7,52**
R10	$C_{16:0}/C_{12:0}$	**6,19**	**11,09**
R11	$C_{16:0}/C_{14:0}$	**2,14**	**2,74**
R12	$C_{18:0}/C_{8:0}$	**7,43**	**13,41**
R13	$C_{18:0}/C_{12:0}$	**2,56**	**5,69**
R14	$C_{18:1}/C_{16:0}$	**0,93**	**1,23**
R15	$C_{18:1}/C_{18:0}$	**2,21**	**2,62**
R16	$C_{18:2}/C_{8:0}$	**1,21**	**2,21**
R17	$C_{4:0}/(C_{6:0} + C_{8:0})$	**0,89**	**1,28**
R18	$C_{12:0}/(C_{4:0} + C_{6:0})$	**0,39**	**0,73**
R19	$C_{18:0}/(C_{6:0} + C_{8:0})$	**2,67**	**4,26**
R20	$(C_{18:1} + C_{16:0})/C_{4:0}$	**11,22**	**17,94**
R21	$(C_{6:0} + C_{8:0} + C_{10:0} + C_{12:0})/C_{18:0}$	**0,55**	**1,06**
R22	$(C_{18:0} + C_{18:1})/(C_{6:0} + C_{8:0})$	**9,02**	**14,42**

(*): Relaciones establecidas en el CAA.

Regresión Lineal Múltiple

Con el propósito de obtener ecuaciones que sirvan para predecir el porcentaje de adulteración en la grasa láctea, se utilizó la Regresión Lineal Múltiple (RLM).

Para obtener el modelo de regresión más adecuado se aplicaron varios métodos que permitieron seleccionar una cantidad de variables independientes altamente relacionadas con la variable dependiente y con mínima correlación entre ellas. Se utilizaron los métodos de búsqueda secuencial como la eliminación regresiva (*backward*), la estimación por etapas (*stepwise*) y el *best subset regression models*

En la **Tabla 3** se presentan los mejores modelos que explicaron un alto porcentaje de la varianza de la variable dependiente con un pequeño error, indicándose para cada uno de ellos el coeficiente de determinación (R^2) y el error estándar de la predicción (S).

Tabla 3. Modelos obtenidos para los distintos adulterantes.

Adulterantes	**Modelos obtenidos aplicando RLM**	**R^2**	**S**
Grasa vacuna	% A = 3,83 + 22,77 $C_{10:0}$ – 132,51 $C_{10:1}$ – 6,50 $C_{14:0}$ + 27,45 $C_{14:1}$ + 19,76 $C_{16:1}$	0,83	2,41
Grasa porcina	% A = -77,68 + 1,27 $C_{16:0}$ + 6,38 $C_{16:1}$ + 0,92 $C_{18:1}$ + 9,51 $C_{18:2}$	0,92	1,58
Aceite de girasol	% A = -3,03 – 5,32 $C_{16:1}$ – 1,78 $C_{18:0}$ + 1,03 $C_{18:1}$ + 1,31 $C_{18:2}$	0,99	0,54
Aceite de soja	% A = 89,75 – 1,60 $C_{4:0}$ – 3,50 $C_{10:0}$ – 1,39 $C_{14:0}$ – 0,92 $C_{16:0}$ – 1,26 $C_{18:0}$ – 1,01 $C_{18:1}$ + 0,96 $C_{18:2}$ – 1,56 $C_{18:3}$	0,99	0,32
Grasa de coco	% A = -2,28 – 2,20 $C_{6:0}$ + 14,02 $C_{8:0}$ – 3,60 $C_{10:0}$	0,99	0,19

R^2: coeficiente de determinación múltiple; S: error estándar de la predicción

Para los adulterantes vegetales se obtuvieron buenos R^2 y bajos S, para los adulterantes animales buenos R^2correspondiendo el menor valor para la grasa vacuna, y los S fueron superiores a los obtenidos para los adulterantes vegetales.
Con respecto a la validación de los modelos, en la **Tabla 4** se observan los errores calculados para la validación interna y para la externa. Para la validación interna, se empleó la validación cruzada, la que arrojó errores más bajos para los adulterantes vegetales que los animales y los mismos resultados se obtuvieron con la validación externa. Además a cada una de las ecuaciones se les calculó el Limite de detección empleando la siguiente expresión:

$LD = 3{,}3 \times SE_{CV}/b$ (FDA 1994, ICH 2005)

Donde, SE_{CV} es el error estándar de la validación cruzada, representa una estimación del error involucrado en el análisis utilizando el modelo y b es la pendiente de la validación cruzada.
Los límites de detección fueron menores al 2% para las materias grasas de origen vegetal, 6 % para grasa porcina y 10% para grasa vacuna.

Tabla 4. Errores obtenidos para la validación interna y para la externa.

Adulterante	$RMSE_{CV}$ %	RMSEP %
Grasa vacuna	2,54	2,80
Grasa porcina	1,71	1,77
Aceite de girasol	0,54	0,74
Aceite de soja	0,34	0,35
Grasa de coco	0,20	0,13

CONCLUSIONES

Las relaciones propuestas por el CAA para detectar adulteraciones con grasas de origen animal, así también como las propuestas en bibliografía, no lograron evidenciar bajos niveles de adulteración.
Sin embargo en el caso de las adulteraciones realizadas con grasas de origen vegetal, los resultados fueron satisfactorios ya que se encontraron relaciones que detectaron el 2% de adulteración.
Los modelos obtenidos en este trabajo mediante la aplicación de la RLM, mostraron una buena capacidad para la predicción de adulteraciones de grasa láctea con materias grasas de origen vegetal y animal. Para los adulterantes de origen vegetal se consiguieron mayores R^2 y menores S que para los de origen animal.
Con la aplicación de las RLM se observó la importancia del empleo de una herramienta estadística multivariada para poner de manifiesto adulteraciones difíciles de detectar utilizando solo el análisis de las relaciones de ácidos grasos fundamentalmente cuando el adulterante fué de origen animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amador-Hernádez J, Lopez-Martínez L, Lopez-De-Alba PL, Caldera A, Estela JM y Cerda V 1999. Determinación simultánea de seis hidrocarburos policiclicos aromaticos en medio micelar por Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-1) utilizando espectros de fluorescencia de ángulo variable lineal. Boletín de la Sociedad Chilena de Química 44 nº3 299 – 313.

Antila. 1983. Milk Lipids. Milchwisseniscahft 38 (8)

Christie W 1982. Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and structural analysis of lipids. Cap 3 y 4 Pergamon Press. 2nd. Edition.

Código Alimentario Argentino 2008. Tomo I-a Capítulo VIII.

Duthie A, Fox J, Cavalier J y Wulff S 1998. Modification of the Vermont Test for Monitoring Fat Adulteration of Dairy Products. J. Dairy Sci., 71, 1764 – 1768.

European Union (EU) 2001. Comisión Regulation Nº 213/2001. Methods for the análisis and quality evaluation of milk and milk products. Official Journal of the European Communities, L37, 42 – 99.

Food and Drug Administration (FDA) 1994. Validation of Chromatographic Methods.

Fox J, Duthie A, y Wulff S 1998. Precision and Sensitivity of a Test for Vegetable Fat Adulteration of Milk Fat. J. Dairy Sci., 71, 574 – 581.

Hair J, Anderson R, Tatham R, y Black W 1999 Análisis multivariante. Prentice Hall, Madrid.

ICH, 2005.Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology – Q2 (R1).

International Organization for Standardization ISO 14156, 1999. Milk and milk products – Extraction methods for lipids and liposoluble compounds.

Juárez M y Martínez - Castro I. 1980 Criterios analíticos para la detección de grasas extrañas en la grasa de leche. Alimentaria. Revista de Tecnología e Higienen de los Alimentos 109 61 – 86.

Lercker G, Frega N, Bocci F, Bertacco, G 1992. Il Grasso Del Latte. L'esame Gas Cromatografico Del Triacilgliceroli Nell'acertamento Della Genuinità Del Burro. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 43, 2, 95 – 110.

MacGibbon AKH. y Taylor MW. 2006. "Composition and Structure of Bovine Lipids" Capitulo 1 en Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids. Fox, P. y McSeeney, P. 3º Edition, Springer , Estados Unidos.

Mariani C, Venturini S, Contarini G. 1994.Detection of Refined Animal and Vegetable Fats in Adulteration of Pure Milkfat. J. American Oils Chemistry Society, 71, 12; 1381 – 1384.

Massart D, Vandeginste B, Deming, S, Michotte Y y Kaufman E. 1988. Chemometrics: a textbook. Elsevier, Nueva York,.

Molkentin J y Precht D. 2000. Equivalence of Packed and Capillary GC Columns for Detection of Foreing Fat in Butter by Use of the Triglyceride Formula Method. Chromatographia, 52, 11/12, 791 – 797.

Murphy J J, Mc Neill G P, Convolly J F y Gleeson P A 1990. Separazione del grasso del latte: Metodo fisico. Journal of Dairy Research **57**: 295 – 306.

Myers, R. 1986.Classical and Modern Regresión with Applications. Duxbury Press, Boston, Massachusetts.

Pinto C. 1996 Avances en la analítica de la Leche y los Productos Lácteos. Tecnología Láctea Latinoamericana, 6, 35 – 48.

Pinto M, Rubilar A, Carrasco E, Ah-Hen K, Brito C y Molina L. 2002. Efecto Estacional y del área Geográfica en la composición de ácidos grasos en la leche de bovinos. Agro Sur 30 n° 2 75 – 90.

Rebechi SR, Bernal SM, Perotti MC y Zalazar C A. 2003. Determinación del perfil de ácidos grasos totales de grasa láctea por cromatografía de gases de ésteres etílicos. Procedding, V Simposio de la AOAC de la sección de América Latina y el Caribe.

Rodríguez-Nogales J M. 2006. Approach to the quantification of mixtures by partial least-squares, principal component and multiple linear regression techniques. Food Chemistry 98 782-789.

Rodríguez-Nogales J M y Vázquez F. 2007. Application of electrophoretic and chemometric análisis to predict the bovine, ovine and caprine milk percentages in Panela cheese, an unripened cheese. Food Control 18 580 – 586.

Timms R. 1980. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. J. of Dairy Research, 47, 295 – 303.

Toppino P M, Contarini G, Traversi A L, Amelotti G y Gargano A. 1982. Parametri gas cromatografici di valutazione della genuinitá del burro. La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse vol LIX 591 – 610.

Ulberth F. 1994. Detection of Milk Fata Adulteration by Linear Discriminant Analysis of Fatty Acid Data. J. of AOAC International, 77, 5, 1326 – 1334.

Ulberth F. 1995. Quantitation of Foreign Fatin Foreign Fat/Milkfat Mixtures by Multivariate Regression Analyis of Fatty Acid Data. J. Agric. Food Chem., 43, 6, 1556 – 1560.

Willard H, Merrit L, Dean J y Settle F. 1992.Cromatografía de gases. Capítulo 18 en “Métodos Instrumentales de Análisis”. Grupo Editorial Iberoamérica, México.

Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas: aguaymanto (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), papaya de monte (*Carica pubescens*) y tuna (*Opuntia ficus indica*)

Evaluation of antioxidant capacity and bioactive compounds in native fruits from Perú: aguaymanto (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), papaya de monte (*Carica pubescens*) and tuna (*Opuntia ficus indica*)

Repo de Carrasco R y Encina Zelada C

Facultad de Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina, Av. La Universidad s/n, Lima12, Perú, Telf. (51-1) 996214357
ritva@lamolina.edu.pe

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos: Realizar la caracterización química y nutricional y analizar el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en las fruta nativas (tunas – *Opuntia ficus indica* -, aguaymanto – *Physalis peruviana* - , tomate de árbol - *Cyphomandra betacea* -, y papaya de monte –*Carica pubescens* -). Se trabajó con tuna roja, verde y anaranjada procedentes de Ayacucho, con tomate de árbol procedente de Junín, con aguaymanto procedente de Huancayo y con papaya del monte procedente de Arequipa. En el caso del tomate de árbol se destacó el contenido relativamente alto de fibra cruda 4,5 g/100 g de fruta. El tomate de árbol y el aguaymanto tuvieron mayor contenido de proteínas (1,9 g/100 g para ambos frutos) que las otras frutas estudiadas. En cuanto a compuestos fenólicos, la papaya de monte es la fruta que presentó mayor contenido de estos compuestos (167 mg de equivalente ácido gálico/g de fruto). El contenido de betalaínas en tuna roja fue de 68,95 mg/1000 ml. El aguaymanto tuvo el mayor contenido de ácido ascórbico (43,3 mg/100g) seguido por la papaya de monte (31,41 mg/100g) y el tomate de árbol seguida por la tuna roja 16,09 mg/100g y 22,75 mg/100g respectivamente. El contenido de carotenoides fue mayor en el tomate de árbol (4 mg β-caroteno/100 g) seguido por el aguaymanto con 2,64 mg β-caroteno/100 g. La capacidad antioxidante fue medida por los métodos DPPH y ABTS. La tuna roja presentó una capacidad de inhibición del radical DPPH mucho mayor que las otras tunas estudiadas (77,65 %). La tuna anaranjada tuvo mayor capacidad antioxidante que la tuna verde con un 41,65 % y 34,20 % respectivamente. Comparando las diferentes frutas en cuanto a capacidad antioxidante medida por el método del DPPH, la Papaya de monte presentó el valor más alto (1936 ± 228 µg Equivalente Trolox/g de fruto); seguido por el Tomate de árbol (853 ± 52 µg Equivalente Trolox / g de tejido); mientras que la mayor capacidad antioxidante medida por el método del ABTS fue el de la Papaya de monte (2141 ± 71 µg Equivalente Trolox/g de fruto); seguido por el Aguaymanto (1066 ± 28 µg Equivalente Trolox/g de fruto).

ABSTRACT

The present research has the following objectives: To carry out the chemical and nutritional characterization and to analyze the bioactive compounds and antioxidant capacity of the native fruits (prickle pears *Opuntia ficus indica* -, aguaymanto *Physalis peruviana* -, tree tomato *Cyphomandra betacea* -, and mountain papaya *Carica pubescens*). The fruits under the study were: red, green and orange prickle pear from Ayacucho, tree tomato from Junín, aguaymanto from Huancayo and mountain papaya from Arequipa. The proximate analysis demonstrated that all these fruits have high water content, between the 78 and 92 %. In the case of the tree tomato the relatively high crude fibre content stood out (4,5 g/100 g of fruit). The tree tomato and aguaymanto had higher protein content (1,9 g/100 g for both fruits) than the other fruits. Regarding to the mineral analysis, the prickle pears are very good sources of phosphorus as well as calcium. On the other hand the tree tomato is an

excellent potassium source followed by aguaymanto and papaya. In addition aguaymanto is a relatively good source of iron and zinc. The mountain papaya is a very important source of phosphorus surpassing to the other fruits. All the samples presented significant difference as far as the content of total phenolic compounds, but mountain papaya is the fruit that presented the highest content of these compounds (167 mg of gallic acid equivalent/g of fruit). The content of betalains in red prickle pear was of 68,95 mg/1000 ml. Aguaymanto had the highest vitamin content C (43,3 mg/100g) followed by mountain papaya (31,41 mg/100g). The lowest content of this vitamin was in the tree tomato followed by red prickle pear, 16.09 mg/100g and 22,75 mg/100g, respectively. The content of carotenoids was the highest in the tree tomato, (4 mg β-carotene/100 g) followed by aguaymanto with 2,64 mg β-carotene/100 g. Red prickle pear presented much greater capacity of inhibition of radical DPPH than the other varieties (77,65 %). The orange prickle pear showed higher antioxidant capacity than green prickle pear, 41,65 % and 34,20 % respectively. Comparing the different fruits regarding to the measurement of the antioxidant capacity, the mountain papaya (2141 ± 71 μg Equivalente Trolox/g of fruit) had the highest value followed by aguaymanto (1066 ± 28 μg Equivalente Trolox/g of fruit), tree tomato and red prickle pear

PALABRAS CLAVE: *frutas nativas peruanas, aguaymanto, tomate de árbol, papaya de monte y tuna.*

KEYWORDS: *peruvians native fruits, golden berry, tree tomato, mountain papaya and tuna.*

INTRODUCCIÓN

En el área andina se cultivan muchas frutas poco conocidas en otras regiones, como el tomate de árbol o sacha tomate (*Cyphomandra betacea*), aguaymanto (*Physalis peruviana*), tuna (*Opuntia ficus indica*) y papaya de monte (*Carica pubescens*). Estas frutas se consumen principalmente en forma natural sin mayor grado de procesamiento, no existe tampoco mucha información sobre su composición química. La revalorización de frutas nativas poco conocidas o desconocidas fuera de sus regiones de origen sería de gran beneficio para el poblador rural del interior del Perú que se encuentra entre los grupos poblacionales más pobres de Latinoamérica. Entre estas frutas nativas existen fuentes importantes de vitaminas, azúcares, pectinas, compuestos antioxidantes, ácidos, aromas y sabores que esperan su identificación y posterior explotación por la industria para elaborar productos novedosos y competitivos en el mercado.

El Aguaymanto (*Physalis peruviana*) es originaria del Perú y existen diversas referencias históricas que indican que fue domesticado, cultivado y muy apreciado por los antiguos peruanos. Es una planta perenne pero cultivado como anual (Nacional Research Council, 1989). El fruto es una baya carnosa, jugosa, en forma de globo con un diámetro entre 1,25 - 2,5 cm y contiene numerosas semillas. Mayorga *et al.* (2001), estudiaron compuestos que son responsables del aroma (*flavour*) del aguaymanto y encontraron 40 compuestos volátiles.

La Tuna (*Opuntia ficus indica*) originaria de América, fue llevada por los españoles a Europa y desde allí distribuida hacia otros países del mundo. Esta gran dispersión geográfica dio origen a muchos ecotipos con características locales propias. Su producción, cultivo y/o crianza es altamente rentable así como la de su huésped, la cochinilla. Gurrieri *et al.* (2000), hicieron la caracterización química de la tuna italiana y un estudio de almacenamiento de jugo de tuna. Ellos trabajaron con tres variedades: roja, amarilla y blanca y encontraron que las tunas tienen una acidez baja y un relativamente alto contenido de azúcar y vitamina C.

El tomate de árbol es originario de la vertiente oriental de los Andes, específicamente Perú, Ecuador y Colombia. Perteneciente al grupo de las frutas semiácidas, siendo conocida con diversos nombres en distintas regiones. En 1970, en Nueva Zelanda se le asignó el nombre "tamarillo", como designación comercial generalizada para el tomate de árbol en el mercado mundial. En el centro de la fruta, rodeadas de pulpa más suave que la capa exterior, se encuentran entre 200 y 400 pequeñas semillas comestibles, de forma plana y circular. La pulpa cercana a la cáscara es firme, mientras que la pulpa interna es suave y jugosa con un sabor agridulce.

Carica pubescens, llamada también "papaya de la sierra", "papayita arequipeña" o papaya de monte, requiere de climas templado - cálido. Las plantas miden de 2 a 3 metros de altura según el lugar. El

fruto es una baya, de pericarpio delgado, jugoso, de color amarillo (pulpa y piel), pasando por color verde durante la madurez.

El presente trabajo de investigación tiene los siguientes objetivos:

Determinar el análisis proximal de las siguientes frutas nativas: Tuna (*Opuntia ficus indica*), Aguaymanto (*Physalis peruviana*), Tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) y Papaya de monte (*Carica pubescens*).

Determinar el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en las frutas nativas antes mencionadas.

Dichos objetivos han sido planteados con el fin de valorar el aporte nutricional derivado del consumo de dichas frutas, así como su potencial propiedad antioxidante beneficiosa para el organismo, y de esta forma realzar su valor comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y reactivos

Muestras

Se recolectó un kilogramo de cada materia prima, Aguaymanto (*Physalis peruviana)* procedente del valle del Mantaro (Huancayo), Papaya de Monte (*Carica pubescens)* procedente de Arequipa, Tuna (*Opuntia ficus indica)* procedente de Ayacucho de tres colores: roja, verde y anaranjada, Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea)* procedente de Junín.

Reactivos

ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) adquirido de Sigma Chemical Co., DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) de Aldrich Chemical Co., Persulfato de Potasio de grado analítico de Harleco 7574, Etanol absoluto y Hexano de J.T. Baker, Metanol de Mallinckrodt, Acetona, Folin-Ciocalteu, Carbonato de Sodio anhidro al 1 N, 2,6 diclorofenol indofenol de Ferak 33095, ácido L(+)-ascórbico para análisis de Riedel-di Haën 33034, Acido Metafósforico, ácido acético glacial 100% de Merck, ácido cítrico anhidro extra puro de Schardau y alcohol de 96°GL.

Metodología experimental

Preparación de las muestras

Se utilizaron frutas sanas y firmes que fueron lavadas con agua destilada. El Aguaymanto entero fue licuado durante 30 seg. La papaya de monte se cortó en mitades para eliminar el mucílago interno y se procedió a licuar durante 1 minuto. Las tunas fueron peladas y licuadas durante 30 seg. El tomate de árbol fue separado en: cáscara, pulpa y pepas, tomándose la pulpa para realizar los análisis respectivos, la cual fue licuada durante 1 min. Todas las muestras fueron inmediatamente usadas para la preparación de extractos. Los extractos hidrofílicos se obtuvieron utilizando como solvente el metanol, y para los extractos lipofílicos el solvente fue isopropanol/hexano en una proporción de 2:3.

Preparación de los extractos

Fenoles Totales y Capacidad antioxidante. Para todas las muestras se pesó 2,5 g y se añadió 12,5 mL de metanol, se homogenizó la muestra con un agitador magnético durante 15 minutos y se almacenó el extracto durante 24 h a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se procedió a centrifugar el homogenizado durante 20 min a 5000 rpm. El sobrenadante se guardó para análisis posteriores y el precipitado fue eliminado. Aquí debe describir como realizó los extractos lipofílico e hidrofílico para medir actividad antioxidante, ya que en la metodología ustedes mencionan que midieron en estos dos tipos de extractos.

Vitamina C. Los extractos para la determinación de vitamina C en frutas se prepararon según el método descripto por Luximon-Ramma *et al.* (2003)

Betalaínas. Para obtener el extracto de Tuna roja para el análisis de betalaínas, se siguió el método indicado por Chirinos (1999). En primer lugar se realizó una inactivación enzimática a 100°C durante 5 min., luego se peló y se cortó en rodajas y se sometió a una extracción con agua acidulada (ácido cítrico al 0,2%) relación 1:2. Se procedió a la precipitación de la goma con alcohol a 96°GL (1:2), y se filtró. La solución filtrada se guardó para posteriores análisis.

Métodos de análisis

La determinación de humedad se realizó en estufa por 24 h según el método de AOAC (1990; método 934.06). La determinación de proteínas se realizó mediante el método Kjeldhal recomendado por AOAC (1990; método 978.04) empleando el factor 6,25 para obtener proteína total. La determinación

de grasas se realizó por el método Soxhlet recomendado por AOAC (1990; método 930.09). Asimismo, las determinaciones de fibra bruta y cenizas se realizaron por los métodos recomendados por AOAC (1990; método 930.10 y 940.26, respectivamente). Finalmente, la estimación del porcentaje de carbohidratos se obtuvo por diferencia, restando los porcentajes obtenidos para los otros componentes tal como lo indica Collazos *et al.* (1996).

El contenido de minerales fue determinado por el método AOAC (1990; método 975.03).

Las mediciones de acidez titulable y pH se realizaron siguiendo los métodos recomendados por AOAC (1990; métodos 942.15 y 981.12, respectivamente).

El contenido de sólidos solubles se determinó utilizando un refractómetro ABBE de lectura directa y expresada en Grados Brix. (AOAC 1990, método 932.12).

Las determinaciones de capacidad antioxidante se realizaron mediante dos métodos in vitro: DPPH y TEAC. El primero mide la captación del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), seguida por monitoreo de la disminución de la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams *et al*., 1995). El método TEAC mide la capacidad de captación del radical catión 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) por un antioxidante, cuya absorbancia se mide a 734 nm (Re *et al*., 1999). Para ambos métodos se utilizó Trolox como compuesto de referencia.

Los compuestos fenólicos fueron determinados por el método de Folin-Ciocalteau (Swain & Hillis, 1959) utilizando como compuesto de referencia el ácido gálico.

La determinación del contenido de Carotenos se realizó por determinación espectrofotométrica a 470 nm utilizando como solvente una mezcla de acetona:etanol, metodología seguido por Talcott y Howard (1999)

El contenido de Betalaínas se determino utilizando el método espectrofotométrico utilizado por Stintzing *et al*., (2003).

La determinación del contenido de ácido ascórbico se realizó por titulación con 2,6 diclofenol indofenol como solución valorante, y teniendo un estándar conocido de acido ascórbico metodología sugerida por AOAC (1998; método 967.21).

Análisis estadístico

Los resultados fueron procesados por un Análisis de Varianza (ANOVA) y la significancia estadística por la Prueba de Tukey. Las diferencias en $p < 0.05$ fueron considerados significativos. El programa empleado fue SAS System V8.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal y químico

En la **Tabla 1** se puede apreciar la caracterización de las frutas en cuanto a su pH y grados Brix. Morín *et al.* (1985) indican que la cantidad de sólidos solubles que contiene el jugo de una fruta cítrica es también un índice del grado de madurez de la misma. La norma técnica de Colombia (ICONTEC, 1999), en relación a aguaymanto, establece un valor de grados Brix mínimo de entre 13,2 y 14,1 para el estado de madurez intermedia; mostrando así que nuestro fruto tiene un menor contenido de sólidos solubles, lo que posiblemente se deba a las diferencias entre el aguaymanto producido en Colombia con el proveniente del Valle del Mantaro (Perú).

Tabla 1. Determinaciones de grados Brix y pH de las frutas estudiadas.

Nombre común	°Brix	pH
Aguaymanto	13,4 ± 0,2	3,43 ± 0,01
Papaya de monte	4,5 ± 0,1	4,50 ± 0,02
Tuna	13,8 ± 0,2	6,07 ± 0,01
Tomate de Árbol	11,57 ± 0,25	3,77 ± 0,2

Datos expresado como promedio ± desviación estándar (n = 3)

En la **Tabla 2**, se presentan los resultados de análisis proximal. Todas las frutas tienen alto contenido de agua, entre 78,4 y 93,7% destacando la papaya de monte con el mayor contenido de agua y la tuna roja con el menor contenido. En cuanto al contenido de proteínas en frutas, el tomate de árbol y aguaymanto, poseen mayor proporción (1,9 g/100 g).

Entre las tres variedades de tuna, la tuna verde tiene el mayor contenido de proteínas (1,5 g/100 g), mientras que la tuna roja y anaranjada presentaron valores inferiores (0,9 g/100 g). Al respecto, Davies y Albrigo (1994) señalan que los frutos, en especial los que poseen características cítricas, tienen un bajo contenido de proteína y de grasa dentro de los cuales se puede considerar al aguaymanto. El tomate de árbol tiene un alto contenido de fibra cruda 4,5 g/100 g. Todas estas frutas, como las frutas en general, son fuentes insignificantes de grasas, pero son fuentes importantes de carbohidratos. Los principales carbohidratos de las frutas son los azúcares. Davies y Albrigo (1994) señalan que los carbohidratos en los frutos, especialmente los que poseen características cítricas, están conformados por monosacáridos (glucosa y fructosa), oligosacáridos (sacarosa) y polisacáridos (celulosa, almidón, hemicelulosas y pectinas).

Tabla 2. Composición proximal de distintas frutas nativas peruanas (g/100 g de fruta).

Componente	Tuna Verde	Tuna Roja	Tuna anaranjada	Tomate de árbol	Aguaymanto	Papaya del monte
Humedad (%)	81,7±0,42	78,4±0,36	80,6±0,48	82,9±0,64	79,8±0,56	93,7±1,22
Cenizas (%)	0,4±0,02	0,4±0,01	0,5±0,03	1,0±0,1	1,0±0,09	0,5±0,05
Proteína cruda (%)	1,5±0,11	0,9±0,02	0,9±0,08	1,9±0,18	1,9±0,24	0,9±0,08
Fibra cruda (%)	3,7±0,15	3,5±0,14	3,9±0,11	4,5±0,15	3,6±0,16	0,6±0,05
Grasa cruda (%)	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01	0,0±0	0,0±0
Carbohidratos (%)	16,3±0,25	20,2±0,24	17,9±0,32	14,1±0,28	17,3±0,34	4,9±0,14
Energía total (Kcal/100g de muestra)	72,1±0,84	85,3±0,92	76,1±0,98	64,9±0,64	76,8±0,86	23,2±0,52

Datos expresado como promedio ± desviación estándar (n = 3)

En cuanto al contenido de minerales en las frutas (**Tabla 3**), se puede observar que las tunas son fuentes importantes de fósforo, destacando en este aspecto la tuna verde (332 mg/100 g). Estas frutas son también fuentes relativamente buenas de calcio. Así mismo, cabe destacar el alto contenido de potasio que presentan el tomate de árbol y el aguaymanto. Según Aranceta y Pérez-Rodrigo (2006), en general las frutas tropicales aportan entre 10 y 30 mg de calcio, aunque existen frutas con mayor contenido como la naranja dulce (40 mg), la breva (62 mg) y el tamarindo (74 mg). En cuanto al hierro la mayoría aporta entre 0,1 y 0,7 mg de hierro; el banano y el aguacate son algunas frutas tropicales con mayor contenido de potasio (entre 400 y 574 mg/100 g), mientras que el resto de frutas tropicales tienen en promedio un contenido de 100 a 250 mg. Con respecto al cinc, la granadilla es la que presenta un mayor contenido (0,8 mg), y el resto aportan entre 0,1 y 0,2 mg de cinc.

Tabla 3. Contenido de minerales en frutas nativas peruanas (mg/100 g).

Fruta	Fósforo	Calcio	Hierro	Zinc	Potasio
Tuna verde	332	29,8	0,5	0,2	25,6
Tuna roja	286,6	38,6	0,4	0,3	30,1
Tuna anaranjada	251,3	39,6	0,3	0,2	26,1
Tomate de árbol	44,7	25,56	0,9	0,45	441,03
Aguaymanto	37,9	10,55	1,24	0,4	292,65
Papaya de monte	600	14,6	0,4	0,1	242

Las frutas nativas son fuentes importantes de nutrientes, como vitaminas (vitamina C, betacarotenos) y minerales (fósforo, potasio). El aguaymanto presentó un alto contenido de carotenoides (2,64 mg β-caroteno/100 gramos muestra) (**Tabla 4**). Las tunas rojas y anaranjadas son ricas en pigmentos, que fueron identificados como betalaínas. Lamghari El Kossori *et al*., 1998 encontraron que la cáscara de tuna era rica en calcio y potasio 2,09 % y 3,4 % b.s.

El contenido de compuestos fenólicos es mayor que el contenido en frutas cítricas y melón, pero menor que en uvas y grosellas encontrados por Vinson *et al.* (1998). Lee *et al.* (2002) hallaron que los tallos de tuna contenían 3,7 mg de compuestos fenólicos totales/g de ácido gálico. En el caso de papaya de monte se encontró una mayor cantidad de compuestos fenólicos (167 mg/100g) que en la papaya tropical (57,6 mg/100g) (Luximon-Ramma *et al*., 2003).

Tabla 4. Contenido de Compuestos Bioactivos y capacidad antioxidante.

Nombre Común	DPPH[a]	ABTS[a]	Fenoles[b] Totales	Vitamina C[c]	Carotenos[d]	Betalaínas[e]
Aguaymanto	729 ± 98b	1066 ± 28b	154 ± 3b	43,3 ± 0,5a	2,64 ± 0,03b	-
Papaya de monte	1936 ± 228a	2141 ± 71a	167 ± 0,3a	31,41 ± 1,3b	0,72 ± 0,02c	-
Tomate de Árbol	853 ± 52b	838 ± 35c	130 ± 0,8c	16,09 ± 1,6d	4,00 ± 0,01a	-
Tuna roja	482 ± 35c	651 ± 40d	52 ± 5d	22,75 ± 0,6c	-	68,95 ± 0,6

Datos expresados como promedio ± desviación estándar (n = 3)
[a] µg Equivalente Trolox / g de tejido
[b] mg de Equivalente ácido gálico / 100 g muestra
[c] mg ácido ascórbico / 100 g muestra
[d] mg β-caroteno / 100 gramos muestra
[e] mg de betalaínas / 1000 ml
\- valor no determinado
La misma letra en la misma columna indica que no hay diferencia significativa ($p<0.05$)

El contenido de betalaínas en tuna roja fue de 68,95 mg/1000 ml (**Tabla 4**). Moreno *et al.* (2003) encontraron que la tuna venezolana (*Opuntia Boldinghii*) tenia 0,59 mg/100mL de betalaínas. El contenido de vitamina C en la tuna peruana fue también mayor que en la tuna venezolana. La papaya de monte tiene menor cantidad de vitamina C que la papaya tropical 31,41 mg/100g y 92,9 mg/100g, respectivamente (Luximon-Ramma *et al*.; 2003).

En la **Tabla 4** se presenta la comparación de los contenidos de carotenoides en tomate de árbol, aguaymanto y papaya de monte. Rodríguez-Amaya (1999) presenta diferentes contenidos de carotenoides en diversas frutas y hortalizas hallados por varios autores en todo el mundo, así tenemos al camote (de 0,02 a 21,8 mg de β-caroteno/100 g), mango (de 0,6 a 2,9 mg de β-caroteno/100 g), melón (de 1,6 a 12,6 mg de β-caroteno/100 g), mangos brasileños (15±7 µg/g de β-caroteno), papaya (de 0,4 a 10 g/g) y naranja brasileña y papaya roja fueron de 1,2 a 6,1 µg/g y 2,1 a 10 µg/g respectivamente.

Respecto al tomate de árbol, tuvo un valor de 4,00 mg β-caroteno / 100 g muestra el cual no sólo se considera el mayor de los frutos evaluados, sino también que según Begum y Pereira (1977) mencionados por Rodríguez-Amaya (1999) estaríamos hablando de un frutal con un nivel relativamente elevado de β-caroteno; mientras que la papaya de monte se consideraría como un fruto de nivel bajo en β-caroteno.

Determinación de la capacidad antioxidante

En la **Figura 1** se puede apreciar la capacidad antioxidante de las tres tunas estudiadas; la tuna roja (77,65%) tiene la mayor capacidad antioxidante en comparación con las otras tunas estudiadas, seguida por la tuna anaranjada (41,65%) y finalmente la tuna verde con un valor de 34,20%, medidas como porcentaje de inhibición del radical DPPH. La capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de pigmentos de la fruta, dado que los diferentes pigmentos de la tuna verde (clorofila), de la tuna amarilla (carotenoides) y de la tuna roja (betalainas) al tener un mayor contenido de los mismos, estos tienen efectos sinérgicos al captar radicales libres, aumentando así la capacidad antioxidante de la fruta. Lee *et al.* (2002), determinaron la capacidad antioxidante de tallos de tuna utilizando el método de radical DPPH y obtuvieron una inhibición casi total en 40 minutos de reacción.

En las **Figuras 2** y **3** se muestra el porcentaje de inhibición del radical DPPH y ABTS respectivamente, para cada tipo de fruto evaluado; la capacidad antioxidante de un alimento depende

de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales presentes en él. El tomate tiene el menor valor de capacidad antioxidante, a pesar de tener grandes cantidades de licopeno, probablemente porque el licopeno y carotenoides en general, son eficientes en la extinción (*quenching*) de singletes de oxígeno, y no tanto en el atrapamiento de radicales peroxílicos (Pineda *et al*. 1999).

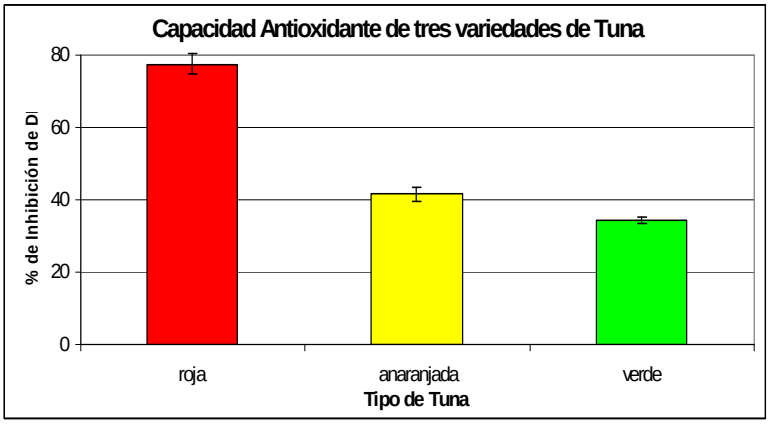


Figura 1. Capacidad antioxidante de tres variedades de tunas cuantificado como inhibición del radical DPPH.

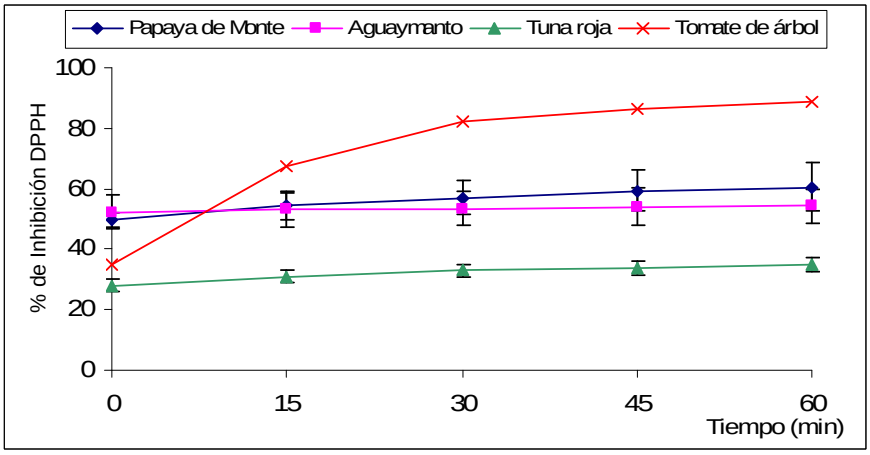


Figura 2. Capacidad antioxidante de de Frutas Nativas como inhibición del radical DPPH.

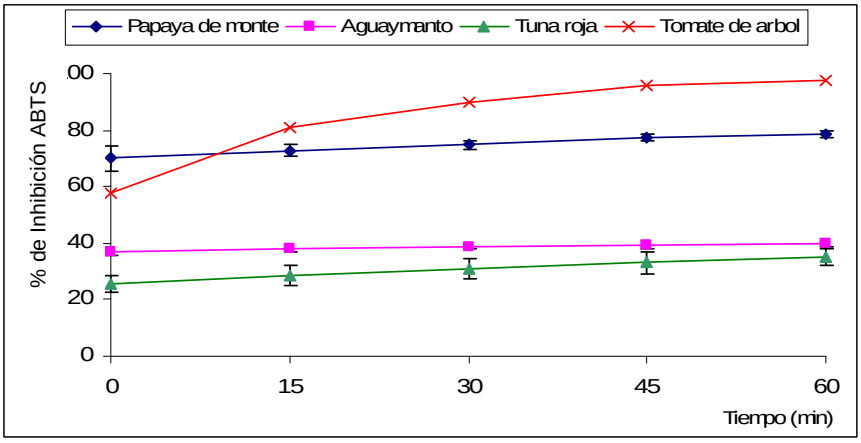


Figura 3. Capacidad antioxidante de Frutas Nativas como inhibición del radical ABTS.

En ambos ensayos de DPPH y ABTS se observó que la Papaya de monte, presenta mayor capacidad antioxidante que las demás frutas. La tuna roja fue la fruta que presentó menor capacidad antioxidante.
Gordon (1990), indica que los compuestos lipofílicos (carotenoides) son mejores queladores que reductores, es decir, los métodos de cuantificación de capacidad antioxidante lipofílica tanto por ABTS como por DPPH no cuantificaría verdaderamente dicho valor, además del posible efecto sinérgico que existirían entre los compuestos lipofílicos (carotenoides) e hidrofílicos (ácido ascórbico y/o compuestos fenólicos) presentes en el aguaymanto, tomate de árbol, papaya de monte y tuna.
Finalmente, cabe destacar que existe una buena correlación entre la actividad antioxidante de las frutas medida por los métodos TEAC y DPPH, con un coeficiente de correlación de 0,98.

CONCLUSIONES

Tanto el tomate de árbol como el aguaymanto son frutas con un contenido de proteína relativamente alto (1,9 g/100 g); mientras que respecto al contenido de fibra cruda, todas las frutas nativas estudiadas a excepción de la papaya de monte tuvieron un contenido mayor de 3,5 g/100 g.
Tanto el tomate de árbol como el aguaymanto son frutas con un alto contenido de potasio, zinc y hierro respecto a la papaya de monte y las tres variedades de tunas evaluadas; estas últimas tuvieron el mayor contenido de calcio mientras que la papaya de monte tuvo el mayor contenido de fósforo.
La mayor capacidad antioxidante medida por el método del DPPH y el método ABTS fue el de la papaya de monte; el mayor contenido de compuestos fenólicos fue el encontrado también en la papaya de monte, mientras que el mayor contenido de ácido ascórbico lo tuvo el aguaymanto, y el mayor contenido de carotenos fue tomate de árbol.
Se determino que la tuna roja tuvo un contenido de Betalaínas de 68,95 ± 0,6 mg de betalaínas/1000 mL de fruta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, 1990 Official Methods of Analysis, 15TH Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC

AOAC, 1998 Official Methods of Analysis, 16TH Edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC

Aranceta, J y Pérez-Rodrigo, C. 2006. Frutas, verduras y salud. Masson Elsevier

Brand-Williams, W, Cuvelier, M, Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 28: 25-30.

Collazos, C, White, P.L., White, M.S., Viñas, E, Alvistur, E, Urquieta, R, Vásquez, J, Días, C, Quiroz, A, Roca, A, Hegsted, D.M., Bradfield, R.B., Herrera, N, Faching, A, Robles, N, Hernándes, E, Arias, M. 1996. Tablas peruanas de composición de alimentos. Ministerio de salud, Instituto Nacional de salud, Segunda edición. Centro nacional de Alimentación y Nutrición.

Davies, F y Albrigo, G. 1994. Cítricos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

Dragovic-Uzelac, V, Levaj, B, Mrkic, V, Bursac, D and Boras, M. 2007. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. Food Chemistry 102 (2007) 966–975.

Gordon, M. 1990. Food antioxidants. Chapter 1. The Mechanism of Antioxidant Action *in vitro*. Elsevier Applied Science London and New York. U.S.A.

Gurrieri, S, Miceli, L, Lanza, M, Tomaselli, F, Bonomo, R and Rizzarelli, E. 2000. Chemical characterization of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) and perspectives for the storage of its juice. J. Agric. Food Chem 48:5424-5431

ICONTEC. 1999, Norma Técnica NTC 4580. Uchuva (*Physalis peruviana*), para el consumo fresco o destinado al procesamiento industrial. Colombia

James, C. 1995. Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic & Professional. London.

Lamghari El Kossori, R, Villaume, C, El Boustani, E, Sauvaire, Y and Mejean, L. 1998. Composition of pulp, skin and seeds of prockly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.) Plant Foods for Human Nutrition. 52: 263-270.

Lee J, Kim H and Jang, Y. 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus indica* var. Saboten. J. Agric. Food Chem. Published on web

Luximon-Ramma, A, Bahorun, T and Crozier, A. 2003. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. Journal of the Science of Food and Agriculture. Volumen 83:496-502

Mayorga H, Knapp H, Winterhalter P and Duque C. 2001. Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) J. Agric. Food Chem 49:1904-1908

Moreno M, Medina C, Antón L, García D y Belén D. 2003. Uso de pulpa de tuna (*Opuntia boldinghii*) en la elaboración de bebidas cítricas pigmentadas. Interciencia. Vol 28. Nº 9. 539-543.

Morín Ch, Salas F y San Martín A. 1985. El cultivo de los cítricos. Departamento de Horticultura. UNALM. Lima-Perú.

National Research Council. 1989. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press, Washington, D.C.

Navarro J, Flores P, Garrido C y Martínez V. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry 96 (2006) 66–73.

Pineda D, Salucci M, Lázaro R, Maiani G y Ferro-Luzzi, A. 1999. Capacidad antioxidante y Potencial de sinergismo entre los principales constituyentes de algunos alimentos. Rev. Cubana Alimentación y Nutrición. 13(2). Páginas: 104-111. Instituto de Nutrición e Higiene de Alimentos-Instituto Nacional de Nutrición de Italia.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical Biology and Medicine. Vol 26: 1231-1237.

Stintzing F, Schieber A, and Carle R. 2003. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. Europe food research technology. Volumen 216:303-311

Swain F and Hillis W. 1959. The phenolic constituents of Prunus domesticus. Journal of the Science of Food and Agriculture. Enero 63-68.

Talcott S and Howard L. 1999. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. Journal of Agricultural and Food Chemestry. Volumen 47 (5): 2109 – 2115

Vinson J, Hao Y, Su X and Zubic L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods. J. Agric. Food Chem. 46: 3630-3634.

Efecto de la crianza sobre lías en botella sobre los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*

Effect of aging on lees in bottle for the *Palomino fino* and *Moscatel of Alexandría* wines

Roldán AM, Palacios, VM, Pérez L

Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente, Facultad de Ciencias
11510 Puerto Real (Cádiz, España)
ana.roldan@uca.es

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en la mejora de los vinos de la "Tierra de Cádiz" (Cádiz, España) aplicando la técnica de envejecimiento sobre lías. Para ello, se partió de vino joven de las variedades *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría*, principales variedades cultivadas en la zona, el cual se sometió a crianza sobre lías en botella durante un tiempo aproximado de un año. Los resultados obtenidos muestran que la variedad influye notablemente en la mayor o menor adaptación de los vinos a la técnica empleada y, por lo tanto, a la mejora o no del producto final. Así, en los vinos de *Palomino fino*, la crianza sobre lías supuso un aumento del contenido en aromas (27.6%), mientras que en los de *Moscatel de Alejandría* se produjo una disminución del 46,3%. Para los vinos de ambas variedades, se produjo una reducción del valor de aroma activo o (VAO) como consecuencia de la reducción y, en muchos casos, desaparición de ésteres, principales contribuyentes al valor de aroma de los vinos blancos jóvenes. El análisis sensorial de los vinos muestra que el contacto prolongado sobre lías mejora la suavidad y la calidad en boca de los vinos debido a la disminución del amargor y la acidez. Sin embargo, tanto la intensidad como la calidad de aroma se vieron afectadas por la desaparición de las notas afrutadas y florales y la aparición de otras, como notas a fruta madura y/o confitada, características de vinos más evolucionados.

La aplicación de dicha técnica y la obtención de resultados favorables dependen de la variedad de uva empleada, de manera que en el caso de los vinos de *Palomino* fino, poco aromáticos, la crianza sobre lías supone una mejora de sus características organolépticas; sin embargo, en los vinos de *Moscatel* de Alejandría, mucho más aromáticos, la reducción de aromas afecta negativamente a su perfil sensorial.

ABSTRACT

The objective of this work consisted on the improvement of the "Tierra de Cádiz" wines (Cádiz, Spain) applying the lees aging technique. For it, young wine of the *Palomino fino* and *Moscatel of Alexandria* varieties, main varieties cultivated in the area of Cádiz, which was subjected to aging on lees in bottle during an approximate time of one year. The obtained results show that the variety influences notably in the biggest or smaller adaptation from the wines to the technique employee and, therefore, to the improvement or not of the final product. So, for *Palomino fino* wines, the aging on lees supposed an increase of the aromas content (27.6%), while for *Moscatel of Alexandria* wines a decrease of 46,3% took place. For the wines of both varieties, a reduction of the value of active aroma takes place or (VAO) as consequence of the reduction and, in many cases, disappearance of esters, main components to the aroma value of the young white wines. The sensorial analysis of wines showed that lingering contact on lees improvement the softness and the quality in mouth of the wines due to the decrease of the bitterness and the acidity. However, as much the intensity as the aroma quality were affected by the disappearance of the fruity and floral notes and the appearance of other, like notes to mature fruit and/or comfits, characteristic of more evolved wines.

The application of this technique and the obtaining of favourable results depend on the grape variety used. So, for Palomino fine wines, not very aromatic, the aging on lees supposed an improvement of their organoleptic characteristics; however, for *Moscatel of Alexandria* wines, much more aromatic, the reduction of aromas affects negatively to its sensorial profile.

PALABRAS CLAVE: *envejecimiento sobre lías, vinos, aromas, levaduras.*

KEYWORDS: *lees aging, wines, aromes, yeasts.*

INTRODUCCIÓN

Durante la fermentación alcohólica, y sobre todo una vez finalizada ésta, en el fondo de los tanques de fermentación se acumulan una serie de partículas sólidas al que llamamos "lías" o "heces". Estos depósitos están formados principalmente por levaduras, sales tartáricas, bacterias y restos vegetales.

Cuando los vinos se dejan en contacto con las lías, especialmente las finas, durante un tiempo prolongado, se modifican determinadas propiedades fisicoquímicas y varía su perfil organoléptico. Esta práctica de envejecimiento o crianza sobre lías (en barrica o en botella), se lleva a cabo de forma tradicional para la elaboración de ciertos tipos de vinos, como es el caso de los vinos de Borgoña y los vinos espumosos tras la segunda fermentación. Sin embargo, en los últimos años se está empleando también en la elaboración de vinos tintos.

El envejecimiento en contacto con las lías produce un enriquecimiento en compuestos nitrogenados (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000; Moreno-Arribas y col. 1996 Guilloux-Benatier y Chassagne 2003), sustancias volátiles (Leroy y col., 1990), lípidos (Pueyo y col. 2000; Martínez-Rodríguez y col., 1999) y manoproteínas (Dupin y col., 2000; Vivas y col., 2003), además de ácidos nucleicos, vitaminas y muchos otros constituyentes celulares (Feuillat y col. 2000; Leroy, 1990). Asimismo se observa que el grado de polimerización de los compuestos nitrogenados disminuye a medida que aumenta el tiempo de contacto con las lías. Luego, las propias enzimas que liberan las levaduras transforman los polímeros en péptidos más pequeños que pueden contribuir al sabor dulce o amargo de los vinos (Martínez-Rodríguez y Polo, 2000).

La liberación de productos de autolisis sucede de manera natural en las etapas finales de la fermentación, una vez que comienza la muerte celular, pero se acentúan en las vinificaciones en que se prolonga la crianza sobre lías resultando una modificación de los caracteres organolépticos de los vinos. Así, según numerosos autores (Ferrari y Feuillat, 1988; Palacios y col., 2002) la fracción afrutada de los vinos se modifica, revelándose algunos aromas más complejos de tipo floral, especiado o terciario así como un aumento de la sensación grasa y la redondez de los vinos. Estas modificaciones van a depender del desfangado y removido periódico o *batonage* (Palacios y col., 2002), tiempo de envejecimiento (Pozo-Bayón y col., 2002; Riu-Aumatell y col., 2006), si el contacto se realiza en madera o en botella, el tipo de levadura usada y, sobre todo, la variedad de uva. Esta última incluso puede predisponer a un vino a someterse o no al contacto con las lías, ya que, desde un punto de vista aromático la técnica de envejecimiento sobre lías puede ser más favorable en el caso de vinos de variedades no aromáticas o neutras, sobre todo para cortos periodos de envejecimiento.

El objetivo de este trabajo consistió en aplicar la técnica de envejecimiento sobre lías en botella para realzar los caracteres organolépticos y mejorar los vinos blancos de la Tierra de Cádiz (Cádiz, España).

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo de trabajo

Para realizar los ensayos sobre lías se partió del vino joven de las variedades *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* una vez terminada la fermentación. Los vinos, una vez separados de sus lías y filtrados fueron embotellados para posteriormente adicionarles sus correspondientes lías en proporción 6-12% con respecto al volumen de vino. Tras dicha adición, se procedió al taponado de las botellas y a su colocación en refrigeración (6°C) manteniéndose en posición horizontal. El contacto entre vinos y lías se favoreció mediante agitación de las botellas cada dos semanas (bâtonnage). Una vez finalizado el período de envejecimiento, se realizó el deslío y filtración de los vinos para someterlos posteriormente al análisis de componentes aromáticos. Como testigo de los vinos tratados se utilizaron los vinos jóvenes una vez desliados y filtrados.

Análisis de compuestos volátiles

Para la determinación de los compuestos volátiles minoritarios (ácidos, terpenos, alcoholes y ésteres) se utilizó un equipo de GC-MM modelo Voyager (Termoquest, Finnigan, Milán, Italia) perteneciente a la División de Espectrometría de masas del Servicio Central de Ciencia y Tecnología de la

Universidad de Cádiz (España). Las condiciones de operación fueron las siguientes: columna Supelcowax 10 (60 m x 0,32 mm ID; 0,50 μm); temperatura del inyector y detector de 250°C; el horno se programó a una temperatura de 40°C (5 min) para después subir hasta 200°C (5 min) con una rampa de 2°C/min. Las condiciones del masas fueron: modo de impacto electrónico (EI+) a 70 eV; temperatura de origen y de la interface fueron 220 y 320°C, respectivamente; índice de barrido de 1 sacan/s; adquisición de masas de 45-400 a.m.u. Dos microlitros de volumen de muestra inyectada en modo splitless (40 s); y He como gas portador (1 mL/min).

Previamente al análisis de las muestras se realizó una extracción en fase sólida de los compuestos de interés mediante cartuchos de tipo DSC-18 de 1 g (6 mL) (SUPELCO, Bellefonte PA, USA) siguiendo la metodología propuesta por Di Stefano (1991) y Valcárcel (2006) con algunas modificaciones.

La identificación de los picos se basó en la comparación de los tiempos de retención y espectros de masa con patrones disponibles de Sigma-Aldrich. En los casos en que los patrones no estaban disponibles, los picos se identificaron por comparación con los datos de espectros del programa Xcalibur (versión 1.1) y con los datos cromatográficos de la bibliografía. Se realizó un análisis semicuantitativo de estos compuestos asumiendo factores de respuesta igual a 1.

Determinación del valor de aroma activo (VAO)

El valor de aroma activo (VAO) se determinó como la relación entre la concentración determinada del compuesto volátil de interés y su umbral de percepción.

A cada componente se le asignó una serie aromática dependiendo de su principal descriptor de olor; para este propósito se escogieron las series floral (F), afrutada (A), herbácea (H), especiada (E), de oxidación (DO), láctica (L) y otros (O), como descriptores para vinos blancos jóvenes en términos de aromas.

Análisis sensorial

La evaluación sensorial de los vinos fue realizado por un panel de seis catadores con experiencia en la sala de catas del Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV, Puerto Real, Cádiz). Los vinos se presentaron, en cada sesión, en copas de cata normalizadas 3591 (ISO 3591, 1997) y cubiertas con vidrio de reloj para minimizar la evaporación de compuestos volátiles. Las catas se realizaron entre las 11:30 h y las 14:00 horas y los vinos estuvieron a una temperatura de 10-12°C.

A cada catador se le proporcionó una ficha de cata específica con la que se puntuaron los caracteres visuales, olfativos y gustativos, considerados de mayor relevancia para este tipo de vinos, así como la valoración global. Cada uno de los caracteres se puntuó de 0 a 5 según la sensación percibida (desde nula a muy fuerte) anotando también algunos aspectos de interés sobre las muestras (determinados aromas, defectos, etc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del envejecimiento sobre lías sobre el contenido en compuestos aromáticos

Como se puede observar en la **Tabla 1**, los vinos de *Palomino fino* sometidos a crianza sobre lías en botella aumentan en un 27,6% su contenido total en aromas, mientras que en los de *Moscatel de Alejandría* se produce reducción de dicho contenido en un 46,3%. Esta diferencia se debe principalmente al contenido en ácidos orgánicos y, concretamente, al ácido decanoico, que en los vinos *Moscatel* envejecidos disminuye en un 99,7%, mientras que en los *Palomino* aumenta junto con el ácido octanoico y 10-undecenoico (91,7, 38,9 y 33,5% respectivamente). Sin embargo, el envejecimiento produce el mismo efecto para el resto de las principales familias aromáticas (terpenos y derivados, alcoholes y ésteres) independientemente del tipo de vino. Así, el contenido de terpenos y derivados y alcoholes disminuyen tras el envejecimiento mientras que el contenido de ésteres aumenta. Resultados similares fueron obtenidos por Bueno y col. (2006) para las variedades *Airén* (neutra) y *Macabeo* (aromática). Mientras en el primer caso el contacto sobre lías fue favorable aumentando la concentración de volátiles, en el caso de la variedad *Macabeo* disminuyó dicha concentración. Luego, la variedad y, principalmente, sus características aromáticas, van a tener gran influencia sobre los resultados obtenidos tras el envejecimiento. Así, para los vinos de las dos variedades estudiadas, los vinos *Palomino* son los más afectados por el envejecimiento, mostrando mayor proporción de ésteres en detrimento de los alcoholes, terpenos y derivados.

Tabla 1. Concentración de compuestos aromáticos (μg/L) en los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* control (TG) y envejecidos sobre lías.

	Palomino fino		*Moscatel de Alejandría*	
	TG	**Lías**	**TG**	**Lías**
ÁCIDOS				
Isovalérico	31.61 ± 2.50	4.88 ± 0.50	6.36 ±0.26	ns
Hexanoico	392.03 ± 4.37	262.29 ± 36.17	400.95 ± 31.95	158.41 ± 27.64
Heptanoico	3.48 ± 1.14	ns	13.64 ± 0.34	ns
Octanoico	971.99 ± 30.35	1590.46 ± 163.23	1443.47 ± 172.34	1368.34 ± 173.69
Decanoico	27.99 ± 10.67	336.23 ± 13.49	1544.69 ± 8.86	4.07 ± 1.10
10-undecenoico	52.84 ± 15.49	199.84 ± 21.73	113.27 ± 1.24	ns
Geránico	241.76 ± 30.88	ns	35.19 ± 4.06	0.25 ± 0.12
Total ácidos	*1721.7 ± 38.50*	*2393.7 ± 188.57*	*3557.58 ± 327.42*	*1531.07 ± 113.00*
TERPENOS Y DERIVADOS				
Linalol	ns	ns	109.91 ± 8.17	201.50 ± 15.51
α-terpineol	ns	ns	78.65 ± 6.83	111.87 ± 20.52
Citronelol	4.12 ± 0.31	ns	50.84 ± 3.01	11.48 ± 0.34
Nerol	ns	ns	10.92 ± 5.02	4.95 ± 0.08
Geraniol	ns	ns	29.33 ± 10.81	21.04 ± 0.44
Trans-óxido de linalol	ns	3.37 ± 0.59	1.89 ± 0.53	5.46 ± 0.06
Cis-óxido de linalol	ns	0.40 ± 0.04	7.18 ± 2.84	7.05 ± 1.26
6,7-dihidro-7-hidroxilinalol	ns	ns	11.46 ± 1.64	22.50 ± 2.13
2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol	24.35 ± 0.73	ns	525.50 ± 109.26	86.02 ± 2.69
3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol)	ns	ns	6.02 ± 1.97	20.25 ± 0.39
2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol	ns	ns	106.31 ± 39.59	8.15 ± 1.80
Total terpenos y derivados	*28.48 ± 0.85*	*3.77 ± 0.63*	*938.00* ± 69.70	*500.25* ± 70.74
ALCOHOLES				
Isohexanol	1.78 ± 0.24	1.78 ± 0.34	ns	0.20 ± 0.06
3-metil-1-pentanol	0.71 ±0.46	0.71 ± 0.13	0.39 ± 0.14	ns
1-hexanol	110.10 ± 6.26	9.67 ± 1.80	12.65 ± 3.44	13.28 ± 3.53
Trans-3-hexen-1-ol	0.96 ± 0.11	ns	ns	0.08 ± 0.02
Cis-3-hexen-1-ol	6.95 ± 0.71	0.37 ± 0.12	0.67 ± 0.66	1.17 ± 0.48
1-octanol	3.18 ± 0.02	ns	2.35 ± 0.40	ns
Alcohol feniletilo	1457.09 ± 32.53	1361.30 ± 126.45	1547.92 ± 115.07	853.14 ± 73.39
Total alcoholes	*1580.78 ± 39.58*	*1373.83 ± 122.46*	*1563.98 ± 127.19*	*867.87 ± 74.50*
ÉSTERES				
Acetato de isoamilo	23.49 ± 2.97	ns	0.78 ± 1.41	0.25 ± 0.18
Acetato de hexilo	2.61 ± 0.38	ns	0.30 ± 0.03	ns
Acetato de fenietilo	83.66 ± 6.09	ns	289.14 ± 60.91	ns
Butirato de etilo	0.53 ± 0.07	ns	ns	0.06 ± 0.02
Hexanoato de etilo	19.76 ± 2.19	0.29 ± 0.56	5.23 ± 2.24	6.09 ± 0.75
Octanoato de etilo	117.89 ± 7.73	65.75 ± 7.03	175.22 ± 17.16	86.75 ± 12.78
Malonato de etilo	0.16 ± 0.03	34.99 ± 2.76	ns	36.22 ± 9.02
Decanoato de etilo	21.21 ± 4.90	251.10 ± 43.33	166.99 ± 39.37	48.59 ± 4.55
Succinato de dietilo	50.81 ± 3.00	1414.59 ± 73.01	67.78 ± 12.99	666.50 ± 123.15
9-decenoato de etilo	82.77 ± 4.51	159.70 ± 29.19	37.11 ± 6.42	20.59 ± 3.77
Cinamato de etilo	4.80 ± 5.98	ns	59.63 ± 15.47	ns
Total ésteres	*407.69 ± 16.74*	*1926.42 ± 7.35*	*802.18 ± 97.83*	*865.05 ± 191.75*
TOTAL AROMAS	**3738.63 ± 72.13**	**5697.72 ± 316.24**	**6861.74 ± 188.04**	**3764.24 ± 44.79**

ns: no se detecta

Este aumento de los ésteres y, sobre todo del succinato de dietilo, puede explicarse según Barre y col. (2000) por dos motivos, el primero que durante el envejecimiento se produce una esterificación lenta de los ácidos grasos presentes en el vino desde el comienzo de la autolisis. Y el segundo, por la

liberación de ácidos grasos de las paredes de las células y posterior esterificación de los mismos rápidamente.

Los compuestos aromáticos más influenciados por el envejecimiento sobre lías (**Tabla 1**) fueron el 2,6-dimetil-3,7-octadien-2,6-diol, el feniletanol, el ácido hexanoico y los ésteres octanoato de etilo y succinato de dietilo. A excepción de este último, en todos los compuestos se observó una disminución de su contenido con el envejecimiento sobre lías, fenómeno también observado por Riu-Aumatell (2005). Según dicha autora, el succinato de dietilo aumenta en función del tiempo de envejecimiento, mientras que los acetatos de isoamilo, feniletilo y hexilo disminuyen. Resultados similares obtienen Pérez-Coello y col., (2003) al conservar vinos en botella durante largos períodos de tiempo a distinta temperatura. Dichos autores señalan que los cambios que tienen lugar tras 2 años de conservación son menores que los que se dan en esos dos primeros años; asimismo, dichos cambios son más importantes si la temperatura de conservación es superior a los 5°C.

Por otra parte, en el caso de los vinos de *Moscatel de Alejandría* disminuyeron también considerablemente el 2,6-dimetil-1,7-octadien-3,6-diol y los ácidos undecenoico y geránico; mientras que en los de *Palomino fino* la disminución de 1-hexanol, ácido octanoico y malonato de dietilo contribuyeron también a la reducción de aromas de estos vinos. Muchos de estos compuestos, como el octanoato y hexanoato de etilo, dada su alta hidrofobicidad, sufren una fijación importante a las manoproteínas (Lubbers y col., 1994), mientras que otros son retenidos por los lípidos de las paredes celulares (Feuillat y col., 2000).

Influencia del envejecimiento sobre lías en botella sobre el perfil aromático de los vinos

Atendiendo a la contribución de las distintas series de aroma al aroma global de los vinos envejecidos sobre lías, y comparándolos con sus correspondientes testigos, en la **Tabla 2** se puede observar que el envejecimiento sobre lías conlleva una disminución de los aromas afrutados siendo ésta mucho mayor en los vinos *Moscatel* (75-90%), mientras que en los vinos *Palomino* no supera el 80% (54-80%). Asimismo, disminuyen las series herbácea (70-84%) y especiada (43-80%). Los aromas florales en cambio, disminuyen en el caso de los vinos *Palomino* (56-87%) y aumentan en los vinos *Moscatel*. (47-117%). Este aumento de los aromas florales en los vinos *Moscatel* se debe al aumento del linalol, a-terpineol, citronelol y geraniol y sus contribuciones al aroma del vino. Barre y col (2000), quienes señalan que el aumento en terpenos se produce lentamente hasta el tercer mes aumentando posteriormente de forma más rápida. Luego, por una parte a la conversión de los derivados de linalol a dichos compuestos terpénicos y por otra a la liberación de enzimas de las paredes celulares capaces de hidrolizar precursores de aromas podrían ser los responsables del aumento de terpenoles en los vinos de *Moscatel*.

La menor contribución de los ésteres al valor de aroma implica también una disminución de la serie afrutada, de ahí que en los vinos envejecidos sobre lías este fenómeno sea uno de los más relevantes. La menor contribución del octanoato de etilo al valor de aroma de dicha serie así como la desaparición de los acetatos de feniletilo e isoamilo y el cinamato de etilo, son los factores que más van a marcar las características organolépticas del producto envejecido sobre lías disminuyendo considerablemente las características de afrutado Este fenómeno también parece tener lugar en vinos conservados en botella durante 1 ó 2 años perdiendo su carácter afrutado e incluso el floral (Pérez-Coello y col., 2003).

Influencia del envejecimiento sobre lías en botella sobre las características sensoriales

Como se puede observar en la **Figura 1**, independientemente de la variedad, el contacto prolongado sobre lías modifica ligeramente el perfil sensorial de los vinos de manera que, aumenta levemente la intensidad de color tomando una coloración típica de vinos ligeramente oxidados. Asimismo, aumentan la suavidad y la calidez en boca debido principalmente a la disminución de acidez y amargor.

Desde el punto de vista aromático, disminuyen considerablemente la intensidad y calidad de aroma. Al igual que ocurre con los vinos conservados durante tiempos prolongados en botella, con el contacto sobre lías se produce una pérdida de los aromas afrutados y florales percibiéndose un vino más evolucionado, con notas a fruta madura, confitada en el caso de los vinos *Moscatel*. De forma general, disminuye la valoración global de los vinos tras el envejecimiento prolongado sobre lías.

Tabla 2. Valores de aroma activos para los vinos *Palomino fino* y *Moscatel de Alejandría* control (TG) y envejecidos sobre lías.

	Palomino fino		*Moscatel de Alejandría*		
	TG	**Lías**	**TG**	**Lías**	
ACIDOS					
Isovalérico	0,958 ±0,001	0,148 ± 0,015	0,193 ± 0,008	-	L
Hexanoico	0,933 ± 0,010	0,625 ± 0,086	0,955 ± 0,076	0,377 ± 0,066	H
Octanoico	1,944 ± 0,061	3,181 ± 0,326	2,887 ± 0,345	2,737 ± 0,347	L
Decanoico	0,028 ± 0,011	0,336 ± 0,013	1,545 ± 0,009	0,004 ± 0,001	DO
Total ácidos	***2,908 ± 0,061***	***4,142 ± 0,326***	***3,842 ± 0,345***	***3,118 ± 0,347***	
TERPENOS					
Linalool	-	-	7,327 ± 0,545	13,433 ± 1,034	F
a-terpineol	-	-	0,315 ± 0,027	0,447 ± 0,082	F
Citronelol	0,041 ± 0,003	-	0,508 ± 0,030	0,115 ± 0,003	F
Nerol	-	-	0,022 ± 0,010	0,010 ± 0,000	F
Geraniol	-	-	0,978 ± 0,360	0,701 ± 0,015	F
3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (hotrienol)	-	-	0,055 ± 0,018	0,184 ± 0,003	F
Trans-óxido de linalol	-	0,561 ± 0,098	0,314 ± 0,088	0,909 ± 0,010	F
Cis-óxido de linalol	-	0,066 ± 0,007	1,196 ± 0,473	1,175 ± 0,210	F
Total terpenos	***0,041 ± 0,003***	***0,627 ± 0,098***	***10,715 ± 0,545***	***16,975 ± 1,034***	
ALCOHOLES					
1-hexanol	0,011 ± 0,006	0,009 ± 0,002	0,012 ± 0,003	0,012 ± 0,003	H
cis-3-hexen-1-ol	0,017 ± 0,002	-	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,001	H
Alcohol feniletilo	0,146 ± 0,003	0,136 ± 0,013	0,155 ± 0,012	0,085 ± 0,007	F
Total alcoholes	***0,177 ± 0,006***	***0,145 ± 0,013***	***0,168 ± 0,012***	***0,100 ± 0,007***	
ÉSTERES					
Butirato de etilo	0,026 ± 0,004	-	-	0,003 ± 0,001	A
Acetato de isoamilo	0,783 ± 0,099	-	0,026 ± 0,047	0,008 ± 0,006	A
Hexanotato de etilo	3,952 ± 0,438	0,057 ± 0,112	1,047 ± 0,448	1,218 ± 0,150	A
Octanoato de etilo	23,578 ± 1,546	13,150 ± 1,406	35,044 ± 3,432	17,350 ± 2,556	A
Decanoato de etilo	0,106 ± 0,025	1,256 ± 0,217	0,835 ± 0,197	0,243 ± 0,023	A
Succinato de dietilo	0,042 ± 0,003	1,179 ± 0,061	0,056 ± 0,011	0,555 ± 0,103	A
Pentanoato de etilo	0,169 ± 0,010	-	-	-	A
Acetato de feniletilo	0,335 ± 0,024	-	1,156 ± 0,244	-	A
Laurato de etilo	-	-	0,128 ± 0,033	-	H
Cinamato de etilo	4,800 ± 5,980	-	59,627 ± 15,470	-	A
Total ésteres	***33,792 ± 5,980***	***15,642 ± 1,406***	***97,920 ± 15,470***	***19,385 ± 2,556***	
ΣVAOS	**38,700 ± 5,980**	**20,556 ± 1,406**	**112,645 ± 15,470**	**39,578 ± 2,556**	

L: lácteo, H: herbáceo, E: especiado; F: floral; A: afrutado; DO: de oxidación

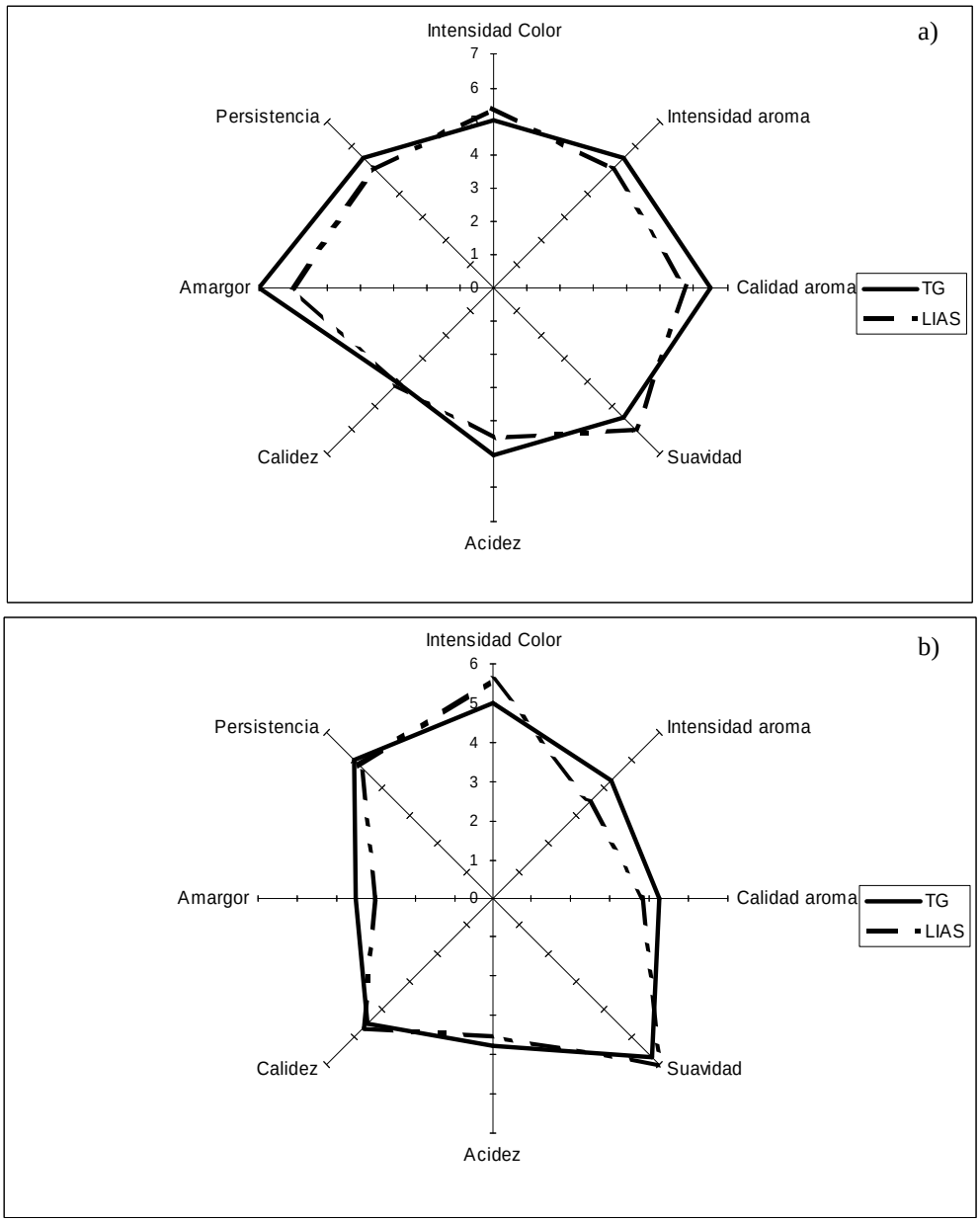


Figura 1. Análisis sensorial comparativo entre los vinos control (TG) y de contacto sobre lías de las variedades *Palomino fino* (a) y *Moscatel de Alejandría* (b)

CONCLUSIONES

La aplicación de dicha técnica y la obtención de resultados favorables dependen de la variedad de uva, de manera que en el caso de los vinos de *Palomino fino*, poco aromáticos, la crianza sobre lías mejora las características aromáticas de los mismos; sin embargo, en los vinos de *Moscatel de Alejandría*, mucho más aromáticos, la reducción de aromas, y sobre todo los afrutados, afecta negativamente al perfil sensorial de los mismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barre P, Blondin B, Dequin S, Feuillat M, Sablayrolles JM, Salmon JM. 2000. La levadura de fermentación alcohólica. En Flanzy, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, pag. 245-273.

Bueno JE, Peinado RA, Medina M. 2006. Effect of a short time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. Biotechnology Leter, 28:1007-1011.

Di Stefano R. 1991. Proposition d'une méthode de préparation de l'echantillon pour la détermination des terpènes libres et glycosides des raisins et des vins. Bull. OIV, 721-722:219-223.

Dupin IVS, Mckinnon BM, Ryan C, Boulay M, Markides A, Jones GP, Williams PJ, Waters EJ. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins than protect wines from protein haze: their release during fermenttion and lees contact and proposal for their mechanism of action. Journal of Agricultural and Food Chem., 48:3098-3105.

Ferrari G, Feuillat M. 1988. L'élevage sur lies des vins blancs de Bourgogne; 1ère partie: Étude des composés azotés, des acides gras et analyse sensorielle des vins. Vitis 28: 161-193.

Feuillat M, Lubbers S, Vernhet A. 2000. Coloides. Interacciones moleculares. En Flanzy, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Madrid. AMV Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa, pag. 377-389.

Guilloux-Benatier M, Chassagne D. 2003. Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51:746-751.

Leroy MJ, Charpentier M, Dutreurte B, Feuillat M, Charpentier C. 1990. Yeast autolysis during champagne aging. American Journal of Enology and Viticulture, 41, 21-28.

Lubbers S, Charpentier C, Feuillat M. 1996. Etude de la rétention de composés d'arôme par les bentonites en moût, vin et milieux modèles. Vitis, 35:59-62.

Martínez-Rodríguez A, Bartolomé B, Santa-María G, Polo MC, Pueyo E. 1999. Separación y cuantificación por HPLC de lípidos liberados durante la autolisis de levaduras vínicas. Jornadas Científicas 99, Grupos de Investigación Enológica, Zaragoza, pp.98.

Martínez-Rodríguez A, Polo MC. 2000. Characterization of the nitrogen compounds released during yeast autolysis in a model wine system. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48:1081-1085.

Moreno-Arribas V, Puedo E, Polo MC. 1996. Peptides in musas and wines . Changes during the manufacture of cavas (Sparkling wines). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44, 3783-3788.

Palacios A, Losada MM, Santiago L, García-Noblejas V. 2002. Influencia de distintas metodologías de elaboración de vinos blancos *Verdejo* en la fracción aromática. III Foro Mundial del vino. Rioja III Milenio. Trabajo nº 43, La Rioja.

Pérez-Coello MS, González-Viñas MA, García-Romero E, Díaz-Maroto MC, Cabezudo MD. 2003. Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. Food Control, 14 (5): 301-306.

Pozo-Bayón MA, Pueyo E, Martín-Álvarez PJ, Polo MC. 2002. Estudio de la influencia de distintas variables tecnológicas en los compuestos volátiles de vinos espumosos elaborados con variedades de uva blancas y tintas. III Foro Mundial del vino. Rioja III Milenio. Trabajo nº 31, La Rioja.

Pueyo E, Martínez-Rodríguez A, Polo MC, Santa-María G, Bartolomé B. 2000. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48:116-122.

Riu-Aumatell M, Bosch-Fusté J, López-Tamames E, Buxaderas S. 2006. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. Food Chemistry, 95(2):327-342.

Valcárcel MC. 2006. Incidencia de técnicas vitícolas y enológicas en el potencial aromático de variedades de vid en clima cálido. PhD. Thesis, Cádiz University, Spain.

Vivas N, Nedjma M, Álvarez JM. 2003. Los fenómenos coloidales y el afinado de los vinos. ACE Revista de Enología, nº 31.

Descriptores de aroma y gusto de mieles orgánicas producidas en la provincia de Santa Fe

Flavour descriptors in organic produced honey from the Province of Santa Fe

Sabbag NG(1), Gaggiotti M(2), Wanzenried R(2), Cuatrín A(2), Costa SC(1)

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina
(2) INTA Estación Experimental Rafaela, Santa Fe, Argentina
nsabbag@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar los descriptores de aroma y gusto que mejor discriminan muestras de miel orgánica, producidas en tres regiones bien diferenciadas de la provincia de Santa Fe, región centro-norte, montes nativos del norte e islas del río Paraná. Según la procedencia, las muestras fueron clasificadas como miel de pradera, monte e isla, respectivamente. Un panel de 13 evaluadores entrenados realizó la descripción cualitativa del aroma y el gusto de muestras de miel tomadas de la producción 2006-2007, utilizando una lista de 30 descriptores propuestos inicialmente. Para conocer los descriptores que mejor discriminan las muestras se aplicó análisis discriminante lineal. La frecuencia de uso de los distintos términos permitió, por "asociación" entre descriptores y "recuerdo" de otras sustancias, reducir la nómina a 14 descriptores para aroma y 19 para gusto. La frecuencia de uso de descriptores de aroma se orientó a panal (33,42 %), perfumado (15,76%) y jarabe/azúcar acaramelada (13,86 %) para miel de pradera; hierba fresca (15,40 %), perfumado (22,29 %), hojas secas (13,58 %), ácido/cítrico (12,01 %) y jarabe dulce (9,66 %) para miel de monte; madera (19,46 %), ácido/cítrico (10,97 %), perfumado (10,97 %) para miel de isla. Entre los términos utilizados para describir el gusto de estas muestras, se destacan panal (19,87 %), perfumado (14,10 %), jarabe dulce (21,79 %) y ácido/cítrico (22,86 %) para miel de pradera; perfumado (22,06 %), ácido/cítrico (28,07 %), jarabe dulce (24,06 %) para miel de monte; madera (8,20 %), ácido/cítrico (16,5 %), jarabe dulce (36,90 %) y fresco/mentolado (13,73 %) para miel de isla. Del análisis discriminante se obtuvo que el 100 % de las muestras evaluadas clasificó correctamente, tanto para aroma como para gusto. La primera función discriminante contempla el 77 % de variabilidad de las muestras para aroma y el 75 % para gusto, discriminando perfectamente las mieles de pradera de las de monte e isla. Una segunda función separa las mieles de monte de las mieles de isla, quedando finalmente calificadas las mieles de pradera con aroma a panal, picante y gusto frutal, perfumado; las mieles de monte con aroma a hierbas y gusto ácido en tanto las mieles de isla fueron calificadas con aroma a quemado y gusto a frutas disecadas. De los resultados obtenidos se concluye que es posible contar con descriptores específicos de aroma y gusto, determinando a partir se ellos los que mejor discriminan las muestras, para los tres tipos de miel evaluadas. Se destaca además la eficiencia de la función discriminante como herramienta para caracterizar sensorialmente la miel, constituyendo un aporte importante para el sector.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to determine the descriptors of aroma and taste that better samples of organic honey discriminate, produced in three regions affluent differentiated from the province of Santa Fe, region center-north, native mount of the north and islands of the Parana river. According to the origin, the samples were classified like prairie honey, mounts and island, respectively. A panel of 13 trained members made the qualitative description of the aroma and the taste of samples of honey taken from production 2006-2007, using a list of 30 descriptors proposed initially. In order to know description that better discriminates the samples linear discriminant analysis was applied. The frequency of use of the different terms allowed, by "association" between descriptors and "memory" of other substances, to reduce the list to 14 descriptors for aroma and 19 for taste. The frequency of use of descriptors of aroma was oriented to honeycomb (33,42 %), perfumed (15,76%) and carameled syrup/sugar (15,76%) for prairie honey; fresh grass (15,40 %), perfumed (22,29 %),

para miel de isla., dry leaves (13,58 %), citric acid (12,01 %) and sweet nyrup (9,66 %) for mount honey; wood (19,46 %), citric acid (10,97 %), perfumed (10,97 %) for honey of island. Between the used terms to describe the taste of these samples, they stand out honeycomb (19,87 %), perfumed (14,10 %), sweet syrup (21,79 %) and citric acid (22,86 %) for prairie honey; perfumed (22,06 %), citric acid (28,07 %), sweet syrup (24,06 %) for mount honey; wood (8,20 %), citric acid (16,5 %), sweet syrup (36,90 %) and fresh/mentolate (13,73 %) for honey of island. From the discriminant analysis it was obtained as much that 100% of the evaluated samples classified correctly, for aroma as for taste. The first discriminant function perfectly contemplates to 77% of variability of the samples for aroma and 75% for taste, discriminating the honeys of prairie of those of mount and island. One second function separates the mount honeys of the honeys of island, being finally described the honeys as prairie with aroma to honeycomb, sharp and fruit taste, perfumed; the mount honeys with aroma to grass and acid taste in as much the honeys of island were described with aroma to burned and taste to dissected fruits. Of the obtained results one concludes that it is possible to count on description specific of aroma and taste, determining to divide they those that better discriminate the samples, for the three evaluated types of honey. The efficiency to the discriminante function like tool stands out in addition to characterize the honey sensorially, constituting an important contribution for the sector.

PALABRAS CLAVE: *miel orgánica-evaluación sensorial-análisis discriminante.*

KEYWORDS: *honey organic-sensorial evaluation-discriminant analysis.*

INTRODUCCIÓN

La miel es un producto natural con características sensoriales variables debido al orígen y a la diversidad de constituyentes (Gonnet y Vache 1973, Persano *et al.* 1995), aspecto este de suma importancia para su comercialización. Al trabajo realizado por Gonzalez y Lorenzo (2002a) y Gonzalez y Lorenzo (2002b) acerca del color, gustos básicos y atributos de textura de las mieles procedentes de la región del centro de España, se suma la descripción del aroma de la miel de India realizada por Anupama *et al.* 2003. No obstante, los resultados no proveen información que pueda ser completamente aplicable a las mieles producidas en nuestro país. Se hace necesario entonces desarrollar el perfil sensorial de las mieles asociado al orígen botánico y a la composición fisicoquímica de las mismas.

La competitividad alcanzada por las mieles argentinas en el mercado internacional ha orientado la producción hacia mieles monoflorales, y más aún, hacia mieles orgánicas, es decir mieles cuya producción se realiza bajo condiciones controladas, con una exportación mensual de aproximadamente 40 tm. Entre las mieles de este tipo que se producen en la Provincia de Santa Fe se destacan las que proceden de la región centro-norte identificadas como miel de pradera, las que se producen en los montes nativos del norte de la provincia identificadas como miel de monte, y las que se originan en las islas del río Paraná identificadas como miel de isla. Las familias botánicas encontradas en mayor proporción en las mieles de pradera y de monte son *leguminosas y asteráceas* mientras que en la miel de isla, las familias botánicas encontradas en mayor proporción son *asteráceas y anacardiaceas* (datos no publicados).

En este contexto, el conocimiento de aquellas propiedades sensoriales que mejor impactan a los consumidores, se constituye en una contribución muy importante a la caracterización de la miel por su origen botánico. Desde 1998 la Dirección de Ecología del Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe, inició trabajos tendientes a caracterizar las mieles producidas en la provincia, contribuyendo de ese modo a la tipificación global de las mieles que se producen en el país y permitiendo que las mismas ocupen un lugar diferencial en el mercado internacional, con precios diferenciados.

Argentina produce una gran variedad de mieles que es necesario caracterizar sensorialmente con el propósito de valorizarlas unas respecto de otras. Tener un perfil completo de todas ellas demanda tiempo y trabajo ya que se debe reunir información sobre localidades de origen, época del año en que se realiza la producción, condiciones climáticas, las propiedades químicas, físicas, sensoriales y polínicas, en tantas producciones como sean posibles y necesarias para que la información producida pueda ser extrapolada con el adecuado sustento estadístico.

En ese marco el objetivo de este trabajo fue determinar los descriptores de aroma y gusto que caracterizan y discriminan muestras de miel orgánica, producidas en tres regiones de la provincia de Santa Fe, estableciendo metodologías de ensayo sensorial como complemento de las actividades relacionadas con los estudios palinológico y fisicoquímico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de miel orgánica

Se trabajó con dieciocho muestras de miel de pradera (procedentes de la región centro-norte), once muestras de miel de monte (producidas en los montes nativos del norte de la provincia) y trece muestras de miel de isla (originarias de las islas del río Paraná), todas producidas en forma orgánica en la provincia de Santa Fe durante la campaña 2006-2007.

Análisis sensorial

Se aplicó Análisis Descriptivo con un panel integrado por 13 evaluadores entrenados en la metodología de trabajo (ISO 8586-1 1993), utilizando una lista de 30 descriptores de aroma y gusto propuestos inicialmente. La evaluación se realizó en cabinas individuales, en una sala ambientada al efecto. Las muestras fueron presentadas en envases de polipropileno de alta transparencia de 38 mm x 65 mm, con tapa a rosca de aluminio y 60 ml de capacidad, guardando adecuada relación muestra-espacio de cabeza para asegurar la homogenización de los componentes del aroma. Como neutralizante se utilizó miga de pan fresco y agua para enjuagar la boca. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Los grupos de descriptores de aroma y gusto utilizados se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Nómina de Descriptores propuestos.

AROMA	GUSTO
Cera	Cera
Panal	Panal
Cereal	Limón
Afrecho	Naranja
Perfumado	Frutal
Floral	Ácido
Vela perfumada	Cáscara de naranja
Azahar	Fruta fresca
Jazmín	Amargo
Medicamento	Caramelo
Químico	Dulce
Eucaliptos	Jarabe
Salvaje	Mermelada
Campo	Perfumado
Bosta	Floral
Yuyo	Remedio
Campo	Astringente
Hoja ceca	Mentolado
Hierbas	Eucaliptus
Pasto	Anis
Pasto mojado	Picante
Húmedo	Fruta pasada
Viejo	Mosto
Madera húmeda	Fermentado
Madera fresca	Alcohol
Quemado	Canela
Azúcar quemado	Campo
Azúcar tostado	
Resina	
Madera quemada	
Ahumado	
Humo de madera	
Incienso	
Goma quemada	
Dulce	
Caramelo	
Azúcar acaramelada	
Almíbar	
Caramelo frutal	
Melaza	
Limón	
Ácido	
Cítrico	
Picante	
Astringente	
Tabaco	

Análisis de los resultados

En todos los casos se determinó el promedio de la frecuencia de uso de los términos utilizados dentro de la nómina propuesta.

Análisis estadístico

Se realizó un Análisis Discriminante Lineal para examinar cuales eran las variables relacionadas al gusto y al aroma que permiten discriminar las mieles según el origen analizado. Para ello se utilizó el software InfoStat, versión 2008, tomando 29 grados de libertad de la matriz de covarianza. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La frecuencia de uso de los distintos términos permitió, tanto por "asociación" entre descriptores como por "recuerdo" de otras sustancias, reducir finalmente la nómina de los mismos a siete descriptores para aroma y seis para gusto, tal como se aprecia en las **Tablas 2** y **3**. Considerando los descriptores que se dieron con una frecuencia de uso superior al 15 %, se puede apreciar que en los tres grupos de muestras analizados, para aroma fueron panal, perfumado, hierba fresca y madera, en tanto que para gusto fueron panal, perfumado, jarabe/dulce y ácido cítrico.

Tabla 2. Frecuencia porcentual promedio de descriptores de aroma.

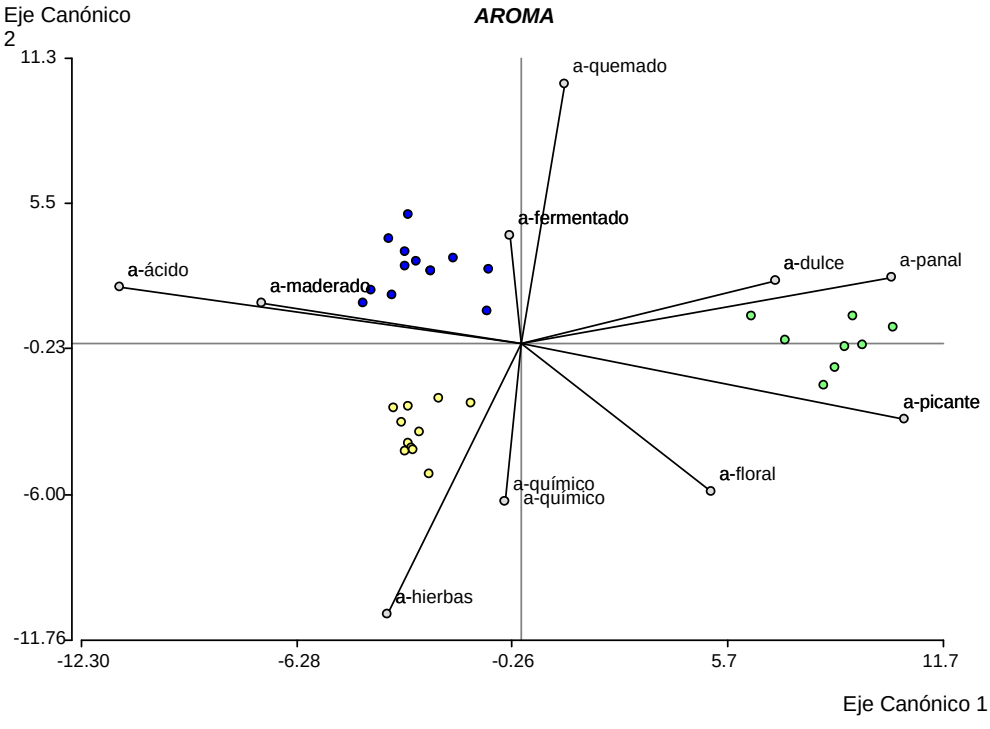
Descriptores	Miel de Pradera (%)	Miel de Monte (%)	Miel de Isla (%)
Panal	33,42		
Perfumado	15,76	22,29	10,97
Jarabe/Dulce	13,86	9,66	
Hierba fresca		15,40	
Hojas secas		13,58	
Acido Cítrico		12,01	10,97
Madera			19,46

Tabla 3. Frecuencia porcentual de descriptores de gusto

Descriptores	Miel de Pradera (%)	Miel de Monte (%)	Miel de Isla (%)
Panal	19,87		
Perfumado	14,10	22,06	
Jarabe/Dulce	21,79	24,06	36,90
Acido Cítrico	22,86	28,07	16,58
Madera			8,20
Fresco/Mentolado			13,73

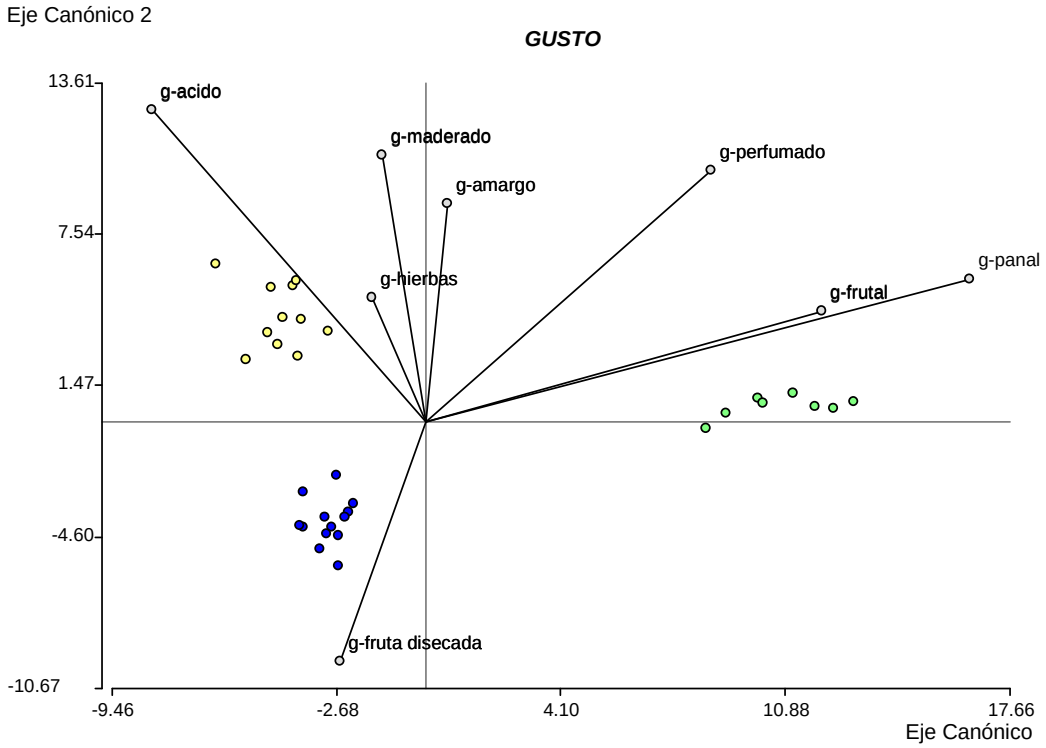
Considerando cada tipo de miel vemos que la de pradera se caracteriza por presentar principalmente aroma a panal y gusto a ácido cítrico, siendo poco perfumadas. En cambio la miel de monte se caracteriza por presentar aroma perfumado y gusto a ácido cítrico. Por su parte, la miel de isla se caracteriza por su aroma a madera y gusto a jarabe/dulce.

Del Análisis Discriminante realizado con todos los descriptores utilizados por el panel se obtuvo que el 100 % de las muestras evaluadas clasificó correctamente, tanto para aroma como para gusto. La primera función discriminante contempla el 77 % de la variabilidad de las muestras para aroma y el 75 % para gusto, separando las mieles de pradera de las de monte e isla. Una segunda función discriminante separa estas últimas quedando claramente identificados los descriptores de aroma y gusto que mejor describen los tres tipos de mieles orgánicas analizadas (**Figuras 1** y **2**). Las mieles de pradera clasificaron con aroma a panal, picante, muy poco ácido y gusto a panal, frutal y perfumado. En cambio, en las mieles de monte predomina el aroma a hierbas y gusto a ácido, en oposición a las de isla en las que predomina el aroma a quemado y el gusto a frutas disecadas.



Círculos verdes corresponden a las muestras de miel de pradera.
Círculos amarillos corresponden a las muestras de miel de monte.
Círculos azules corresponden a las muestras de miel de isla.

Figura 1. Gráfico descriminante de muestras y descriptores de aroma.



Círculos verdes corresponden a las muestras de miel de pradera.
Círculos amarillos corresponden a las muestras de miel de monte.
Círculos azules corresponden a las muestras de miel de isla.

Figura 2. Gráfico descriminante de muestras y descriptores de gusto.

Se puede apreciar que si bien la frecuencia de uso de los términos propuestos nos permite definir las muestras mediante determinados descriptores de aroma y gusto, no significa que estos sean los que marcan las diferencias entre ellas, es decir, que los descriptores que mejor discriminan las muestras no necesariamente son los que mejor las describen.

CONCLUSIONES

Los términos con mayor frecuencia de uso permitieron, en principio, diferenciar el aroma y gusto de los tres tipos de miel, y a través del análisis discriminante se determinaron los descriptores con mayor peso en la discriminación de las muestras, contribuyendo así a la caracterización sensorial de las mismas.

AGRADECIMIENTO

Al panel de evaluación sensorial del Instituto de Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería Química–UNL, Santa Fe – Argentina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anupama D, Bhat KK and Sapna VK. 2003. Sensory and physical-chemical of commercial samples of honey. Food Research International, 36: 1983–1991.

Gonnet M and Vache G. 1973. El sabor de la miel. Apimondia-Bucarest.

Gonzalez M and de Lorenzo C. 2002a. Calidad Sensorial de las mieles de Madrid: (I) Configuración de un grupo de cata y obtención de escalas normalizadas. Alimentaria, 97: 97–102.

Gonzalez M and de Lorenzo C. 2002b. Calidad Sensorial de las mieles de Madrid: (II) Correlación con el análisis instrumental. Alimentaria, 103: 103–109.

ISO 8586-1. 1993. Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.

Johnson, D.E. 2004. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. International Thomson Publishing.

Morrison, D.F. 1976. Multivariate statistical methods McGraw-Hill Book Company.

Persano *et al*. 1995. Conoscere il miele. Guida all'analisis sensoriale. Avenue Media.

Actividad de Lipoxigenasas de nueces (*Junglans regia*) y almendras (*Prunus dulcis*)

Lipoxygenases activities of walnuts (*Junglans regia*) and almonds (*Prunus dulcis*)

Salcedo CL, López de Mishima BA, Nazareno MA

INQUINOA, CONICET - Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina
nazareno@unse.edu.ar

RESUMEN

Las lipoxigenasas (LOX) son un grupo de metaloproteínas, dioxigenasas no-hemo, que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, animales, hongos y algunas bacterias que juegan un importante rol en el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados ya que catalizan la incorporación de oxígeno molecular en los ácidos grasos que contienen unidades 1,4-pentadieno produciendo hidroperóxidos como producto. Aunque existe mucha literatura acerca de LOX vegetales, siendo la enzima de soja la más estudiada, no hay demasiada información acerca de sus homólogas de nuez y almendra. En este trabajo se propuso investigar la actividad de LOX de nuez y almendra y comparar su reactividad con la enzima de soja. Las proteínas se clasifican en base a su solubilidad en cinco grupos principales denominados *albúminas* (solubles en agua), *globulinas* (solubles en soluciones salinas), *prolaminas* (solubles en soluciones alcohólicas al 70%), *glutelinas-1* (solubles en ácido), y *glutelinas-2* (solubles en álcali). Las proteínas más numerosas en soja son las globulinas, las cuales representan el 80% del total de las proteínas, entre las cuales se encuentran las enzimas LOX. Las nueces (*Junglans regia*) y almendras (*Prunus dulcis*) adquiridas en un mercado local fueron cortadas, peladas y pulverizadas utilizando un molino eléctrico y un mortero. El contenido de proteína soluble total fue determinado por el método colorimétrico de Bradford, donde la absorbancia fue medida a 595 nm. Solución de albúmina de suero bobino fue utilizada como proteína hidrosoluble de referencia para la curva de calibración y los resultados fueron expresados en mg de proteína por g de nuez (mg/g), siendo de 60.3 mg/g para nuez y de 99.3 mg/g para almendra. El aislamiento de LOX de soja fue realizado por precipitación con sulfato de amonio y cloruro de calcio, mientras que las enzimas de nuez y almendra fueron aisladas sólo mediante precipitación por cloruro de calcio.

La acción enzimática prooxidante fue determinada por medio de un análisis espectrofotométrico a 234 nm basado en la formación de dienos conjugados de hidroperóxidos del ácido linoleico (AL), reacción que fue inducida enzimáticamente. La solución de referencia de LOX para las mediciones de actividad fue la Lipoxidasa de soja tipo I-B. La actividad enzimática determinada espectrofotométricamente fue expresada en unidades de enzima por mg de muestra (U/mg). Los valores de esta determinación fueron en nueces de 9.5 U/mg, en almendras de 24.75 U/mg, mientras que en soja fue considerablemente superior, con un valor de 78.5 U/mg. El fraccionamiento en grupos proteicos fue llevado a cabo utilizando diferentes solventes de acuerdo a su solubilidad, y el contenido de cada fracción fue determinado por el método colorimétrico de Bradford. Las globulinas constituyen la mayor fracción proteica en soja, siendo por el contrario constituyentes proteicos menores en nuez y almendra. De acuerdo a los resultados correspondientes a este trabajo, la gran diferencia encontrada entre la actividad que presentan los frutos secos con respecto a la soja se debe al hecho que las LOX se encuentran en cantidades significativamente menores.

ABSTRACT

Lipoxygenases (LOX) are a group of non-heme, iron dioxygenases that are widely distributed throughout plants, animals, fungi and some bacteria that play a major role in polyunsaturated fatty acid metabolism because they catalyze the incorporation of molecular oxygen into fatty acids containing a 1,4-pentadiene moiety producing hydroperoxide products. Although many reports about plant lipoxygenases are found in the literature, being the soybean LOX the most studied, there is not enough information about walnut and almond LOX activity. In this work we proposed to investigate walnut

and almond LOX activities and compare their reactivity with that of soybean enzyme. Proteins are classified by their solubility into five main groups namely *albumins* (water soluble), *globulins* (dilute salt soluble), *prolamins* (70% aqueous alcohol soluble), *glutelins-1* (acid soluble), and *glutelins-2* (alkali soluble). The major proteins in soybean are globulins which represent 80% of total proteins, among which are LOX enzymes. Walnuts (*Junglans regia*) and almonds (*Prunus dulcis*) purchased from local market were cracked, shelled and powdered using an electric mill and a mortar. Soluble protein total content determination was performed by Bradford colorimetric method, where absorbance was measured at 595 nm. Albumin bovine serum was use as a reference water hydrosoluble protein for the calibration curve and the results were expressed in mg of protein per g of nut (mg/g), being 60.3 mg/g in walnut and 99.3 mg/g in almond. Protein group fractionation was performed by using different solvents according to their solubility and subsequently, protein content of each fraction was determined by Bradford colorimetric method. Globulins constitute the higher protein fraction in soybean, while, on the contrary, they are minor protein constituents in walnuts and almonds. Isolation of soybean LOX was performed by ammonium sulphate followed by calcium chloride fractionation, while the walnut and almond enzymes were isolated only by calcium chloride fractionation. Prooxidant enzymatic action was determined by an spectrophotometric analysis at 234 nm based in conjugated hydroperoxides-diene formation of linoleic acid in its oxidation reaction enzymatically induced. Reference solution for LOX activity measurements was commercial Soybean Lipoxydase type I-B. Enzymatic activity was expressed by enzyme unities by mg of sample (U/mg). The values of this determination were 9.5 U/mg in walnuts, 24.75 U/mg in almonds, while in soybean was considerably higher, with a value of 78.5 U/mg. According to results obtained in this work, the great difference found among the activity that present nuts respect to soybean, is due to the fact that LOX are in significantly lower levels.

PALABRAS CLAVE: *Lipoxigenasa, oxidación, lípidos insaturados, actividad enzimática.*

KEYWORDS: *Lipoxygenase, oxidation, unsaturated lipids, enzymatic activity.*

INTRODUCCIÓN

Las nueces y almendras son alimentos vegetales valiosos desde el punto de vista nutricional, ya que constituyen una importante fuente de proteínas, fibra dietaria, micronutrientes tales como minerales, vitaminas, esteroles, pigmentos, tocoferoles y principalmente lípidos de elevado valor biológico (Kris-Etherton et al. 2001). Éstos están constituidos principalmente por triglicéridos de ácidos grasos insaturados, altamente susceptibles a sufrir reacciones de oxidación inducidas por factores exógenos como tratamientos térmicos y presencia de oxígeno de la atmósfera de almacenamiento, además de factores endógenos entre los cuales se encuentran enzimas oxidativas como Lipoxigenasas (LOX). Estas enzimas poseen la capacidad de catalizar la oxidación de ácidos grasos que presentan en su estructura unidades *cis*,*cis*-1,4-pentadieno dando como productos hidroperóxidos con sistemas de dienos conjugados (Robinson et al. 1995). Estas enzimas se encuentran presentes tanto en el reino vegetal como en el animal. Su activación normalmente se produce con una disrupción del tejido vegetal, donde enzimas lipasas catalizan la liberación de ácidos grasos sobre los cuales la enzima LOX actúa iniciando la reacción de peroxidación lipídica (López-Nicolás et al. 2001). Incluso cuando las LOX no son activadas, la oxidación de lípidos puede ocurrir mediante un proceso de auto-oxidación originando hidroperóxidos como productos de la oxidación primaria. Las reacciones de oxidación son responsables de alteraciones organolépticas y nutricionales por la formación de compuestos volátiles a partir de la desaparición de ácidos grasos esenciales y posterior degradación de hidroperóxidos.

Existen numerosas investigaciones acerca de LOX vegetales tales como las provenientes de porotos, berenjenas, chauchas, maíz, tomates, aceitunas y soja entre otras (Yoshie-Stark y Wasche 2004), sin embargo su rol fisiológico no está, hasta la fecha, totalmente claro (Ridolfi et al. 2002). En numerosos vegetales como es el caso de las legumbres, las LOX cumplen funciones de reserva. La enzima LOX más estudiada es la de soja, que pertenece al grupo de las globulinas, la mayor fracción proteica de acuerdo a la clasificación de las proteínas basada en sus solubilidades, las cuales representan el 80% del total de las proteínas. En base a sus constantes de sedimentación a pH 7.6 y 0.5 de fuerza iónica, las globulinas se clasifican en 11S (glicininas) y 7S (conglicininas), (Fukushima, 1991).

El ácido linoleico (AL) es un ácido graso di-insaturado presente en nueces en un 59.79% y en un 29.21% en almendras (Venkatachalam y Sathe 2006), siendo el ácido graso modelo para los estudios de actividad enzimática.
Los principales objetivos de este trabajo fueron investigar la presencia de LOX en nueces y almendras, para determinar sus actividades pro-oxidantes frente a AL comparándolas con la enzima de soja utilizada como referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado a temperatura ambiente (25±1°C).
Las nueces y almendras fueron adquiridas en comercios locales.
Las determinaciones de proteínas solubles y de actividad enzimática se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV/Vis-2 UNICAM.
El procesamiento de los datos y los ajustes de las gráficas fue realizado mediante el uso del programa Origin 8.

Contenido de proteínas soluble totales

La solución colorante para la determinación de proteínas fue preparada por dilución de 12 mg de Comassie Blue Brillant G-250 (CBBG) en 10 ml de etanol absoluto con 3% de solución de ácido perclórico hasta un volumen final de 200 ml.
Los extractos fueron preparados a partir de 4 g de frutos secos que fueron triturados en un molinillo eléctrico de café y posteriormente pulverizados utilizando un mortero, a los que se le adicionaron 50 ml de agua ultra pura y agitados durante 45 min, filtrados bajo vacío y centrifugados a 8ºC a 10.000 g durante 10 minutos. La cuantificación de proteínas fue realizada mediante el método colorimétrico de Bradford (1976), colocando 1 ml de solución de CBBG y una alícuota de extracto dentro de una cubeta completando el volumen hasta 3 ml con buffer pH 7. La absorbancia fue determinada a 595 nm. Albúmina de suero bovina fue usada como proteína hidrosoluble de referencia para la curva de calibración y expresada en mg de proteína por g de fruto (mg/g).

Fraccionamiento de proteínas

Este ensayo se llevó a cabo con el objetivo de conocer en qué proporción del total de proteínas solubles se encuentra la fracción proteica a la que pertenece la enzima Lipoxigenasa. Se realizaron pequeñas modificaciones a la metodología propuesta por Kisung *et al.* (1996). Muestras de 20 gr de nueces previamente desgrasadas fueron trituradas utilizando un molinillo eléctrico de café y posteriormente pulverizadas en un mortero, posteriormente se realizó una extracción con 100 ml de agua con agitación constante durante 4 hs. Se realizó una centrifugación durante 30 min a 12000g. El sobrenadante corresponde a la fracción 1 (albúminas). El residuo sólido se re-extrajo con 100 ml de una solución al 5 % de NaCl con agitación durante 4 hs a temperatura ambiente y posteriormente el extracto se centrifugó durante 30 min a 12000 g. El sobrenadante corresponde a la fracción 2 (globulinas). De la misma manera se procedió para extraer con alcohol isopropílico al 70 % la fracción 3 de prolaminas, del residuo sólido se extrajo con 50 % de solución de ácido acético la fracción 4 correspondiente a glutelinas-1 y en forma sucesiva con solución 0.1M de NaOH se extrajo la fracción 5 correspondiente a glutelinas-2. El contenido proteico de cada fracción fue determinado mediante el método colorimétrico de Bradford.

Aislamiento de LOX de soja

El aislamiento de esta enzima se realizó de acuerdo al procedimiento desarrollado por Klein (1976). Una muestra de 5 g de soja fue pelada y triturada en un molinillo eléctrico de café, luego pulverizada en un mortero a la que posteriormente se agregaron 50 ml de agua ultra pura. Con el objetivo de precipitar los compuestos polifenólicos, se adicionaron 0.005 g de PVP y la mezcla fue agitada durante 15 min. Los sólidos insolubles fueron filtrados bajo vacío y luego el sobrenadante fue centrifugado a 10000 g durante 10 min. Se agregó $CaCl_2$ hasta una concentración final de 43 mM y la solución fue incubada a 8°C durante 30 min para precipitar las proteínas de almacenamiento. Posteriormente se centrifugó a 12000 g por 10 min. El sobrenadante fue filtrado y se adicionó $(NH_4)_2SO_4$ hasta una concentración final de 1.7 M, incubado a 8 °C por 60 min y posteriormente centrifugado a 12000 g por 15 min. El sobrenadante fue cuidadosamente removido y se adicionó $(NH_4)_2SO_4$ hasta una concentración de 4.08 M. Luego de 60 min de incubación a 8°C, se realizó una

nueva centrifugación. Finalmente el pellet remanente fue resuspendido en 5 ml de agua ultra pura e inmediatamente utilizado para la determinación de actividad.

Aislamiento de LOX de nuez y almendra

Para el aislamiento de las enzimas que presentan actividad enzimática fue necesario realizar modificaciones sobre la metodología previamente descripta para soja. Aproximadamente 20 g de nuez y almendra fueron peladas (remoción de la piel), trituradas en un molinillo eléctrico de café y pulverizadas en un mortero, posteriormente se agregaron 100 ml de agua ultra pura y la mezcla fue agitada durante 15 min. Se realizó una filtración bajo vacío, a la mezcla se le adicionó 0.1% de PVP y fue agitada durante algunos minutos. Los sólidos insolubles fueron removidos por filtración bajo vacío y centrifugación a 10000g durante 10 min. Se agregó $CaCl_2$ y se llevó a una concentración final de 30 mM seguido de incubación por 30 min para precipitar las proteínas de almacenamiento y para activar las LOX. La mezcla fue incubada a 8°C durante 30 min y luego centrifugada a 12000g durante 15 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 5 ml de agua ultra pura e inmediatamente sometido a análisis de actividad.

Actividad enzimática

La actividad enzimática fue determinada mediante un análisis espectrofotométrico a 234 nm basado en la formación de dienos conjugados de ácido linoleico mediante una reacción enzimáticamente inducida. La solución de referencia para la determinación de actividad fue preparada a partir de Lipoxidasa type I-B de soja comercial por dilución de 10 mg de enzima en buffer carbonato pH 9 en 10 ml. La solución de LA fue preparada por mezcla de 20 µl con 200 µl de Tween 20 y llevadas a 5 ml con solución amortiguadora a pH 9. La solución fue colocada en una cubeta de 3 ml y una alícuota de solución de LOX fue agregada para iniciar la reacción, la cual fue medida por monitoreo de absorbancia a 234 nm durante 10 min. La actividad de LOX para los extractos de soja, nuez y almendra fue determinada usando el mismo procedimiento.

Se define la unidad de actividad de LOX como la cantidad de enzima que causa un incremento en absorbancia a 234 nm de 0.001 por minuto a pH 9 a 25°C cuando el AL es el sustrato en 3.0 ml de volumen (1 cm de paso óptico). La actividad de LOX comercial tomada como referencia dio como resultado 35000 unidades/mg de sólido en este sistema.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proteínas solubles totales

La determinación de proteínas totales para ambos frutos arrojó como resultado que la almendra posee mayores cantidades que la nuez, presentando valores de 9.9 ± 0.2 g/100 g para almendra y 6.0 ± 0.4 g/100 g para nuez.

Fraccionamiento de proteínas

Las proteínas clasificadas en cinco grupos principales en base a su solubilidad, fueron cuantificadas por medio del método de Bradford y los resultados se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Fracciones proteicas de nuez y almendra con piel expresadas en mg/g de fruto.

Proteínas (mg/g)	Nuez	Almendra
Albúminas	0.5 ± 0.1	11.9 ± 0.3
Globulinas	3.1 ± 0.1	12.4 ± 0.5
Prolaminas	0.050 ± 0.006	1.82 ± 0.09
Glutelinas-1	44.3 ± 0.5	59.7 ± 0.7
Glutelinas-2	0.017 ± 0.006	0.041 ± 0.005

Actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática de LOX, dicha enzima fue aislada a partir de los frutos. Los extractos enzimáticos fueron incubados con solución de AL, donde la acción pro-oxidante de LOX sobre el sustrato oxidable produjo hidroperóxidos con un sistema de dienos conjugados, responsable del aumento de absorbancia a 234 nm.

La actividad enzimática fue expresada en unidades de enzima por miligramo de muestra original (*U/mg).*

Las evoluciones espectrales durante la reacción de oxidación de AL catalizada por diferentes LOX aisladas de soja, nuez y almendra se muestran en las **Figuras 1**, **2** y **3**, respectivamente. Los cambios de absorbancia son causados por la aparición de hidroperóxidos con sistemas de dienos conjugados como productos de la oxidación primaria.

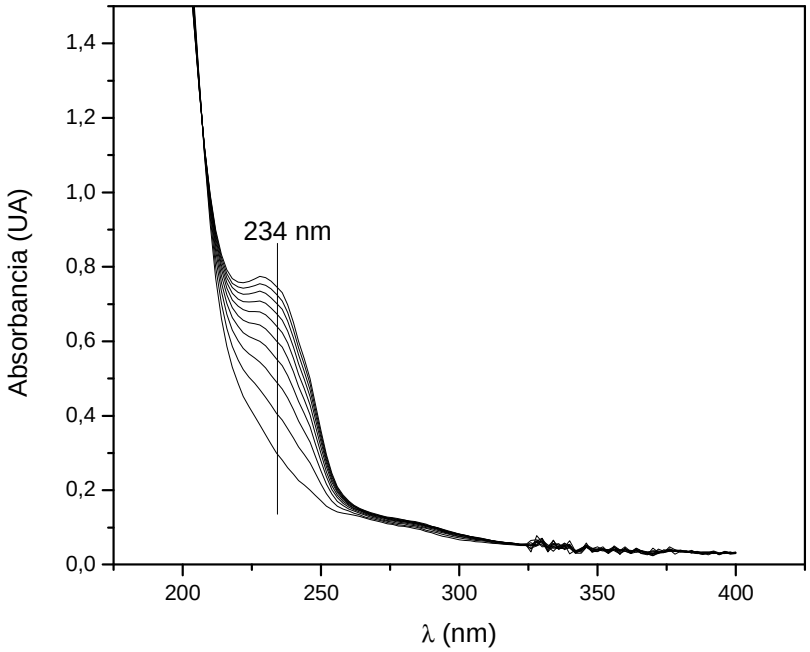


Figura 1. Oxidación de AL por LOX extraída de soja.

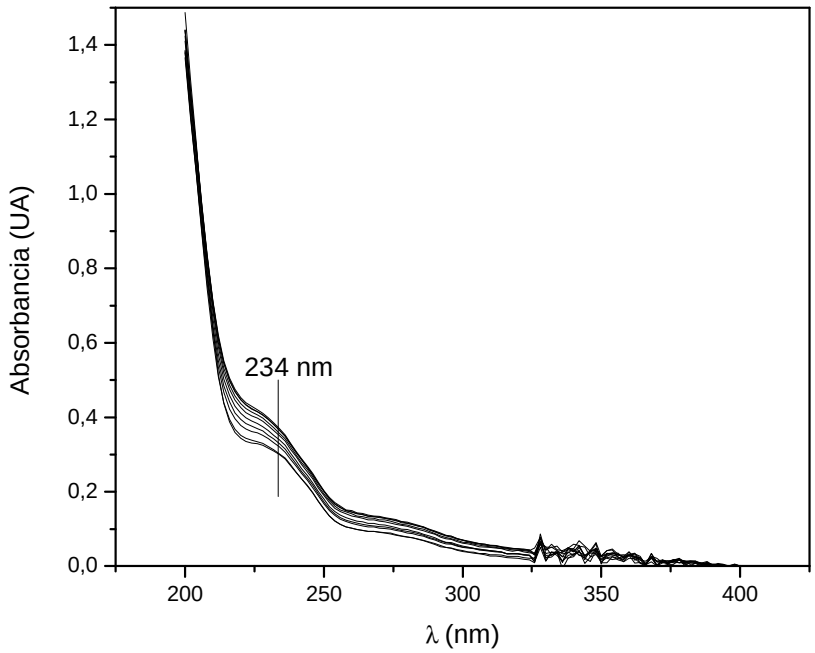


Figura 2. Oxidación de AL por LOX extraída de nuez.

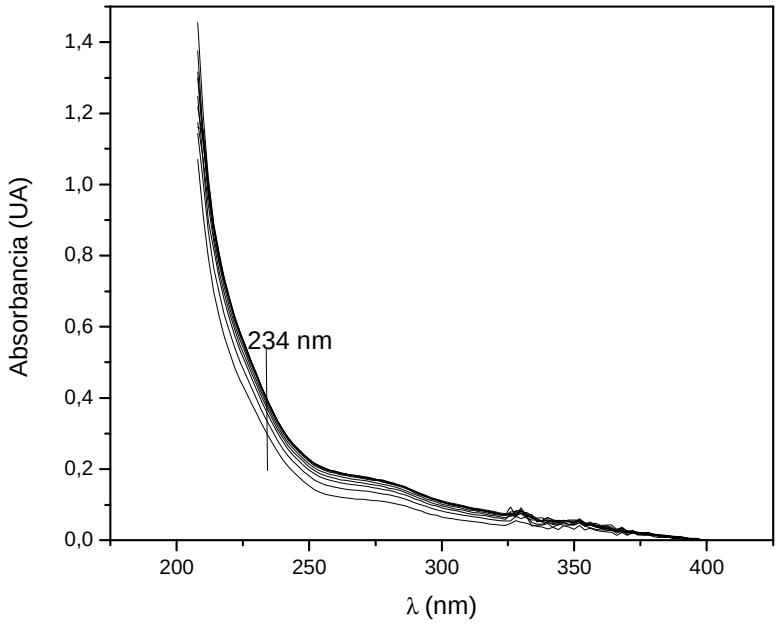


Figura 3. Oxidación de AL por LOX extraída de almendra.

La **Figura 4** muestra el comportamiento cinético de las enzimas provenientes de diferentes extractos, lo que prueba la presencia de LOX activas en extractos acuosos de nuez y almendra, y su actividad es considerablemente menor que la de soja utilizada como control.

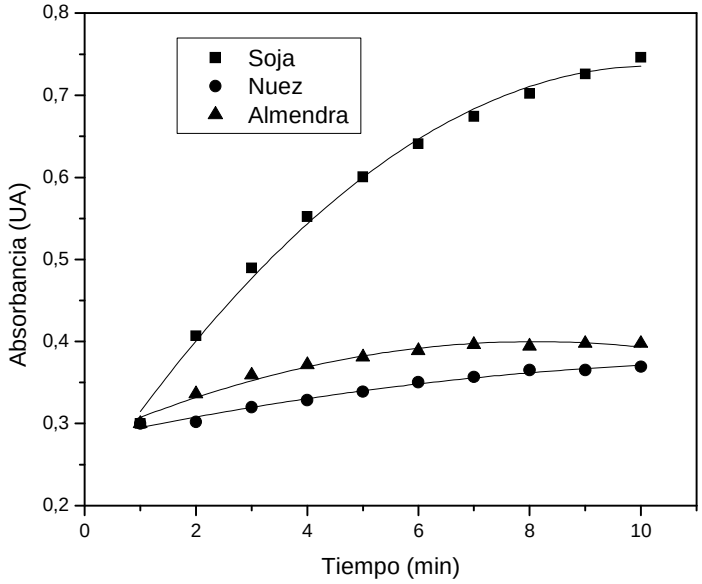


Figura 4. Comportamiento cinético de la reacción de oxidación de AL catalizada por LOX proveniente de extractos de soja, nuez y almendra.

Los resultados correspondientes a la actividad enzimática de soja, nuez y almendra, expresada como unidades de enzima (U) por mg de muestra original se muestran en la **Tabla 2**, donde puede observarse que la actividad de soja fue significativamente más elevada que la de almendra y de nuez, en concordancia con el contenido proteico total y el contenido correspondiente a las fracciones de globulinas de ambos frutos secos.

Tabla 2. Actividad enzimática de soja, nuez y almendra proveniente de diferentes extractos.

	Soja	**Nuez**	**Almendra**
U/mg	78,5	9,5	24,75

CONCLUSIÓN

La mayor actividad enzimática de soja respecto a la de frutos secos puede deberse a que las enzimas se encuentran en menores cantidades en estos últimos, o bien a que los tratamientos térmicos de secado que se aplican a los frutos secos afectan la actividad de dichas enzimas.
De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que las enzimas LOX están presentes en nuez y almendra pudiendo ser las responsables del deterioro oxidativo, siendo la actividad de nuez y almendra significativamente menor que la de soja.

AGRADECIMIENTOS

A las Lic. Graciela Grau y Lorena Valle de la cátedra de Química Biológica de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero por facilitarnos los reactivos necesarios para la técnica de cuantificación de proteínas.
Al Lic. Luis Dorado del Instituto de Cs. Químicas de la misma Facultad por brindarnos bibliografía y su asesoramiento científico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Annual Biochemistry, 72, 248-254.

Kisung K, Kwan HP, Khee CR. 1996. Fractionation and characterization of proteins from coconut (*Cocos nucifera* L.) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1741-1745.

Klein B. Isolation of lipoxgenase from split pea seeds, snap beans, and peas. 1976. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 24, 938-942.

Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. 2001. The effects of nuts on coronary herat disease risk. Nutrition Reviews, 59, 103-111.

López-Nicolás JM, Pérez-Gilabert M, García Carmona I. 2001. Eggplant lipoxygenase (*Solanum melongena*): product characterization and effect of physicochemical properties of linoleic acid on the enzymatic activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 433-438.

Ridolfi M, Terenziani S, Patumi M. 2002. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 835-839.

Robinson DS, Zecai W, Claire D, Rod C. 1995. Lipoxgenases and the quality of foods. Food Chemistry, 54, 33-43.

Venkatachalam M, Sathe SK. Chemical composition of selected edible nut seeds. 2006. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 4705-4714.

Yoshie-Stark Y, Wasche A. 2004. Characteristics of crude lipoxygenase from commercially de-oiled lupin flakes for different types of lupins (*Lupinus albus, Lupinus angustifolius*). Food Chemistry, 88, 287–292.

Consumer preference of grape juices processed by reverse osmosis and commercial products

Preferencia de los consumidores para jugos de uva procesados por osmosis inversa y productos comerciales

Santana I[1], Deliza R[2], Cabral LMC[2], Matta VM[2]

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Instituto de Química, E-mail: isabellesantana@yahoo.com.br
2. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, CEP 23020-470. Rio de Janeiro – RJ, E-mail: rodeliza@ctaa.embrapa.br, lcabral@ctaa.embrapa.br, vmatta@ctaa.embrapa.br

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the consumer preference and intention to purchase of reconstituted grape juices obtained by the concentration of the single strength juice by reverse osmosis (RO) process at different temperatures, as well as to compare them to commercial products. Single strength red grape juice (SGJ) was produced from grapes of the cultivars Isabel, Concord, BRS Rubea and BRS Violet. This juice was the feed stream for RO trials, which were carried out in plate and frame unit, using a composite membrane with 95% rejection to NaCl, transmembrane pressure of 60 bar at three different temperatures: 50°C, 30°C and 20°C. Eight samples were analyzed for the consumer preference and intention to purchase, including the SGJ, the concentrated juices by RO (approximately 28°Brix) obtained at the three temperature conditions, and four commercial grape juices (E, F, G, H), free of additives or sucrose. All juices were standardized to 12,74°Brix and 3,29% of sucrose, according to previous evaluation of ideal dilution and sweetness. Samples were evaluated by 80 consumers, who liked grape juice. They received the samples in a monadic sequential way, in disposable white cups of 50 mL coded with three digit numbers at 10±2ºC. The preference was determined in nine points hedonic scale ranging from (1) dislike extremely to (9) like extremely, and the intention to purchase on a seven-point scale, where: (1) definitely not buy and (7) definitely buy it. Data were analyzed using ANOVA ($p \leq 0.05$) and LSD test. The juice processed at 30°C received the highest mean preference score (5.5±2.26), which was not different from the SGJ, the juice processed at 20°C (5.36±2.25) and the juice E. The lowest mean was attributed to the juice H (3.4 ± 2.22). The same trend was observed in relation to the intention to purchase, i.e. the juice processed at 30°C had an average 4.4±1.85 and the juice H, 2.5±1.56. Concluding, the RO juices processed at 30°C and 20°C resulted in products with the highest preference and consumer intention to purchase, suggesting that this technology can contribute to promising products depending on the process conditions. The temperature of 30°C may be more interesting for the industry due to its higher productivity, when compared to the juice processed at 20°C.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la preferencia del consumidor y la intención de compra de jugos de uva reconstituidos obtenidos a partir de la concentración de jugo de uva por proceso de osmosis inversa (OI) a diferentes temperaturas, y compararlos con productos comerciales. El jugo de uva roja (JUR) fue producido a partir de uvas de las variedades Isabel, Concord, BRS Rubea y BRS Violeta. Este fue el jugo de la alimentación de los ensayos de OI, que se llevaron a cabo en una unidad cuadro y placas, utilizando membranas compuestas con 95% de rechazo a NaCl, presión transmembrana de 60 bar y tres diferentes temperaturas: 50ºC, 30ºC y 20ºC. Ocho muestras fueron analizadas por la preferencia de los consumidores y la intención de compra, incluyendo el JUR, los zumos concentrados por OI (aproximadamente 28ºBrix) en tres diferentes condiciones de temperatura, y cuatro jugos de uva comerciales (E, F, G, H), libres de aditivos o sacarosa. Todos los jugos se estandarizaron para 12,74°Brix y 3,29% de sacarosa, de acuerdo a evaluaciones anteriores de dilución y dulzura ideal. Las muestras fueron evaluadas por 80 consumidores, que le gustabam el jugo de uva. Los evaluadores recibieron las mustras en un secuencial monádico, en vasos blancos de 50 ml

codificados con números de tres dígitos en 10 ± 2ºC. La preferencia se determinó em escala hedónica de nueve puntos de (1) no me gustó extremadamente a (9) mi gustó extremadamente, y la intención de compra en una escala de siete puntos, donde (1) definitivamente no comprarlo y (7) definitivamente comprarlo. Los datos fueron analizados mediante ANOVA ($p \leq 0,05$) y prueba de LSD. El jugo procesado en 30ºC recibió el puntaje más alto de preferência (5,5 ± 2,26), lo que no era diferente del JUR, el jugo procesado a 20ºC (5,36 ± 2,25) y el jugo E. La media más baja se atribuyó a el jugo H (3,4 ± 2,22). La misma tendencia se observó en relación con la intención de compra, i.e., el zumo procesado a 30ºC tuvo media 4,4 ± 1,85 y el jugo H, 2,5 ± 1,56. En conclusión, los jugos procesados por OI a 30ºC y 20ºC fueron los productos con las mayores preferencias y intención de compra, lo que sugiere que esta tecnología puede contribuir a productos prometedores en función de las condiciones del proceso. La temperatura de 30ºC puede ser más interesante para la industria por su mayor productividad, cuando comparado con el jugo procesado a 20ºC.

KEYWORDS*: Vitis labrusca, consumer, membrane technology, concentrated juices.*

PALABRAS CLAVE: *Vitis labrusca, consumidor, tecnología de membranas, jugos concentrados.*

INTRODUCTION

The presence of bioactive compounds in red grape juices and the relation between these substances and the reduction of the risk of cardiovascular, neurological and cancer disease (Castilla *et al*. 2006) make this product valuable and today it presents high interest to the industry of concentrated juice. Despite the evidences in relation to products obtained from grapes, especially the red wine, the consumption of grape juice has advantages when compared to its alcoholic derivative, since the alcohol absence allows the consumption of the juice by a large sector of the population (Malacrida y Motta 2005). Membrane processes are considered an alternative to conventional concentration processes of fruit juices such as vacuum evaporation, since it uses mild processing conditions compared to this traditional methods that employ high temperatures, resulting in products with adequate nutritional value and no additives for the flavor recovery. Among these processes, reverse osmosis is highlighted concerning the concentration of aqueous solutions (Rodrigues *et al*. 2004). As it does not involve phase change or high temperatures, it has advantages such as lower power consumption, and maintenance of sensory and nutritional characteristics of the products (Sá *et al.* 2003). In order to evaluate the products concentrated by this technology, affective sensory tests are fundamental tools to assess the preference of consumers. Previous work conducted by Gurak (2008) with grape juice consumers revealed highest mean preference to the single strength grape juice and the juice processed by RO at 50^{o}C and 60 bar, when compared to commercial juices, however, this process conditions were considered to be potentially harmful to the membrane integrity for long periods because of its elevated Wagner Index. This situation implied the choice for lower operating temperatures, in order to ensure membrane integrity. The aim of this work was to evaluate the consumer preference and intention to purchase of reconstituted grape juices previously concentrated by RO at different temperatures, and to compare them to commercial products.

MATERIALS AND METHODS

Reverse osmosis experiments

The single strength red grape juice (SGJ) was obtained from Embrapa Grape and Wine (Bento Gonçalves, RS – Brazil), and produced by hot pressing of *Vitis labrusca* grape varieties (Isabella, Concord, BRS Rubea and BRS Violet), harvested in the year of 2006. This juice was the feed stream for RO trials, which were carried out in plate and frame unit, using a composite membrane with 95% rejection to NaCl, applying a transmembrane pressure of 60 bar at three different temperatures: 50^{o}C, 30^{o}C and 20^{o}C.

Sensory analysis

Eight samples were analyzed for the consumer preference and intention to purchase, including the SGJ, the concentrated juices by RO (approximately 28^{o}Brix) at three temperature conditions, and four commercial grape juices (E, F, G, H), free of additives or sucrose. All juices were standardized to 12,74^{o}Brix and 3,29% of sucrose, according to previous evaluation of ideal dilution and sweetness.

The samples were evaluated by eighty consumers that liked grape juice. They received the juices in a monadic sequential way, in disposable white cups of 50 mL coded with three digit numbers at 10±2ºC. The preference was determined in nine points hedonic scale ranging from (1) dislike extremely to (9) like extremely, and the intention to purchase on a seven-point scale, where: (1) definitely not buy and (7) definitely buy it.

Statistical analysis

Data of preference were analyzed using analysis of variance (ANOVA) ($p \leq 0.05$), Fisher LSD test, distribution of notes frequency, internal and external preference map and cluster analysis, with Ward's aggregation method. Intention to purchase data was evaluated by ANOVA and distribution of notes frequency, with the software XLSTAT (2005).

RESULTS AND DISCUSSION

Preference

Means for preference are shown in **Table 1**. The juice processed at 30ºC received the highest preference score (5,5 ± 2,26), which was not different from the SGJ (5,26 ± 2,35), the juice processed at 20ºC (5,36 ± 2,25) and the juice E (5,24 ± 2,22). The results observed in this study for the juice concentrated at 50ºC were different from those presented by Gurak (2008), since this sample received lower mean preference (4,65 ± 2,38), when compared to the samples processed at 30ºC and 20ºC, which was between "dislike a little" and "nor like, nor dislike", and was statistically equal to product F, G, E and the SGJ. Possible explanations are the difference between seasons, as the juice used in this study had a lower soluble solids content than that obtained in the previous season, and possibly because of the blend applied to the juice, that may have been employed grape varieties more resistant to heating. Despite this behavior, this juice (concentrated at 50ºC) had 48% of disapproval, while SGJ, 40%, and product E, 36,25% (data not shown), showing that even though they were not statistically different, the juice processed at 50°C was rejected by most consumers. The lowest mean was attributed to the juice H (3.4 ± 2.22), that also received the highest percentage of disapproval for preference (75%).

Table 1. Preference* means** for whole grape juice, juices processed by reverse osmosis and commercial products

Samples	Preference (Mean ± Standard deviation)
Single strenght grape juice	5,26 ± 2,35 ^{abc}
Juice processed by RO at 50ºC	4,65 ± 2,38 ^{c}
Juice processed by RO at 30ºC	5,55 ± 2,26 ^{a}
Juice processed by RO at 20ºC	5,36 ± 2,25 ^{ab}
Product E	5,24 ± 2,22 ^{abc}
Product F	4,60 ± 2,15 ^{c}
Product G	4,81 ± 2,15 ^{bc}
Product H	3,36 ± 2,22 ^{d}

*Nine point hedonic scale, where: (1) dislike extremely, (2) dislike very much, (3) dislike regularly, (4) dislike a little, (5) nor like nor dislike, (6) like a little, (7) like regularly, (8) like very much and (9) like extremely **Means for 80 consumers answers. Means with equal letters in the same column are not different between one another according to Fisher LSD test ($p \leq 0,05$). RO = reverse osmosis (all processes conducted with transmembrane pressure of 60 bar)

Since the preference average may not clearly reflect the results, once notes discrepancies can decrease the overall average, the histogram of **Figure 1** shows the percentage of each of the nine options for preference received by each juice, optimizing the viewing of consumers notes. It is observed that product H received the largest percentage of "dislike extremely" option followed by the juice processed at 50°C. Notes distribution may also explain why the means for preferred juices were not as high, since there was a percentage, although low, of negative notes.

Internal Preference Map (IPM) was prepared to identify consumers position related to the samples. The IPM can be seen in **Figure 2** that represents the position of the eight samples of grape juice. Both dimensions of the map explained 44.28% of variations between the juice samples, where the first dimension separated the samples of single strength grape juice, the three concentrated juices and the product E, while the second dimension isolated the samples of F, G and H products. **Figure 3** shows

the position of each of the 80 consumers in the space defined by first and second dimensions, and shows a predominance of consumers in the right quadrant, indicating that these samples were preferred by a larger number of individuals in detriment of samples of the left quadrant.

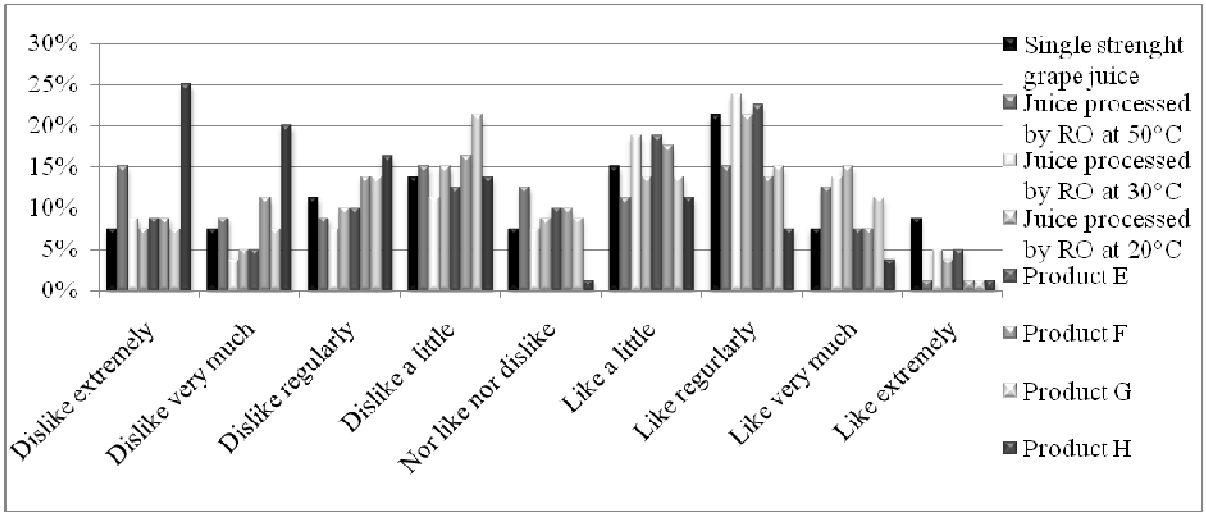


Figure 1. Histogram of distribution of percentage from notes of 80 consumer for preference of single strength grape juice, juices concentrated by reverse osmosis and commercial products.

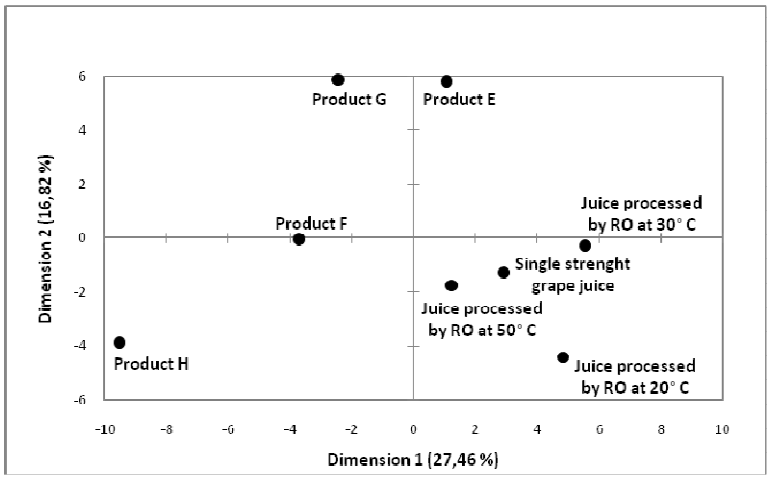


Figure 2. Graphic distribution of dimension 1 and 2 of the internal preference map, showing the position of the samples of single strength grape juice, juices concentrated by reverse osmosis and commercial products.

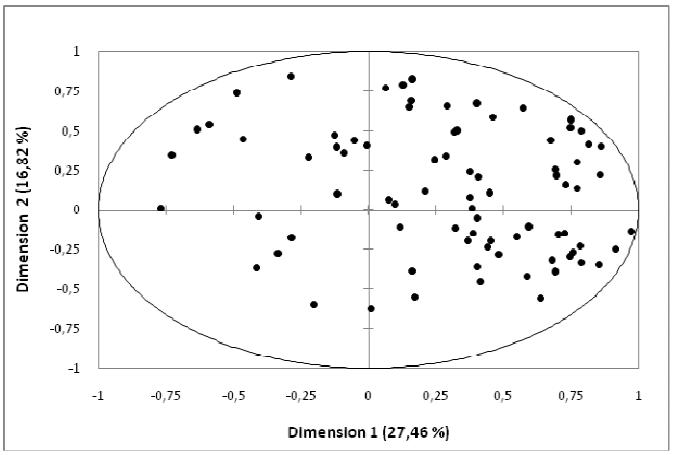


Figure 3. Consumers position in the space defined by first and second dimensions of internal preference map.

The cluster analysis identified three groups of consumers, with 13 (cluster 1), 19 (cluster 2) and 48 (cluster 3) individuals, who answered similarly for the evaluated samples. Cluster 1 presented the lowest number of consumers, 16.25% of the individuals, that gave the highest means for the products E and G, 5,769 and 5,692, respectively, and the lowest score to the juice processed at 20°C (2,231). Cluster 2 was composed by 23,75% consumers that chose the juice processed at 20ºC as their favorite (mean 6,789), while the product H did not provide a good result (3,895) for this group. Sixty percent of the consumers were part of the cluster 3 and assigned the highest notes for the juice processed by reverse osmosis at 30°C (6,604). The commercial product H was the least preferred, note 2,771, in the range from "dislike very much" to "dislike regularly." When the juices were evaluated individually it was verified that only the commercial products E and F were statistically equal in preference between the segments, while the other juices showed variations in preference between the groups. The single strength grape juice and the juices concentrated at 50°C and 30°C were the main targets of cluster 3 preference.

Figure 4 illustrates the external preference map, indicating the clusters position related to the samples. It is shown that the vector for cluster 1, located in the upper right quadrant, is closer to the commercial products F, L and G. Vector of cluster 2 was closest to the juices processed at 50°C and 20°C, while cluster 3 showed higher preference to the single strength juice, the juices processed at 30°C and 20ºC, and the commercial product E.

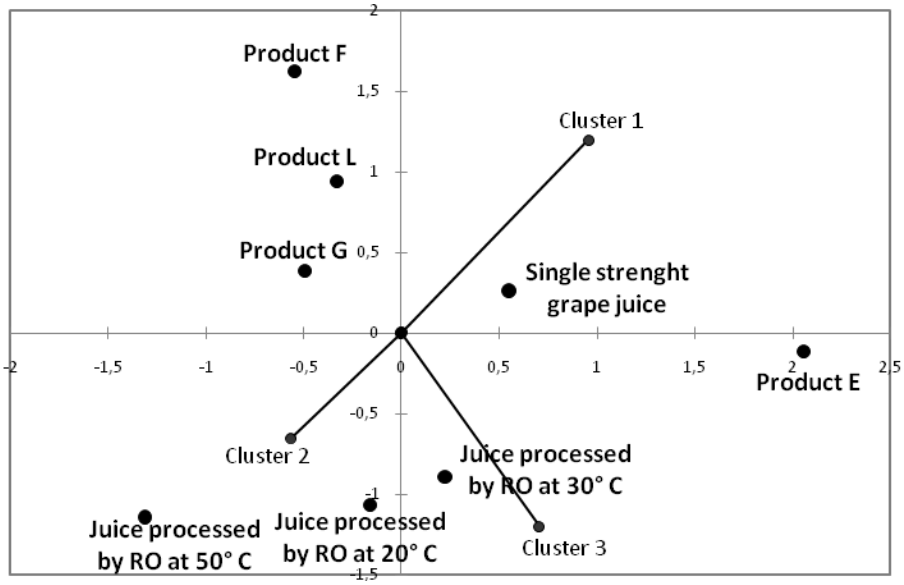


Figura 4. External preference map for reconstituted samples of single strenght grape juice, juices concentrated by reverse osmosis and commercial products.

Intention to purchase

The average achieved for the eight samples in intention to purchase evaluations are shown in **Table 2**. The same trend observed for preference can be verified, since the single strength juice, the juices processed by reverse osmosis at 30°C and 20°C and the product E had significantly higher mean scores, respectively 4,19; 4,44; 4,15 and 4,14, while the juice H, the lowest , 2,5.

The histogram showed in **Figure 5** reveal the percentage distribution of the notes given by the 80 consumers for intention to purchase.It indicates that the participants expressed greater desire to buy the juices that received the highest averages expressed in the previous table than the commercial products F,G and H. Product L showed high rejection in preference tests and hence, in the evaluation of intention to purchase.

Table 2. Intention to Purchase* means** for single strength grape juice, juices processed by reverse osmosis (RO) and commercial products.

Samples	Intention to purchase (Mean ± Standard deviation)
Single strenght grape juice	4,19 ± 2,03 [ab]
Juice processed by RO at 50°C	3,80 ± 2,02 [b]
Juice processed by RO at 30°C	4,44 ± 1,85 [a]
Juice processed by RO at 20°C	4,15 ± 1,88 [ab]
Product E	4,14 ± 1,95 [ab]
Product F	3,67 ± 1,86 [b]
Product G	3,63 ± 1,85 [b]
Product H	2,54 ± 1,66 [c]

*Seven point hedonic scale, where: (1) Definitely not buy, (4) maybe buy it, maybe not, (7) definitely buy it **Means for 80 consumers answers. Means with equal letters in the same column are not different between one another according to Fisher LSD test ($p \leq 0,05$). RO = reverse osmosis (all processes conducted with transmembrane pressure of 60 bar)

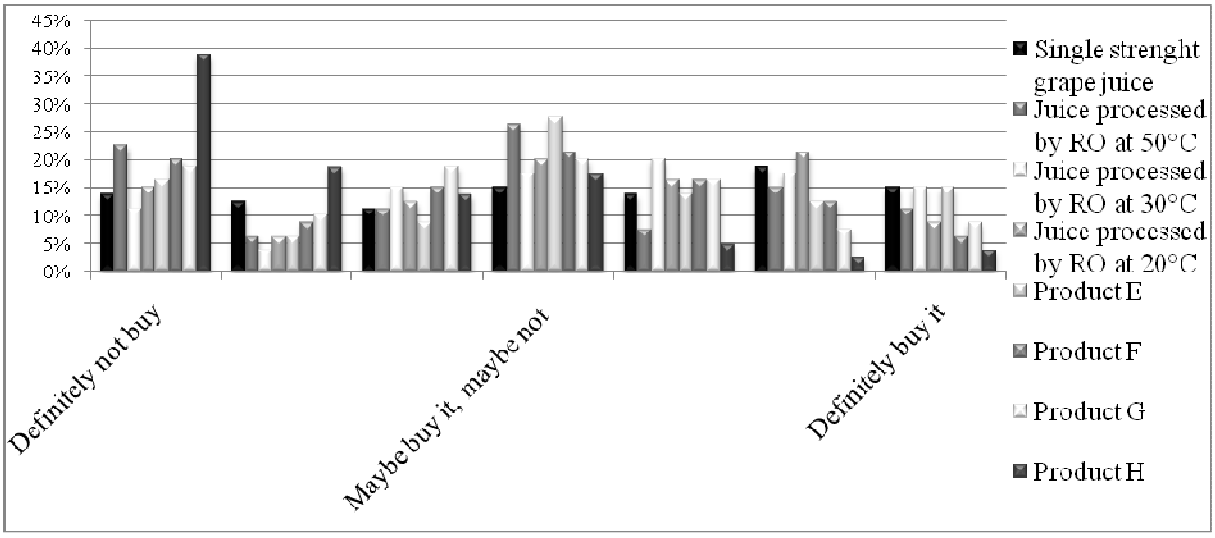


Figure 5. Histogram of distribution of percentage from notes of 80 consumer for intention to purchase of single strength grape juice, juices concentrated by reverse osmosis and commercial products.

CONCLUSIONS

The analysis of preference and intention to purchase showed that the single strength juice, the juices processed by reverse osmosis at 30°C and 20°C and the commercial product E received the most elevated mean scores. Juices processed at lower temperatures resulted in products with the highest consumer preference and intention to purchase, suggesting that this membrane technology can contribute to promising products depending on the process conditions applied. However, the temperature of 30°C may be more interesting for the industry as this condition results in higher productivity, when compared to the juice processed at 20°C. The juice concentrated at 50ºC did not present the same behavior, showing that the use of higher temperatures may result in perceptible sensory changes that can not satisfy the consumers.

REFERENCES

Castilla P, Echarri R, Dávalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, Lucas MF, Gómez-Coronado D, Ortuño J, Lasunción MA. 2006. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. American Journal of Clinical Nutrition, 84: 252–262.

Gurak PD. Estudo da concentração de suco de uva por osmose inversa e posterior encapsulamento por liofilização. 2008. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro. pag. 99.

Malacrida CR, Motta S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. 2005. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 25:659-664.

Rodrigues RB, Menezes HC, Cabral LMC, Dornier M, Rios GM, Reynes M. 2004. Evaluation of reverse osmosis and osmotic evaporation to concentrate camu–camu juice (*Myrciaria dubia*). Journal of Food Engineering, 63: 97-102.

Sá IS, Cabral LMC, Matta VM. 2003. Concentração de suco de abacaxi através dos processos com membranas. Brazilian Journal of Food Technology, 6:53-62.

Isotermas de adsorción del polvo de la yerba mate con aglomerantes utilizados en el entrampamiento de compuestos

Adsorption isotherms of yerba mate powder with agglutinants used to trap compounds

Schmalko ME, Ayala M, Martín C, Carrattini D.

FCEQyN- Universidad Nacional de Misiones
mesh@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Con el objeto de entrampar edulcorantes para ser utilizados en el mate se está estudiando la posibilidad de utilizar el polvo de la yerba mate, subproducto de la molienda, junto con aglomerantes, para formar partículas con un tamaño mayor a 420 micrómetros (retenido por malla 40). Al ser incorporado el edulcorante entrampado, se tendría una salida lenta, lo que favorecería su consumo en el mate. Cuando se agrega el edulcorante en forma directa, la extracción tiene lugar en los primeros mates, produciéndose un sabor fuerte y desagradable, y se vuelve imperceptible con el progreso de la mateada. Para ser incorporado este compuesto a la yerba mate antes de ser envasada se debe conocer la humedad de equilibrio para que no inestabilice a la misma (actividad de agua menor a 0,6). El objetivo de este trabajo fue determinar las isotermas de adsorción del polvo de la yerba mate conteniendo aglomerantes en todo el rango de temperatura que se almacena y comercializa la yerba mate. Las isotermas de adsorción se determinaron utilizando el método estático, con soluciones salinas saturadas a cuatro temperaturas diferentes: 20, 30, 40 y 50 ºC. Se utilizaron tres aglomerantes: goma arábiga, maltodextrina y almidón de mandioca al 10 % p/p. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La diferencia en los contenidos de humedad de los diferentes materiales a una temperatura y aw fue muy pequeña. En ningún caso superó el valor de 2,51 %. Los datos experimentales se ajustaron a los modelos de GAB y Halsey. Con el modelo de GAB se obtuvieron errores promedios elevados y las constantes del modelo en algunos casos tuvieron valores muy elevados, por lo que se seleccionó el modelo de Halsey. En primer lugar se ajustaron los valores para cada una de las temperaturas, resultando un error promedio porcentual de 6,48 %. Luego se ajustaron las constantes (a y r) en función de la temperatura, con un modelo tipo Arrhenius, obteniéndose una sola ecuación para cada material. En este caso el error promedio porcentual resulto de 7,44 %, que difiere muy poco del ajuste anterior. Los valores de las constantes de Halsey (a y r) fueron mayores en el polvo sin aglomerante que en los materiales que contenían aglomerantes. Se encontraron valores de la constante a entre 6,15 y 24,18 y de r entre 1,23 y 1,86. De igual manera los valores de energía de activación de las constantes a y r fueron superiores en el polvo sin tratar. También se calcularon los valores de contenido de humedad de equilibrio para una actividad de agua igual a 0,6 (a 30ºC). Los mismos variaron entre 7,86 y 8,33 % (base seca). No se encontraron diferencias significativas entre estos contenidos de humedad entre los diferentes materiales ni a las diferentes temperaturas. Estos valores eran menores a los que tiene la yerba mate (9,5 % aproximadamente).

ABSTRACT

In order to trap sweeteners to be used in the maté, a matrix formed with yerba maté powder and different agglutinants to form particles greater than 420 mμ (mesh 40) were developed. When the trapped sweetener is added to the maté, a slow release is obtained, improving its taste. If the sweetener is added without a matrix, a high extraction takes place in the first maté, producing a strong and unpleasant taste. In the last matés, it becomes imperceptible. In order to mix the matrices with the yerba maté, it is necessary to know the moisture content that avoid microbial growth (corresponding to a water activity, aw = 0.6) and consequently their adsorption isotherms. The aim of this research was the determination of the adsorportion isotherms of matrices compound of yerba maté powder and different agglutinants at the range of temperature that yerba maté is stored and marketed. Adsorption isotherms were determined using the static method, using saturated salt solutions at 20, 30, 40 and

50ºC. Three agglutinants were used: tapioca starch, Arabic gum and maltodextrin at a concentration of 10% w/w. Measures were carried out in triplicate. Differences in moisture content for a specific temperature and aw were very low and minor than 2.51% in all cases. Experimental data were fitted to GAB and Halsey models. With the GAB model, high mean errors were obtained and model parameters had high values. When they were fitted to Halsey model, at a specific temperature, low mean errors were obtained (6.48%). Model parameters a and r were also fitted to an Arhenius model to describe their dependence on temperature. Using only one equation in all temperature ranges, a mean percentual error of 7.44 % was obtained. It is slightly higher than the isothermal model. These values were minor than that required for yerba maté (9.5%). Parameters of Halsey model (a and r) were higher in the material without the agglutinant than that using the agglutinants. Values of a varied between 6.15 and 24.18, while r varied between 1.23 and 1.86. Activation energies for both parameters were also higher in the material without agglutinants. Equilibrium moisture contents at aw= 0.6 were also estimated. They varied between 7.86 and 8.33 (%, dry basis). No significative differences were found between them, considering the different materials and temperatures.

PALABRAS CLAVE: *isotermas, yerba mate, aglomerante, Halsey.*

KEYWORDS: *isotherms, yerba maté, agglutinant, Halsey.*

INTRODUCCIÓN

El entrampamiento de compuestos se realiza, en algunos casos, con el objeto de retardar su liberación. Se han utilizado en numerosas áreas, pero en los alimentos se utilizan principalmente para entrampar sabores, generalmente volátiles (Yoshii et al., 2001; Secouard et al., 2003; Terta et al., 2006). Para ello se utilizan diferentes aglomerantes, como ser las maltodextrinas, almidones, otros polisacaridos, goma arábiga, etc. Estos aglomerantes también se utilizan para formar partículas de tamaños mayores, cuando el material forma finos polvos (Pua et al., 2007; Goula y Adamopoulos, 2008 a y b).

Es común consumir la yerba mate (en forma de mate) añadiendo saborizantes y edulcorantes. Cuando se agrega el edulcorante en forma directa, la extracción tiene lugar en los primeros mates, produciéndose un sabor fuerte y desagradable, y se vuelve imperceptible con el progreso de la mateada. Por este motivo se estudia en este proyecto la posibilidad de entrampar el edulcorante de tal forma que se tenga una liberación lenta del mismo y su perfil de concentración sea menos pronunciado al que se tiene cuando se añade en forma directa.

Se propone formar una matriz utilizando polvo de yerba mate, el edulcorante y un aglomerante de tal forma de tener partículas de un tamaño similar al de la yerba mate molida. Para ser incorporado este compuesto a la yerba mate antes de ser envasada se debe conocer la humedad de equilibrio para que no inestabilice a la misma (actividad de agua menor a 0,6). Al añadir diferentes componentes a la matriz, se esperaría que las isotermas de adsorción de humedad sean diferentes (Mendoza et al., 1999; Shrestha et al., 2008) y que también difieran a las de la yerba mate.

El objetivo de este trabajo fue determinar las isotermas de adsorción del polvo de la yerba mate conteniendo aglomerantes en todo el rango de temperatura que se almacena y comercializa la yerba mate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó el polvo de la yerba mate proveniente de un secadero industrial de la provincia de Misiones. Los aglomerantes utilizados fueron: goma arábiga, maltodextrina y almidón de mandioca.

Preparación de las muestras

En la muestra número 1, se mezclaron 600 g de polvo de yerba mate con 1800 ml de agua (SA). En la muestra 2, además de estos dos materiales se añadió 60 g de almidón de mandioca (A); en la 3, 60 g de goma arábiga (GA) y en la 4, 60 g de maltodextrina (M). La mezcla se agitó y colocó en baño termostatizado a 60 ºC durante 10 min con agitación y se sometió a ultrasonido por otros 10 minutos, manteniendo la temperatura en 60 ºC. La mezcla obtenida se distribuyó en cajas de petri y se secó en estufa durante 24 h a la misma temperatura. Concluido el secado la matriz fue molida en molino de cuchillas.

Determinación de las isotermas

Para determinar los contenidos de humedad de equilibrio, los materiales mencionados anteriormente fueron colocados en frascos cerrados que contenían soluciones salinas saturadas que generaban atmósferas con diferentes actividades de agua. Luego, se colocaron en una estufa a una temperatura controlada. Se utilizaron ocho soluciones salinas diferentes (LiCl, $MgCl_2$, $CoCl_2$, NaBr, $NaNO_3$, $MgNO_3$, NaCl y KCl), cuyas actividades de agua para las diferentes temperaturas fueron obtenidas de las tablas de Greenspan (1977). Las muestras fueron mantenidas en la estufa hasta alcanzar el equilibrio (aproximadamente 10 días). Las experiencias fueron llevadas a cabo entre 20 y 50°C, cada 10°C (± 2°C). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinación del contenido de humedad

Se determinó utilizando el método dado por la norma IRAM 20503 (1995), trabajándose a 103 ± 2°C, durante 6 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron aproximadamente 5 g de material.

Modelos de isotermas de sorción

De los modelos de isotermas de sorción de agua en alimentos citados por Chirife e Iglesias (1978), se seleccionaron el modelo de Halsey y el de GAB (Guggenheim-Anderson-deBoer) para ajustar los datos experimentales. El modelo de GAB se seleccionó por ser el más ampliamente utilizado y el de Halsey por obtenerse muy buenos resultados en yerba mate (Schmalko y Alzamora, 2005).

El modelo de GAB, se describe con la siguiente ecuación:

$$X = \frac{XmCka_w}{(1-ka_w)(1-ka_w+cka_w)} \qquad \textbf{(1)}$$

La constante Xm es el contenido de humedad de la monocapa; mientras que las constantes C y k están relacionadas a la energía de interacción entre la primera capa de moléculas y las capas distantes de moléculas de agua adsorbidas. Las mismas dependen de la temperatura y dicha dependencia puede ser expresada por una ecuación del tipo de Arrhenius (Rao and Rizvi, 1995; García et al., 2000). Para cada una de ellas, se puede utilizar una ecuación del tipo :

$$Xm = Xmo \exp(\Delta H' / RT) \qquad \textbf{(2)}$$

Siendo Xmo una constante, ΔH' la energía de activación y T la temperatura en ºK.

El ajuste fue obtenido utilizando el criterio de los mínimos cuadrados con una técnica de regresión no lineal, utilizando el programa Statgraphics (1993).

El modelo de Halsey puede ser linealizado. Los modelos lineales tienen la ventaja que sus pendientes son fácilmente calculadas cuando son necesarias al modelar el secado. El modelo de Halsey tiene la siguiente forma:

$$a_w = \exp(-\frac{a}{X^r}) \qquad \textbf{(3)}$$

Esta ecuación se puede linealizar de la siguiente forma:

$$\ln(-\ln a_w) = \ln a - r \ln X \qquad \textbf{(4)}$$

En estas ecuaciones "a" y "r" son las constantes del modelo, estando "r" relacionada al tipo de interacción entre el vapor y el sólido (Chirife e Iglesias, 1978). Se encontró que ambas constantes dependían de la temperatura. Esta dependencia puede ser expresada a través de una ecuación exponencial (Santana y Mascheroni, 2003) o de tipo Arrhenius (Rao and Rivsi, 1985; García et al., 2000), similares a le ecuación 2.

Para ajustar los datos experimentales al modelo de Halsey se utilizó una técnica de regresión lineal y luego se calculó el Error Medio Porcentual (MPE) con la siguiente ecuación:

$$MPE = \frac{\sum \frac{|X\,\text{exp}\,erimental - Xcalculado|}{X\,\text{exp}\,erimental}}{N} * 100 \qquad \textbf{(5)}$$

En la misma N es el número de datos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se pueden observar los resultados obtenidos en las experiencias entre 20 y 50ºC. Se dan los valores medios de 3 repeticiones. En todos los casos el coeficiente de variación fue menor al 5%. Se puede observar que la diferencia en los contenidos de humedad de los diferentes materiales a una temperatura y aw fue muy pequeña. En ningún caso superó el valor de 2,51 %.

Tabla 1. Valores experimentales de contenido de humedad (% base seca) para los diferentes aglomerantes y temperaturas, constantes de la ecuación de Halsey a, r y $a' = a/100^r$, y el error promedio porcentual (MPE).

Temperatura (ºC)									
20					30				
aw	X_{SA}	X_A	X_{GA}	X_M	aw	X_{SA}	X_A	X_{GA}	X_M
0,113	4,24	3,67	2,80	2,91	0,113	3,96	2,74	3,52	2,86
0,331	5,11	4,15	4,67	3,94	0,324	5,16	4,69	5,06	4,87
0,544	7,21	7,06	7,81	7,16	0,514	6,43	6,55	6,83	6,70
0,591	7,74	7,61	8,42	7,94	0,56	7,74	7,48	7,96	7,37
0,679	7,51	7,50	8,68	7,71	0,618	8,59	8,85	9,66	9,07
0,754	10,56	10,67	12,06	11,30	0,731	10,80	11,21	12,74	11,88
0,755	11,48	11,55	12,46	12,45	0,751	13,36	13,35	14,48	13,87
0,851	16,17	15,84	17,09	16,52	0,836	16,47	16,50	16,97	17,14
a	24,18	13,94	9,97	8,83	a	17,26	8,94	12,74	9,24
r	1,86	1,63	1,43	1,41	r	1,64	1,37	1,47	1,36
a'	0,0046	0,0077	0,0138	0,0134	a'	0,0091	0,0163	0,0146	0,0176
MPE	7,25	8,17	4,96	7,88	MPE	5,99	3,69	5,31	3,66
Temperatura (ºC)									
40					50				
aw	X_{SA}	aw	X_{SA}	aw	X_{SA}	aw	X_{SA}	aw	X_{SA}
0,112	3,42	0,112	3,42	0,112	3,42	0,112	3,42	0,112	3,42
0,316	4,99	0,316	4,99	0,316	4,99	0,316	4,99	0,316	4,99
0,484	6,70	0,484	6,70	0,484	6,70	0,484	6,70	0,484	6,70
0,532	7,54	0,532	7,54	0,532	7,54	0,532	7,54	0,532	7,54
0,555	8,40	0,555	8,40	0,555	8,40	0,555	8,40	0,555	8,40
0,71	11,31	0,71	11,31	0,71	11,31	0,71	11,31	0,71	11,31
0,747	13,58	0,747	13,58	0,747	13,58	0,747	13,58	0,747	13,58
0,823	15,74	0,823	15,74	0,823	15,74	0,823	15,74	0,823	15,74
a	13,61	a	13,61	a	13,61	a	13,61	a	13,61
r	1,51	r	1,51	r	1,51	r	1,51	r	1,51
a'	0,0130	a'	0,0130	a'	0,0130	a'	0,0130	a'	0,0130
MPE	3,44	MPE	3,44	MPE	3,44	MPE	3,44	MPE	3,44

En cuanto al ajuste de los datos experimentales a los modelos de GAB y Halsey, se encontró que con el modelo de GAB se obtuvieron errores promedios elevados por lo que se seleccionó el modelo de Halsey. En primer lugar se ajustaron los valores de contenido de humedad para cada una de las temperaturas, resultando un error promedio porcentual de 6,48 %. En las **Figura 1** se puede observar el ajuste obtenido para cada uno de los materiales a 20, 30, 40 y 50ºC. Se puede notar la superoposición que existen entre las curvas de los diferentes materiales a cada una de las temperaturas. Los valores de las constantes de Halsey (a y r) fueron mayores en el polvo sin aglomerante (SA) que en los materiales que contenían aglomerantes (**Tabla 1**). Se encontraron valores de la constante "a" entre 6,15 y 24,18 y de "r" entre 1,23 y 1,86. En la bibliografía se encuentran valores de la constante "a" entre 0,015 y 0,030 (cuando la humedad se expresa como una relación de pesos) para diferentes productos: maíz (Tolaba y Suárez, 1990), okhara de soja (García et al., 2000) y semillas de girasol

(Santana y Mascheroni, 2003). El parámetro "r" para estos productos varía entre 1,03 y 1,68. Comparando estos valores con los obtenidos en este trabajo se puede observar (**Tabla 1**) que para las temperaturas de 40 y 50ºC los valores de la constante a' fueron similares, mientras que para las temperaturas más bajas resultaron inferiores. La constante "r" se mantuvo en el orden establecido por los autores mencionados anteriormente. Estas constantes también fueron determinadas en hojas y palos de yerba mate (Schmalko, 2005), Se encontraron valores de "a' $(a' = a/100^r)$"que variaban entre 0,010 y 0,030 y de "r" entre 1,02 y 1,76, En ambos casos los rangos fueron más amplios que el encontrado en este trabajo. Esto se debe, posiblemente, a la utilización de materiales diferentes (hojas y palos).

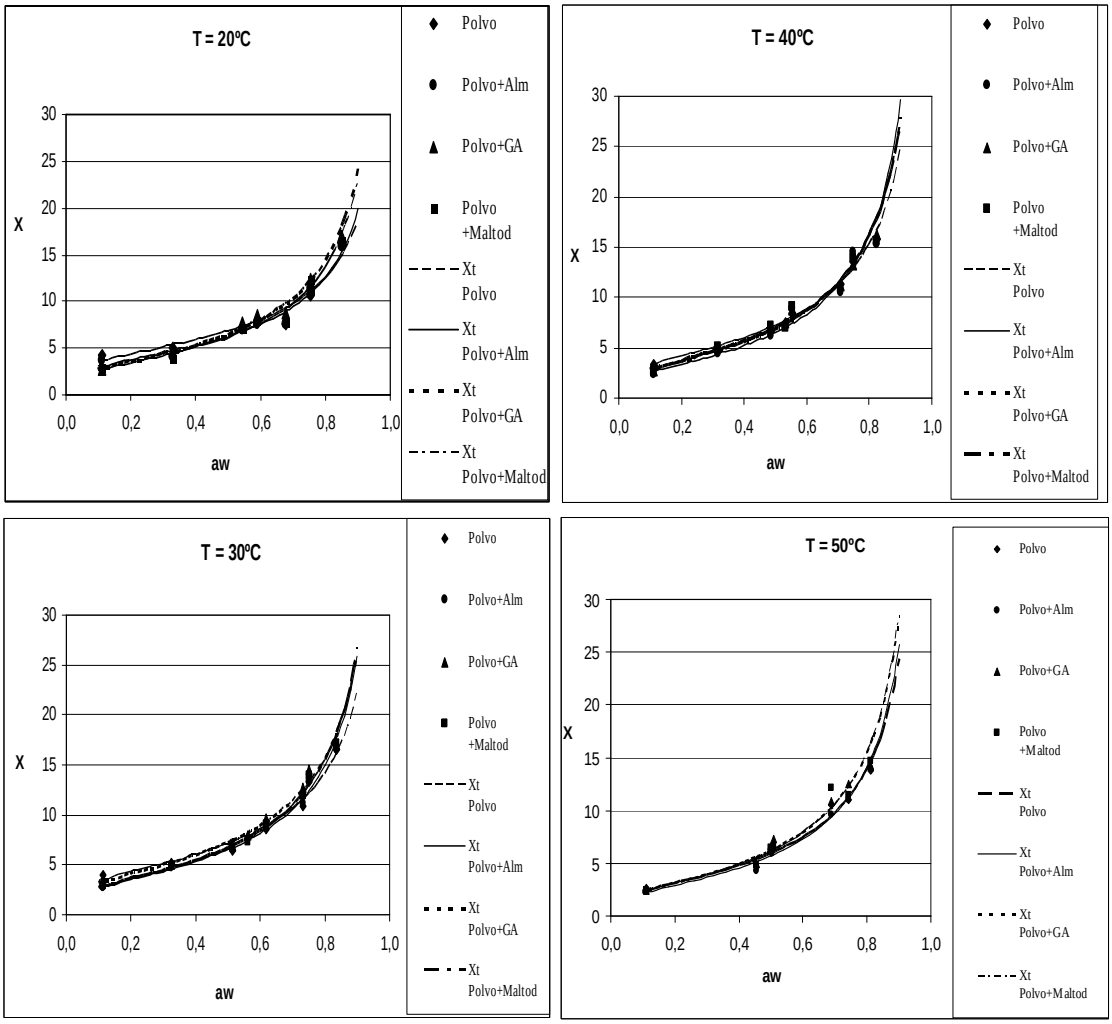


Figura 1. Isotermas de adsorción. Valores experimentales (e) y teóricos (t) obtenidos con el modelo de Halsey a 20, 30, 40 y 50ºC.

Luego se ajustaron las constantes (a y r) en función de la temperatura, con las ecuaciones 7 y 8, obteniéndose una sola ecuación para cada material. En este caso el error promedio porcentual resulto de 7,44 %. De igual manera los valores de energía de activación de las constantes a y r fueron superiores en el polvo sin tratar (**Tabla 2**). No obstante las diferencias de las curvas a las diferentes temperaturas fueron muy pequeñas y como se observa en la **Figura 2** (para la maltodextrina), existen superposiciones entre ellas.

También se calcularon los valores de contenido de humedad de equilibrio para una actividad de agua igual a 0,6 (a 30ºC), que corresponde al límite de crecimiento de microorganismos. Los mismos variaron entre 7,86 y 8,33 % (base seca). No se encontraron diferencias significativas entre estos contenidos de humedad entre los diferentes materiales ni a las diferentes temperaturas. Estos valores

fueron menores a los que tiene la yerba mate (9,5 % aproximadamente). De acuerdo a esto se debería fijar un límite inferior a la mezcla de ambos materiales, que de acuerdo a los valores anteriores podría ser del 9%.

Tabla 2. Valores de las constantes de la ecuación de Halsey.

Material	a_0	Ha_0	r_0	Hr_0
Sin aglomerante	1,39E-04	3552,97	0,06	1023,97
Almidón	2,18E-03	2549,32	0,09	854,44
Goma Arábiga	1,01E-01	1395,07	0,29	476,52
Maltodextrina	5,38E-01	848,24	0,36	401,87

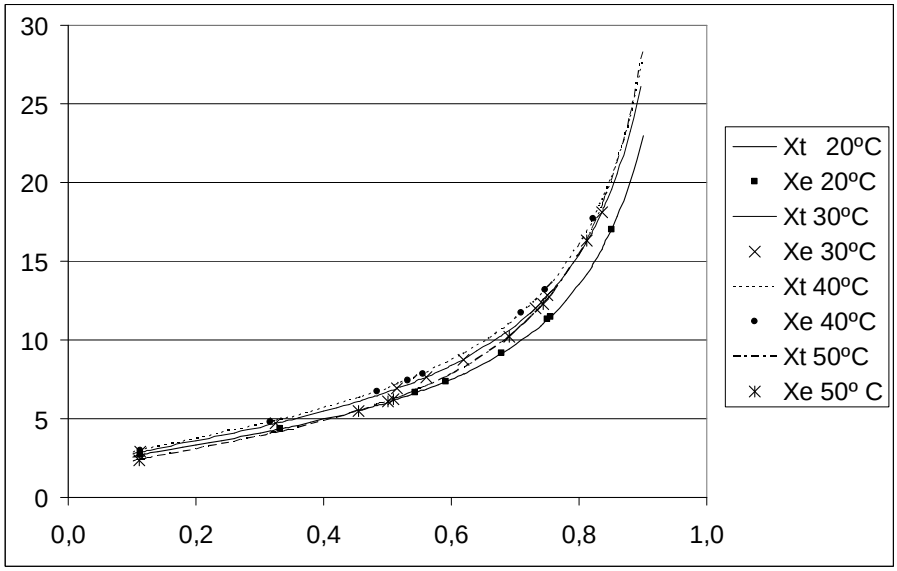


Figura 2. Isotermas de adsorción para la maltodextrina a diferentes temperaturas, valores experimentales (e) y teóricos (t).

CONCLUSIONES

La utilización de diferentes aglomerantes para formar la matriz, no tuvo una incidencia importante en el contenido de humedad de equilibrio, ya que a una determinada a_w y temperatura, los cuatro materiales tuvieron contenidos de humedad de equilibrio muy similares.

Los datos experimentales se ajustaron en todos los casos mejor al modelo de Halsey al obtenerse errores promedios porcentuales menores. Las constantes del modelo para las diferentes temperaturas, se ajustaron a un modelo de Arrhenius, obteniéndose también en este caso un buen ajuste.

Los valores de contenido de humedad para una aw= 0,6 fueron similares para los diferentes materiales (entre 7,86 y 8,37%) y menores al de la yerba mate (9,5%). Se debería por lo tanto fijar un límite menor del contenido máximo de humedad para la yerba mate cuando se añadan estos compuestos. El valor sugerido para este caso es del 9 %

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) por fiananciar este trabajo de investigación,

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

García, L.A.; Kobylañaski, J,R., y Pilosof, A.M.R. 2001. Modelling water sorption in Okara soy milk. Drying Technology 18, 2091-2103

Goula, A.M.; Adamopoulos, K.G. 2008. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: I. Drying Kinetics and Product Recovery. Drying Technology 26, 714-725.

Greenspan, L. 1997. Journal of research of the national bureau of standards. A. Physics and chemistry 81, 89–96.

Goula, A.M.; Adamopoulos, K.G. 2008. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: II. Powder Properties. Drying Technology 26, 726-737.

IRAM 20503. Instituto de Racionalización de Materiales. Yerba Mate: Determinación de la pérdida de masa a 103°C. 1995.

Mendoza, R.; Auras, R., Schmalko, M.E.; Linares, A.R. 1999. Isotermas de adsorción y velocidad de rehidratación en frutas de carica papaya L. deshidratadas por varios métodos. Información Tecnológica 10 (6), 57-62.

Pua, C.K.; Sheik Abd. Hamid, N.; Rusul, G.; Abd. Rahman, R. 2007. Production of drum-dried jackfruit (Artocarpus heterophyllus) powder with different concentration of soy lecithin and gum Arabic. Journal of Food Engineering 78, 630-636.

Rao, M.A., y Rizvi, S.S.H. 1995. Engineering Properties of Foods. 2nd. Edition. Marcel Dekker Inc. New York, 252.

Schmalko, M.E. and Alzamora, S.M. Modeling the drying of a twig of yerba maté considering as a composite material: Part I: Shrinkage, apparent density and equilibrium moisture content. Journal of Food Engineering 2005, 66, 455-461.

Schmalko, M.E. 2005. Estudio y modelado del procesamiento primario de la yerba mate. Tesis de doctorado de la Universidad de Buenos Aires.

Secouard, S.; Malhiac, C.; Grisel, M.; Decroix, B. 2003. Release of limonene from polysaccharide matrices: viscosity and synergy effect. Food Chemistry 82, 227-234.

Shrestha, A.K.; Howes, T.; Adhikari, B.P.; Dhandari, B.R. 2008. Spray Drying of Skin Milk Mixed with permeate: Effect on Drying Behaviour, Physicochemical Properties, and Storage Stability of Powder. Drying Technology 26, 239-247.

Statgraphics Plus (Versión 7 for DOS). 1993. STATGRAPHICS User Manual Manugistics, Inc. Rockville, Maryland. U.S.A.

Terta, M.; Blekas, G.; Paraskevopoulou, A. 2006. Retention of selected aroma compounds by polysaccharide solutions: A thermodynamic and kinetic approach. Food Hydroicolloids 20, 863-871.

Yoshii, H.; Soottitantawat, A.; Liu, X.; Atarashi, T.; Furuta, T.; Aishima, S.; Ohgawara, M.; Linko, P. 2001. Flavor release from spray-dried maltodextrin/gum arabic or soy matrices as a function of storage relative humidity. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2, 55-61.

Determinación de umbrales de identificación de hierbas adicionadas a la yerba mate compuesta

Recognition thresholds determination of additionated herbs to compound yerba mate

Scipioni GP, Ortiz DE, Seidel Jacobsen AL, Argüello B del V.

FCEQyN - CIDET - Universidad Nacional de Misiones
Félix de Azara 1552 - Posadas 3300 - Misiones - Argentina
gpatriciascipioni@yahoo.com.ar

RESUMEN

El producto comercializado como yerba mate compuesta se obtiene adicionando hierbas sápido–aromáticas a la yerba mate. La mezcla obtenida tiene un sabor diferente al de la yerba mate elaborada y buena aceptación en una franja importante de consumidores.

El Código Alimentario Argentino prevé el uso de hierbas de reconocida inocuidad fisiológica en mezclas con yerba mate hasta un 40% y fija como requisitos un valor máximo de contenido de humedad del 9,5% en base seca y 2 % de cenizas insolubles No esta establecido el porcentaje mínimo de hierbas que debe ser agregado para que el producto tenga tal denominación.

El objetivo del presente trabajo fue determinar por medio de un análisis sensorial el porcentaje mínimo (umbrales de identificación) de menta (Mentha p.), manzanilla (Matricaria r.), peperina (Minthostachys m.), boldo (Peumus b.), tilo (Tilia c.), poleo (Lippia t.), cedrón (Aloysa t.) e incayuyo (Lippia i.) que debería agregarse a la yerba mate para que el producto se defina como yerba mate compuesta.

Las hierbas fueron provistas por empresas yerbateras de la zona que elaboran este tipo de producto. Las muestras de manzanilla, tilo, boldo, cedrón y poleo estuvieron constituidas por hojas con escasos restos de palos, en tanto que las muestras de menta, peperina e incayuyo presentaron un contenido bajo de hojas.

Las experiencias se realizaron con un panel de 30 a 50 catadores semientrenados. El entrenamiento inicial se realizó a través de test de triángulos secuenciales en los que se utilizó menta por considerarse una de las hierbas de consumo más amplio. Cada mate contenía 15g de una mezcla de yerba mate y menta en concentraciones desde el 1% hasta 0,1% en peso.

La determinación del umbral de cada hierba se realizó, empleando el método de comparaciones múltiples con referencia, mediante una escala de concentraciones crecientes en forma geométrica con un testigo de yerba mate sin la hierba como referencia. En el caso de las hierbas menos conocidas se entregó una muestra de estas a cada panelistas en días previos a la experiencia. Las cantidades usadas en las escalas (mates con 15g de mezcla) fueron: menta, manzanilla, peperina e incayuyo desde 0,1 a 0,8 %; boldo y poleo desde 0,024 hasta 0,4 %; cedrón desde 0,12 a 2 % y tilo desde 0,8 a 6,4 %.

Los datos obtenidos indicaron que para detectar la presencia de cada hierbas son necesarios 0,097g de poleo en 100g de yerba mate compuesta; 0,19g de menta y boldo; 0,27g de manzanilla e incayuyo; 0,35g de peperina; 0,6g de cedrón y 1,67g de tilo.

Se puede concluir que el poleo presenta el umbral de identificación mas bajo. Con excepción del tilo y cedrón, son necesarias cantidades menores a 0,40g para que se perciba el sabor de las hierbas en la yerba mate compuesta. Si bien el CAA no fija límites inferiores, los resultados obtenidos hacen suponer que los máximos se ubicaran muy por debajo de los valores permitidos.

ABSTRACT

The product commercialized as compound yerba maté is obtained adding aromatized herbs to yerba maté. The mixture obtained has different flavor of elaborated yerba mate and has good acceptance between an important groups of consumers.

The Argentine Alimentary Code (CAA) allows the uses of herbs of recognized physiological innocuity mixed with yerba maté up to 40% and establish a maximum of 9.5% of water content on dry basis and

2% of insoluble ashes as requirement. The minimum percentage of herbs to be added for the product denominates compound yerba maté, is not established.
The objective of the present work was determinates through a sensory analysis, the minimum percentage (threshold of recognition) of Mentha p., Matricaria r., Minthostachys m., Peumus b, Thilia c., Lippia t., Aloysia t. Lippia i., to be added to yerba maté for the product be defined as compound yerba maté .
Herbs were obtained from a local firm that produces compound yerba maté. Samples of Matricaria r., Tilia c., Peumus b., Aloysa t. and Lippia t. were constituted by leaves and a few branches, whereas samples of Mentha p., Minthostachys m. and Lippia i., had a low leaves content.
The experiments were conducted with a panel of 30 to 50 half trained tasters. The start training was performed through a sequence of triangles tests with Mentha p., because is one of the most wide consumed herb. Each maté contained 15 g of a mix of yerba maté and Mentha p. in decreasing concentrations from 1 to 0.1% in weight.
The threshold determination for each herb was carried out using the method of multiple comparisons with reference, by means of a scale of geometrically increasing concentrations and using a sample of yerba maté free from aromatic herbs as the reference. In the case of lesser-known herbs, a sample of each was handed to the panelists in the days previous to the experiences. The amounts used in the scales (mates with 15 g of the mixture) for Mentha p., Matricaria r., Minthostachys m. and Lippia i. were from 0.1 to 0.8%; for Peumus b. and Lippia t. from 0.024 to 0.4%; for Aloysa t. from 0,12 to 2 % and for Tilia c. from 0,8 to 6,4 %.
The data obtained indicated that to detect the presence of each herb were necessary: 0,097g of Lippia t., 0,19g of Mentha p. and Peumus b.; 0,27g of Matricaria r. and Lippia i.; 0,35g of Minthostachys m.; 0,6g of Aloysa t. and 1,67g of Tilia c. in 100g of compound yerba maté.
It can be concluded that Lippia t. presents the lesser threshold. With the exceptions of Tilia c. and Aloysa t., amounts less than 0.40 g are needed to perceive the flavor of the herbs in compound yerba maté. Even though the CAA does not determine the lower limits, the results obtained suggest that the maximum will lie significantly below the allowed values.

PALABRAS CLAVE: *yerba mate, hierbas, umbrales de reconocimiento.*

KEYWORDS: *yerba maté, herbs, recognition thresholds.*

INTRODUCCIÓN

La yeba mate (*Ilex paraguarienses St. Hill*.) es un producto de consumo muy difundido en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. Su mezcla con hierbas aromáticas permite elaborar la yerba mate compuesta. Las hierbas le confieren un sabor diferente y la mezcla obtenida es aceptada por un grupo importante de consumidores. Los principales países productores y consumidores son Argentina, Brasil y Paraguay. En cuanto a las características que la mezcla debe cumplir difieren de un país a otro, no existiendo una legislación en común en la región del MERCOSUR.
La normativa Argentina permite adicionar hasta un 40 % de hierbas (Código Alimentario Argentino 2000) y la Paraguaya hasta un 15% (INTN 2002), la legislación Brasilera no fija limites (Resolución RDC 277 2005) y las normas Chilenas (Decreto 287/2002) y Uruguaya no definen a este tipo de producto. En cuanto a las hierbas utilizadas el Código Alimentario Argentino (Art.1194-1198) establece que las mismas deben poseer inocuidad fisiológica y que deben agregarse en la forma en que habitualmente son utilizadas. Nombra a 7 de ellas y prevé el uso de otras hierbas que apruebe la autoridad sanitaria. La disposición 1637/2001 del ANMAT menciona a 35 hierbas y las partes de estas que pueden consumirse. La normativa brasilera autoriza el agregado de 48 hierbas. La misma indica el nombre científico y las partes que pueden usarse (Resolución RDC 303 2002). La legislación paraguaya expresa que deben ser de reconocida inocuidad fisiológica y que deben estar autorizadas por el órgano de aplicación (INTN 3500201 2002). Esta normativa es más completa que las argentina y brasilera, ya que establece parámetros organolépticos como olor, color y sabor; parámetros fisicoquímicos como contenido de humedad (máx. 10,3 %), cenizas a 550ºC (máx. 9 %), cenizas insolubles en ácido clorhídrico a 1000 ºC (máx. 1,5 %), extracto acuoso (mín. 25 %), cafeína (mín. 0,6 %), finura expresada como hojas secas y pulverizadas de yerba mate (mín. 65 %), ramas, palos,

hierbas y otros componentes (máx. 35 %), impurezas (máx. 1 %), semillas de yerba mate (máx. 1 %) y parámetros microbiológicos con valores de referencia.
El Código Alimentario Argentino fija como requisitos, para la yerba mate compuesta, un valor máximo de contenido de humedad del 9,5% en base seca y 2 % de cenizas insolubles. No establece el porcentaje mínimo de hierbas que debe ser agregado para que el producto sea definido como tal.
Las hierbas más utilizadas en Argentina en la elaboración de yerba mate compuesta son boldo, menta, cardo santo, poleo, hinojo, cedrón, peperina, incayuyo, tilo, melisa, cola de caballo y manzanilla. Además se adicionan en algunos casos té verde, algas marinas, saborizantes de frutas (naranja, manzana y limón), cáscara de naranja y frutos molidos de rosa mosqueta. En Paraguay se utilizan hierbas como menta (o aceite de menta), burrito, cedrón y boldo. En Brasil se prepara con manzanilla, melisa, hinojo, cedrón y menta entre otras. El producto comercializado bajo esta denominación presenta gran diversidad en sus características organolépticas, dependiendo de su procedencia. En algunos casos no se observa uniformidad en el grado de molienda, contenido de palos y hojas del material.
Existen estudios de isotermas de sorción (Scipioni et al. 2002, 2003) y de otros parámetros fisicoquímicos (Scipioni et al. 2007) y microbiológicos (Jerke et al. 2006) de algunas hierbas utilizadas y de muestras de yerba mate compuesta de distinta procedencia, tales como extracto acuoso, cenizas totales e insolubles en HCl al 10%, y la posible interferencia de metabolitos naturales de las hierbas en la determinación de cafeína por HPLC. Sin embargo no existen investigaciones documentadas tendientes a establecer las cantidades máximas y mínimas de hierbas que debería contener el producto para que, conservando parte de las características de la yerba mate, tenga tal denominación. Un contenido elevado de hierbas podría modificar los caracteres organolépticos alterando su condición de yerba mate.
El objetivo del presente trabajo fue determinar, por medio de un análisis sensorial, el porcentaje mínimo (umbrales de reconocimiento o identificación) de menta, manzanilla, peperina, boldo, tilo, poleo, cedrón e incayuyo que debería utilizarse en mezclas con yerba mate para que el producto se defina como yerba mate compuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La elección de las hierbas se realizó a través de un scrinning de envases de marcas comerciales de yerba mate compuesta. Varios paquetes de 500g fueron adquiridos en góndolas de un supermercado de la ciudad de Posadas. De la lista de hierbas declaradas se seleccionaron las ocho más utilizadas. Las muestras empleadas en las determinaciones fueron provistas en paquetes de 2kg aproximadamente, con su correspondiente rótulo, por una empresa yerbatera de la zona que elabora este tipo de producto. Las de manzanilla, tilo, boldo, cedrón y poleo estuvieron constituidas por hojas con escasos restos de palos, en tanto que las muestras de menta, peperina e incayuyo presentaron un contenido bajo de hojas. La yerba mate utilizada en la preparación de las mezclas (elaborada por la empresa que suministró las hierbas) fue adquirida en un comercio mayorista de Posadas.

Entrenamiento de los panelistas (catadores)

El panel de catadores estuvo integrado por un número de 30 a 50 personas de ambos sexos que consumen yerba mate compuesta o que incorporan hierbas al mate, cuyas edades oscilaron entre 20 y 55 años. El entrenamiento se realizó con una mezcla de yerba mate elaborada y menta. La hierba se eligió considerando que la mayoría de las personas puede detectar su sabor con facilidad y que el flavor de la menta contribuye a incrementar el estado de vigilancia de los jueces (Carpenter 2002). El método utilizado fue el de test de triángulos secuenciales: a cada catador se le entregó un trío de muestras codificadas con números de 3 dígitos, de las cuales dos eran iguales y la tercera diferente. Junto a las muestras se le suministró un termo con agua a 72 $\pm$ 2ºC para realizar la mateada. El panelista debía reconocer la muestra diferente que podía o no contener menta. Las muestras consistieron en 2 grupos de mates, uno con 15g de yerba mate elaborada y el restante con 15g de la mezcla de yerba mate y menta. Las concentraciones de menta utilizadas en las diferentes sesiones fueron: 1%; 0,8%; 0,6%; 0,3% y 0,1% en peso.

Determinación del umbral de identificación

La determinación de la cantidad mínima de hierba a agregar se realizó a través del método de comparaciones múltiples con referencia. A cada panelista se le entregó una bandeja con mates

codificados con números de 3 dígitos que contenían 15g de la mezcla de yerba mate-hierba, y un mate sin codificar con 15g de yerba mate como referencia Las muestras se ordenaron en concentraciones crecientes de hierba en forma geométrica. Un testigo codificado se incluyo entre ellas cambiando su ubicación en las diferentes sesiones. Junto a las muestras se le suministró un termo con agua a 72 $\pm$ 2ºC para realizar la mateada. El catador debía marcar los códigos de los mates en los que percibía el sabor de la hierba en estudio. Las hierbas y sus cantidades mezcladas con yerba mate elaborada se indican en la **Tabla 1**. Estas concentraciones se establecieron en días previos a cada sesión con un número reducido de catadores. Cuando se debió trabajar con hierbas menos conocidas, se suministro a los panelistas una muestra de las mismas en días previos a la sesión correspondiente a fin de que pudieran reconocer su sabor. Para determinar los umbrales de reconocimiento se graficó la frecuencia vs la concentración de la hierba en g /100 g de la mezcla hierba-yerba mate. El umbral correspondió a los g de hierba cuyo sabor fue identificado por el 50% de los catadores.

Tabla 1. Concentraciones de hierbas mezcladas con yerba mate.

Hierbas	Concentración g/100g de mezcla
Menta	00 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8 – 1,6
Boldo	0,0 – 0,025 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,4
Poleo	0,0 – 0,025 – 0,05– 0,1 – 0,2 – 0,4
Peperina	0,0 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8 – 1,6
Manzanilla	0,0 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8
Incayuyo	0,0 – 0,05 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,8
Tilo	0,0 – 0,8 – 1,6 – 3,2 – 6,4
Cedrón	0,0 – 0,012 – 0,025 – 0,05 – 0,1 – 0,2

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Entrenamiento de los panelistas

Durante el entrenamiento se pudo observar lo siguiente: en la sesión inicial, en la que se trabajó con una mezcla de yerba mate y menta al 1% en peso, el 59% de los panelistas pudo identificar la muestra diferente. En las sesiones siguientes se utilizaron mezclas con 0,8% y 0,6% de menta siendo el porcentaje de aciertos de 68% y 72% respectivamente. Esto indico una mejora notable en la capacidad de los catadores para distinguir entre una muestra con la hierba y otra sin ella. Cuando las concentraciones disminuyeron en progresión geométrica a 0,3% y 0,1%, los porcentajes de aciertos fueron menores, del 45% y 21% respectivamente.

Determinación de los umbrales de identificación

Los contenidos mínimos se determinaron graficando la frecuencia (cociente entre el número de catadores que identificó la hierba a una concentración dada y el número total de catadores que participaron de la sesión) en función de la concentración de la hierba en g/100g de mezcla. De esta gráfica se obtuvo el umbral de reconocimiento que correspondió a la concentración de hierba que fue identificada por el 50% de los catadores, es decir que pudieron reconocer el sabor en la mezcla con yerba mate. Las **Figuras 1** y **2** muestran las gráficas de determinación de umbrales para boldo y peperina. De la **Figura1** puede observarse que es necesaria una cantidad mínima de 0,19g de boldo para que se pueda percibir su sabor, en tanto que para peperina se requiere una concentración mínima de 0,35g por 100g de yerba mate compuesta. La **Tabla 2** muestra los umbrales de reconocimiento de las diferentes hierbas estudiadas. En ella se observa que el poleo presentó el umbral mas bajo debido probablemente a la elevada concentración de sus principios activos o la capacidad de éstos para interactuar con los receptores de los sistemas del olfato y gusto. Esta hierba se caracteriza por tener un olor aromático fuerte, sabor picante y aromático. La menta tuvo una concentración umbral de 0,19g similar a la del boldo. Ambas hierbas contienen metabolitos que les otorgan olores y sabores aromáticos y ardientes, y en el caso de la menta, seguido de una sensación de frescura agradable debida a la acción del mentol sobre las papilas gustativas (Alonso y Desmarchelier 2005). La manzanilla, de sabor aromático y olor agradable, y el incayuyo presentaron un umbral de 0,27g. El valor más alto lo mostró el tilo, esto podría deberse a que contiene principios activos que le confieren olor suave y agradable, sabor dulzaíno, mucilaginoso y aromático (Codex medicamentarius argentino 1978), siendo necesaria una cantidad considerable para ser percibida en las mezclas con yerba mate.

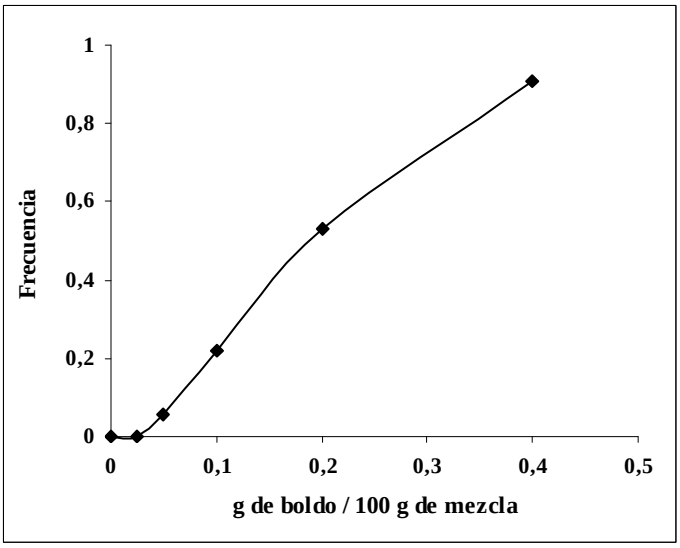


Figura 1. Gráfica umbral para boldo.

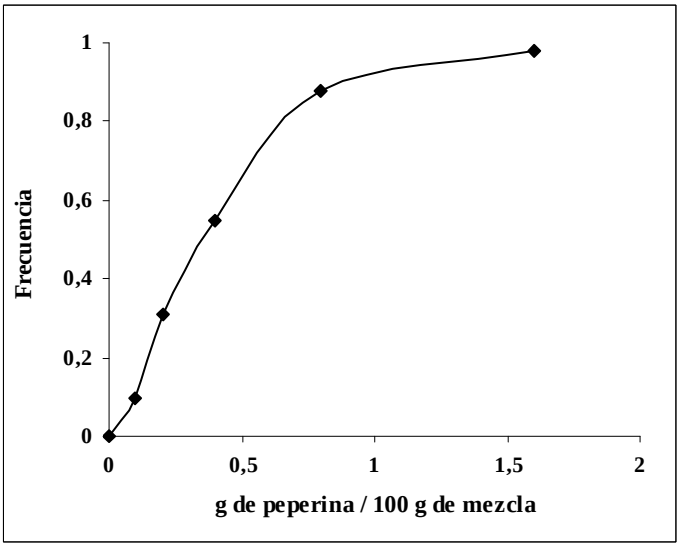


Figura 2. Gráfica umbral para peperina.

Tabla 2. Concentraciones umbral de hierbas adicionadas a la yerba mate compuesta.

Hierba	Concentración umbral (g/100g de mezcla)
Menta	0,19
Boldo	0,19
Poleo	0,095
Peperina	0,35
Manzanilla	0,27
Incayuyo	0,27
Tilo	1,67
Cedrón	0,60

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el poleo presenta el umbral de identificación mas bajo. Con excepción del tilo y cedrón, son necesarias cantidades menores a 0,40g para que se perciba el sabor de las hierbas en la yerba mate compuesta. Si bien el Código Alimentario Argentino no fija límites, estos resultados

podrían servir para incorporar contenidos mínimos de hierbas a partir de los cuales el producto podría ser denominado como yerba mate compuesta.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) que ha subsidiado el proyecto del cual este trabajo forma parte.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso J, Desmarchelier C. 2005. Plantas autóctonas de la Argentina. Buenos Aires. Ed. Fitociencia. Pag.680.

ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. 2001. Disposición 1637/2001. Argentina.

Carpenter RP, Lyon DH, Hasdell TA. 2002. Análisis sensorial en el desarrollo y control de la calidad de alimentos. Zaragoza (España). Editorial Acribia: pág. 60.

Codex medicamentarius argentino. 1978. Sexta Edición. Imprenta del Congreso de la Nación.
Código Alimentario Argentino. Artículos 1194-1198. 2000. Ediciones La Rocca. Buenos Aires: págs. 348-349.

INTN: Instituto Nacional de Tecnología y Normalización. 2002. Norma Paraguaya 3500201. Yerba mate elaborada compuesta: Requisitos generales. 1era edición. Asunción, Paraguay.

INTN: Instituto Nacional de Tecnología y Normalización. 1995. Norma Paraguaya 3500193, yerba mate: Especificaciones. 2era edición. Asunción, Paraguay.

Jerke G, Horianski MA, Bargardi S. 2006. Evaluación micológica de la yerba mate compuesta. 4º Congreso Sudamericano de la Yerba Mate. Posadas, Misiones, págs 72 – 77.

Ministerio de Salud de Chile. 2002. Decreto 287/02. Párrafo II: De la yerba mate. Chile. Pág 102.

Scipioni GP, Ferreyra DJ, Schmalko ME. 2007. Physicochemical Characterization of Different Trademarks of Compound Yerba Maté and their Herbs. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50 (4): 735-741.

Scipioni GP, Benitez JB, Meza BE, Argüello BV. 2003. Isotermas de adsorción de hierbas utilizadas en la elaboración de yerba mate aromatizada. Anais del 3º Congresso Sul-Americano da erva-mate. Chapecó. Brasil, pág. 59.

Scipioni GP, Benitez JB, Argüello BV. 2002. Isotermas de adsorción de hierbas utilizadas en infusiones. IX Congreso Argentino de Ciencia y Tecnologia de los Alimentos. Buenos Aires, Argentina.

Secretaria de Vigilancia Sanitaria-Ministerio de Salud de Brasil. 2005. Resolución RDC 277. Reglamento técnico para café, cevada, cha, erva-mate e produtos solúveis.

Secretaria de Vigilancia Sanitaria-Ministerio de Salud de Brasil. 2002. Resolución RDC 303. Reglamento tecnico para Fixacao e Identidade e Qualidade de Composto da erva-mate.

Estabilidad de emulsiones preparadas con suero de soja y tofu y sus proteínas aisladas

Quiescent stability of o/w emulsions prepared with soy whey, tofu whey and their isolated proteins

Sobral PA (1), Palazolo GG (2), Wagner JR (2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
(2) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina
jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue analizar la estabilidad de emulsiones aceite en agua (o/w) preparadas con suero de soja o de tofu y sus proteínas aisladas. El suero de soja (SS) fue obtenido en laboratorio como sobrenadante isoeléctrico de la preparación de aislado nativo de soja (ANS); el suero de tofu (ST), residual líquido industrial, fue cedido por una empresa local. Ambos sueros fueron liofilizados dando SSL y STL. A partir del SS y ST se aislaron las proteínas PSS y PST respectivamente, por precipitación con acetona en frío y liofilización. A todas las muestras se le determinó el contenido proteico (N×6,25) a fin de preparar dispersiones acuosas de igual concentración proteica. Se prepararon dispersiones de las muestras en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, con una concentración de proteína de 0,1-1 % p/v. Las emulsiones o/w fueron preparadas homogeneizando 10 ml de las dispersiones acuosas con 5 ml de aceite de girasol (Ultraturrax T-25, 20.000 rpm, 1 min., 20ºC). Las emulsiones iniciales resultantes se caracterizaron por difracción láser (distribución de tamaño de partícula) y por turbidimetría (área interfacial creada). La estabilidad de las emulsiones se evaluó por medida de la cinética de separación gravitacional (analizador óptico vertical) y del aceite separado (AS%) por el método de dilución del colorante. Todas las emulsiones iniciales, menos la SSL, mostraron distribuciones similares de tamaño de partícula del tipo bimodal con una población mayoritaria a 50-60 μm; cuando se analizaron sin y con SDS dieron valores D_{43} entre 30 y 40 μm. Las distribuciones correspondientes a la emulsión SSL, medidas sin y con SDS, fueron diferentes debido a la presencia de flóculos estables, lo cual se reflejó en valores de D_{43} sin y con SDS, 70,6 y 45,5 μm, respectivamente y en la baja estabilidad a la separación gravitacional. A una concentración de proteína equivalente, las emulsiones preparadas con sueros fueron siempre menos estables a la separación gravitacional que las elaboradas con sus respectivas proteínas aisladas. Por otra parte, las PST dieron emulsiones más estables a la separación gravitacional que las provenientes de suero de soja obtenido en laboratorio. Según las medidas de AS%, el orden de estabilidad en todas las concentraciones ensayadas fue PST > PSS > STL > SSL. Estos resultados permiten concluir que STL, en el cual las proteínas se encuentran desnaturalizadas, es un mejor agente estabilizante que SSL, del mismo modo que PST lo es respecto de PSS. Las emulsiones de PST fueron precisamente las que exhibieron los valores más altos de área interfacial creada y el menor tamaño de partícula. Las proteínas aisladas de ambos sueros dan emulsiones más estables que los sueros respectivos, indicando un efecto negativo de los componentes no proteicos del suero, como los oligosacáridos y las sales.

ABSTRACT

This article focuses on the quiescent stability of emulsions oil in water (o/w) prepared with soybean whey or tofu whey and their isolated proteins. Soybean whey (SS) was obtained as isoelectric supernatant of the soy isolate preparation; the tofu whey (ST), industrial waste, was given by a local company. Both liquids were freeze-dried giving the samples SSL and STL. The proteins PSS and PST were isolated from SS and ST respectively, by precipitation with cold acetone and freeze-drying. The protein content of each sample was determined (N×6.25) in order to prepare aqueous dispersions of the same protein concentration. Aqueous dispersions of each sample were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, at different protein concentrations (0.1-1% w/v). O/w emulsions were

obtained by mixing 10 ml aqueous dispersions and 5 ml of sunflower oil (Ultraturrax T-25 high-speed homogenizer, 20,000 rpm, 1 min, 20°C). Fresh emulsions were characterized by laser diffraction (particle size distribution, PSD) and turbidimetry (interfacial created area). Emulsion stability was evaluated by measuring the creaming kinetic (vertical optical analyzer) and oiling-off (AS% w/w) by the dye dilution method. All emulsions, with exception of those prepared with SSL, showed similar PSD both in the absence and presence of SDS: a bimodal character, a main particle population at 50-60 μm and D_{43} values in the range 30-40 μm. For SSL emulsions, the PSD measured with and without SDS exhibited noticeable differences (D_{43} = 70.6 and 45.5 μm respectively) due to the presence of stable flocs, which enhanced the creaming. At the same protein concentration, emulsions prepared with soy whey samples were always less stable that those prepared with their isolated proteins. Moreover, PST emulsions were more stable against creaming than those prepared with PSS. On the other hand, AS % decreased in the sequence: PST > PSS > STL > SSL. These results suggest that STL, in which proteins are thermally denatured, is a better stabilizing agent that SSL; similarly, PST is a better emulsifier that PSS. Precisely, PST emulsions exhibited the highest values of interfacial area and the smallest mean particle size. The isolated proteins showed better emulsifying properties than those exhibited by freeze-dried soy and whey. This indicates a negative effect of non-protein components present in the soy whey, as oligosaccharides and salts.

PALABRAS CLAVE: *Emulsiones, estabilidad, soja, sueros, tofu.*

KEYWORDS: *emulsions, soybean, stability, tofu, whey.*

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de la soja, involucra una serie de procesos destinados a obtener componentes de interés tales como aceites, concentrados y aislados proteicos y eliminar o inactivar los componentes indeseables (factores antinutricionales) y fibra. La producción tradicional de aislados consiste en una extracción cercana al 90% del material nitrogenado a partir de la soja en condiciones alcalinas (pH 8-9), con un bajo porcentaje de desnaturalización (Pearson 1983). La separación de componentes insolubles (fibra) produce un extracto que contiene las proteínas de soja, 75% de las cuales son globulinas de reserva y el 25% restante son proteínas biológicamente activas (Cheftel *et al*. 1989), conocidas como proteínas de suero de soja (Sorgentini y Wagner 1999). La acidificación de este extracto hasta el pH isoeléctrico (4,5) permite la precipitación de las globulinas de reserva (7S y 11S) dejando un suero de soja (SS). Otra estrategia que aprovecha las propiedades de agregación e hidratación de las proteínas de reserva de la soja es la elaboración de tofu; hay innumerables recetas y variantes para su obtención pero todas implican una primer etapa de obtención de la leche de soja que consiste en: remojado del poroto (8-10 hs), seguido de una molienda-extracción a 80-90°C en exceso de agua (inactivación de lipoxigenasa), una cocción destinada a la eliminación de volátiles e inactivación de los factores antitrípticos y hemaglutinina (Genta y Álvarez 2006) y la filtración o el prensado para remover las fibras y proteínas insolubles (okara) resultando una dispersión-emulsión proteína-aceite (pH ≈ 6,5, 9 % sólidos totales) la cual se conoce como leche de soja. La segunda etapa es la coagulación de las proteínas de reserva de esta leche mediante el agregado de sales de calcio y magnesio (2-4% del peso original, 10-30 min, entre 70 y 85°C), en algunos casos el empleo de agentes acidificantes como la glucono-δ-lactona, para formar una estructura tipo coagulo-gel, el tofu, quedando un líquido residual conocido como suero de tofu (ST). Ambos sueros, el proveniente de la elaboración de aislados y el de tofu, contienen los hidratos de carbono solubles del grano de soja (mono-, di- y oligosacáridos); siendo los mayoritarios en el suero de tofu, el disacárido sacarosa y los oligosacáridos estaquiosa y rafinosa (Espinosa-Martos *et al*., 2006; Espinosa-Martos y Rúperez 2006); le siguen en abundancia la fracción proteica del suero constituida mayoritariamente por la lectina (L) y los factores antitrípticos de Kunitz y Bowman-Birk y enzimas como la β-amilasa, lipooxigenasa y ureasa (Sorgentini y Wagner 1999). La importancia del aprovechamiento de los sueros de soja reside en parte en que los inhibidores de tripsina, considerados antinutrientes indeseables en la alimentación humana y animal, poseen una vez inactivados correctamente por calor, no sólo buenas propiedades nutricionales (Kishi y Inoue 1987), sino propiedades anticancerígenas (Kennedy 1993, Lin y Ng 2008;) y en el caso particular del factor de Bowman-Birk, propiedades estimulantes del sistema

inmune (Harms-Ringdahl *et al.* 1979). Adicionalmente, estos sueros contienen compuestos potencialmente valiosos tales como los oligosacáridos con propiedades prebióticas (Tomomatsu 1994) y las isoflavonas, genisteina y daidzeina, fitoestrógenos de reconocidos efectos beneficiosos para la salud encontradas en niveles importantes en el suero de tofu (Espinosa-Martos *et al*. 2006). Los procesos industriales generan grandes cantidades de estos sueros, que debido a su carga orgánica, representan un problema ambiental para su descarte en forma directa. Han sido poco estudiados como producto integral, aun cuando ya se ha informado que las proteínas nativas y desnaturalizadas de suero de soja preparadas a nivel de laboratorio, poseen propiedades superficiales que pueden aplicarse en alimentos (Sorgentini y Wagner 2002, Mitidieri y Wagner 2002, Palazolo *et al*. 2004, 2005). Recientemente, Matemu *et al*. (2009) informaron sobre las propiedades emulsificantes de proteínas glicosiladas preparadas por ultrafiltración a partir de suero de tofu. Excepto este trabajo, no hay información sobre las propiedades emulsificantes de las proteínas aisladas del suero de tofu y menos aun de este suero como tal.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades de formación y estabilización de emulsiones aceite en agua (o/w) de sueros de soja de laboratorio y de tofu deshidratados y de sus proteínas aisladas a fin de evaluar la influencia de la de posibles aplicaciones en la industria alimenticia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El suero de soja (SS) fue obtenido como el sobrenadante isoeléctrico en la preparación de aislado nativo de soja (ANS), según el procedimiento descrito por Sorgentini y Wagner (1999). La harina de soja desgrasada (Prosam R) fue provista por Solae S.A. (Brasil). El suero de tofu (ST) fue provisto por una industria local (Soyana S.H.). Ambos sueros fueron liofilizados resultando las muestras SSL y STL, respectivamente.

Métodos

Preparación de proteínas

Se prepararon a partir de SS y ST mediante precipitación con acetona a 0°C (relación acetona: suero 1:1 v/v), separadas por centrifugación (10.500g, 4°C, 20 min) y liofilizadas, resultando **PPS** (proteínas de suero de soja) y PST (proteínas de suero de tofu). Se estimó el contenido de proteína bruta (Kjeldahl, N×6,25) de todas las muestras (sueros y proteínas aisladas) a fin de preparar emulsiones con niveles de proteína comparables.

Determinación del grado de glicosilación (GG)

Se calculó a partir del contenido de proteínas (Lowry *et al.* 1951) e hidratos de carbono (Dubois *et al.* 1956) en dispersiones acuosas de las proteínas aisladas (10 mg/ml) y expresado como mg carbohidratos/100 mg proteína.

Preparación de emulsiones

Se prepararon dispersiones de cada muestra en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 con un contenido de proteína 1-10 mg/ml. Las emulsiones o/w se prepararon homogeneizando 10 ml de dispersión con 5 ml de aceite de girasol (Molinos Río de la Plata, Argentina) a 20.000 rpm (1 min, 20 ± 2ºC) con rotor S25N-10G conectado a un homogeneizador Ultraturrax T-25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania).

Caracterización de las emulsiones

El índice de actividad emulsificante (IAE) se determinó por turbidimetría (Pearce y Kinsella 1978). IAE se calculó como $4{,}606 \times A \times D / L \times \phi \times C$; C es la concentración proteica en g/m^3; A, la absorbancia a 500 nm; D, el factor de dilución (sin unidades); L, el camino óptico (en m) y ϕ, la fracción volumétrica de la fase dispersa. Por dispersión láser se determinó la distribución de tamaño de partícula (expresada en % volumen) y el diámetro promedio de partícula D_{43} con un equipo Malvern Mastersizer (Malvern Instruments Limited., Worcestershire, Reino Unido). Las determinaciones se llevaron a cabo realizando una dilución (1/2 v/v) con el buffer de la fase acuosa o con buffer Tris/HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo 1% p/v de SDS para asegurar la completa defloculación de la emulsión (Antón *et al.* 2002). Para las emulsiones recién preparadas, se calculó el grado de floculación (GF %) como: $GF_i\ \% = [(D_{4,3\ i\ -SDS} - D_{4,3\ i\ +SDS})/D_{4,3\ i\ +SDS}] \times 100$; $D_{4,3\ i\ -SDS}$ y $D_{4,3\ +\ SDS}$ son los diámetros promedio de las emulsiones iniciales medidos en ausencia y presencia de SDS, respectivamente.

Estabilidad de las emulsiones

La estabilidad global se analizó con un analizador óptico vertical (Quick Scan, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA). Las emulsiones recién preparadas se colocaron en la celda cilíndrica de vidrio (80 mm) para registrar los perfiles de backscattering (BS %) en función de la altura en la celda. Los perfiles de BS % se registraron durante 60 minutos a intervalos de 1 minuto, con una medida final a las 24 horas de almacenamiento. Para analizar el efecto de la floculación, se prepararon las emulsiones de forma habitual agregándose luego de la homogeneización SDS 10 % p/v en el buffer de la muestra, necesario para alcanzar un valor de 0,1 % p/p del detergente en la fase acuosa. La cinética de separación gravitacional se evaluó a partir de la variación de los valores promedio de BS % en la parte inferior del tubo de medida (10-20 mm). La constante cinética de separación gravitacional (K) provee información sobre la velocidad con la que se desarrollan el proceso de separación gravitacional en los estadios iniciales se definió por medio de la expresión: $K = [10^3/ (BS_{0\ prom}\ \% \times t_{1/2})]$ donde $BS_{0\ prom}$ % es el valor promedio inicial de BS (correspondiente al perfil inicial) y $t_{1/2}$ es el tiempo para el cual BS $_{prom}$ % = 0,5×$BS_{0\ prom}$ %. El aceite separado (%AS) de las emulsiones al ser sometidas a centrifugación se determinó siguiendo el procedimiento experimental descrito por Palanuwech *et al*. (2003) con leves modificaciones. En tubos de centrífuga de plástico se agregaron 8 g de emulsión recién preparada y 2 g de solución de Sudan III 0,001 % p/p en aceite de girasol, se mezcló por inversión suave, se incubó (60 min, 20 ± 2ºC) y se centrifugó a baja velocidad (5 min, 250 g a 20º C), para minimizar la coalescencia de la emulsión (Thanasukarn *et al.*, 2004). El aceite separado porcentual (AS%) se calculó empleando la siguiente expresión: $AS\% = [M_O \times (A-1)/(M_E \times \phi_m)]$, donde M_O: masa de solución del colorante; A: relación de las absorbancias a 508 nm antes y después de la extracción; M_E: masa de emulsión; ϕ_m: fracción en masa del aceite en la emulsión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de proteína bruta (N×6,25) de las muestras utilizadas como agentes emulsificantes dio los siguientes valores: ANS (90,75 ± 0,25 % p/p), PSS (54,25 ± 2,13 % p/p), PST (40,54 ± 1,17 % p/p), SSL (16,29 ± 0,01 % p/p) y STL (15,31 ± 0,18 % p/p). El bajo contenido de proteínas en los sueros de soja deshidratados confirma que los componentes mayoritarios en estos subproductos son los hidratos de carbono, con un contenido superior al 50% (Sobral y Wagner 2009). Las proteínas obtenidas a partir de estos sueros no superan el 55% de proteína bruta debido a la presencia de hidratos de carbono; el grado de glicosilación para PSS y PST fue 22,4 y 21,2, respectivamente. Debido a las diferencias en el contenido proteico entre sueros y proteínas aisladas se optó por preparar las emulsiones a la misma concentración de proteína en la fase acuosa y no en base a cantidad de muestra equivalente.

Cuando las emulsiones se prepararon con un contenido de proteína de 5 mg/ml en la fase acuosa, las distribuciones de tamaño de partículas medidas en presencia de SDS para las emulsiones de sueros liofilizados (SSL, STL), y de proteínas aisladas (PSS y PST) fueron similares a la del aislado (ASN), en cuento a su carácter bimodal y a que presentan una población principal de partículas, con un máximo a 50-60 μm. Cuando las medidas se realizaron sin SDS, sólo la emulsión SSL exhibió una diferencia importante en la distribución (**Figura 1**) que evidencia la presencia de flóculos estables en las condiciones de medida. En esta misma figura se observó que la emulsión SSL fue la de menor estabilidad durante el almacenamiento; la aparición de una población de partículas superior a 150 μm hizo crecer el valor D_{43} a 106,5 μm. La **Tabla 1** muestra que los valores de D_{43} de ANS, PSS, PST y STL estuvieron en el rango 30-40 μm, tanto en presencia como en ausencia de SDS; en tanto que para SSL el valor D_{43} medido sin y con SDS fue de 70,6 y 45,5 μm, respectivamente, debido a una tendencia a la formación de gotas grandes y floculadas. El grado de floculación en la emulsión preparada con esta muestra fue 5 veces superior al de la emulsión STL (**Tabla 1**). Por otra parte, las emulsiones preparadas con los sueros presentaron un mayor grado de floculación que cuando se utilizan sus respectivas proteínas aisladas. Es probable que los componentes no proteicos presentes en los sueros tales como oligosacáridos y las sales contribuyan a la desestabilización de las emulsiones formadas. Si se comparan las emulsiones preparadas con proteínas aisladas, resulta que el grado de floculación fue más de 10 veces superior con las proteínas aisladas de tofu (PST) que cuando se emplean PSS. Dado que en la preparación del tofu por coagulación de la leche de soja se emplean sales de calcio, este catión se encuentra en alta concentración en PST. El contenido de calcio (% p/p)

en las proteínas aisladas, determinado por espectroscopía de absorción atómica en las muestras mineralizadas, resultó: $9{,}23\times10^{-3}$, 1,09 y 6,96 para ANS, PSS y PST, respectivamente. En base a estos resultados, es evidente que la tendencia a la floculación de las emulsiones puede tener una relación con el contenido de calcio en las proteínas empleadas.

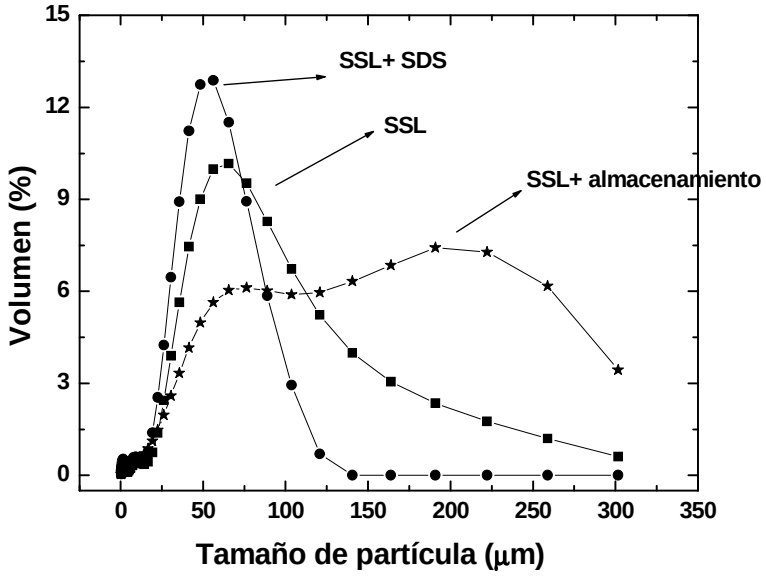


Figura 1. Distribución de tamaño de partícula en volumen de una emulsión elaborada con una dispersión SSL, conteniendo 5 mg/ml de proteína. + SDS: indica la medida en presencia del detergente (disociación de flóculos). + almacenamiento: indica la medida en la misma emulsión después de un almacenamiento a T_{amb} durante 8 hs.

Tabla 1. Valores de diámetro promedio de partícula (D_{43}) determinados sin (-) y con SDS (+), grado de floculación estimado a partir de estos valores (GF) y área creada (IAE) en emulsiones o/w preparadas con distintas muestras proteicas de soja.

Muestra	SDS	D_{43} (μm)	GF (%)	IAE (m^2/g)
SSL	-	70,6	55,0	
	+	45,5		21,3
STL	-	35,4	10,7	
	+	32,0		27,6
PSS	-	39,6	0,6	
	+	39,4		30,8
PST	-	37,1	9,2	
	+	34,0		37,7
ANS	-	40,3	3,6	
	+	38,9		34,4

Los valores de IAE (que dan una idea del área creada durante la emulsificación), dieron una información que no coincide con la resultante de las distribuciones de tamaño de partícula en presencia de SDS (**Tabla 1**). El IAE fue mayor en las emulsiones con las proteínas aisladas que con los sueros liofilizados. Entre las proteínas aisladas analizadas, el IAE fue máximo cuando las proteínas se aislaron a partir de un producto tratado térmicamente (suero de tofu), en comparación con las obtenidas desde uno sin tratar (suero de soja), en tanto el IAE del ANS mostró un valor intermedio. La misma tendencia se observó al analizar el IAE cuando se utilizan los sueros liofilizados como agentes emulsificantes; nuevamente este parámetro fue más elevado cuando se utiliza un producto con sus proteínas desnaturalizadas (STL) que cuando se parte de un suero sin tratamiento térmico (Sobral y Wagner 2009). Evidentemente, la desnaturalización provocada por el tratamiento térmico produce una

mejora en la actividad interfacial de las proteínas del suero de soja. Si bien hay evidencias de que el grado de glicosilación y el tipo de hidratos de carbono ligados a las proteínas de suero de tofu modifica sus propiedades emulsionantes (Matemu *el al*. 2009), en nuestro caso, no parece ser un factor determinante dado que PST y PSS presentaron grados similares de glicosilación.

La estabilidad global de las emulsiones se evaluó a partir de los perfiles de backscattering (BS) registrados en el analizador Quick Scan. La modificación de los perfiles en función del tiempo (datos no mostrados) en todas las emulsiones son los típicos de un proceso de separación gravitacional: en la zona inferior del tubo de medida se observa un corrimiento de los perfiles hacia la derecha, atribuible al empobrecimiento de gotas de aceite por migración de las de mayor diámetro hacia la parte superior del tubo; en tanto que en la parte superior se observa la formación de la fase crema con un incremento constante del BS si no hay simultáneamente coalescencia ni colapso de espuma, en caso de que ésta se haya formado durante el proceso de homogenización (Palazolo *el al.* 2005).

La cinética de separación gravitacional se evaluó a partir de la variación de los valores promedio de BS en función del tiempo. Como ejemplo se muestra en las **Figuras 2 a** y **b** las cinéticas para las emulsiones de ANS y PST, respectivamente, a tres niveles de concentración proteica. Los valores de la constante cinética de cremado-floculación (K) para todas las muestras ensayadas se muestran en la **Tabla 2**. Dicha constante cinética adquiere un valor mayor cuando el grado de desestabilización crece (Palazolo *el al.* 2004); en base a esto, el incremento en la concentración de proteína entre 1 y 5 mg/ml condujo a la formación de emulsiones más estables para todas las muestras. El incremento mayor en la cantidad de proteína (de 5 hasta 10 mg proteína/ml en fase acuosa) produjo la desestabilización de las emulsiones elaboradas con sueros o con sus proteínas aisladas, que no se observó en la emulsión ANS. Para las emulsiones preparadas con PSS (sin tratamiento térmico) se postula un mecanismo de desestabilización mediado por flóculos, que se evidencia al tratar dichas emulsiones con SDS. Dicho tratamiento produjo una notable estabilización, la cual se reflejó en una disminución de casi 13 veces en los valores de K. El rol de la floculación en el proceso de separación gravitacional se pudo visualizar por la clarificación de la zona inferior del tubo, lo que indica la participación en la formación de los flóculos tanto de las gotas grandes como de las más pequeñas. El elevado grado de floculación en las emulsiones preparadas con SSL condujo a clarificación tan rápida (3-10 min) que no permitió evaluar la constante K. La estabilidad a la separación gravitacional resulta ser decreciente en el siguiente orden: ANS > PST > PSS > STL >> SSL.

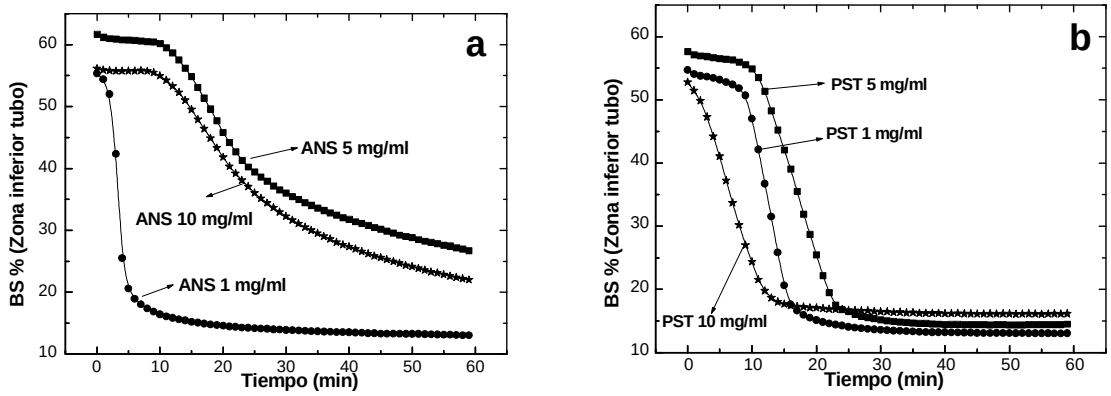


Figura 2. Variación del backscattering promedio (BS $_{prom}$ %) en los perfiles registrados con un analizador óptico vertical (Quick Scan) en la zona inferior del tubo. a: Emulsiones de aislado nativo de soja (ANS); b: Emulsiones de proteína de suero de tofu (PST); en ambos casos las emulsiones fueron preparadas con dispersiones con un contenido de proteína de: 1 mg/ml (●●●●●●), 5mg/ml (■■■■) y 10mg/ml (******).

Tabla 2. Constante cinética de separación gravitacional (K) de emulsiones preparadas con tres niveles de concentración de proteína.

Muestra	Concentración proteica (g/l)	Agregado de SDS	K ($\times 10^3$) (min^{-1})
ANS	1	-	1,82
	5	-	0,38
	10	-	0,47
STL	1	-	5,84
	5	-	2,77
	10	-	3,11
PST	1	-	2,33
	5	-	0,92
	10	-	2,06
PSS	1	-	2,47
	5	-	1,56
	10	-	6,64
	10	+	0,50

Al analizar el porcentaje de aceite separado (% AS) como consecuencia de la coalescencia inducida por centrifugación, se pudo corroborar que las emulsiones preparadas con ANS son muy estables, dando valores de AS de 1,15 ± 0,39; 0,53 ± 0,28 y 0,12 ± 0,05 % para 1, 5 y 10 mg proteína/ml, respectivamente. Si se comparan estos valores con los determinados en las emulsiones de sueros de soja o de sus proteínas aisladas (**Figura 3**), queda claro que: a) las proteínas desnaturalizadas y ricas en calcio presentes en PST tienen la capacidad de estructurar la película interfacial que rodea a las gotas, y dar una estabilidad a la coalescencia similar a las proteínas de reserva del aislado nativo, aun a concentraciones proteicas tan bajas como 1 mg/ml; b) en la muestra PSS y en mayor grado en los sueros STL y SSL se observa una fuerte influencia de la concentración proteica sobre la estabilidad, requiriéndose concentraciones de proteína superiores a 5 mg/ml para lograr reducir el aceite separado a valores inferiores a 2 %. A la misma concentración proteica, las emulsiones preparadas con estas muestras resultaron con una estabilidad a la separación de aceite, con el mismo orden que el observado para IAE y para la estabilidad a la separación gravitacional.

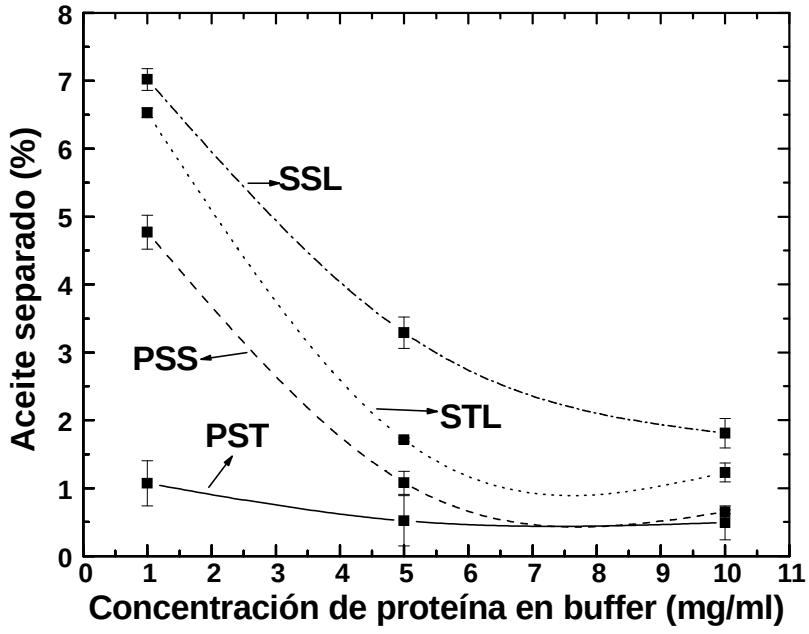


Figura 3. Cuantificación del aceite separado de emulsiones conteniendo 1, 5 y 10 mg/ml de proteína en la fase acuosa. (——): proteína de suero de tofu; (-----): proteína de suero de soja; (·····): suero de tofu liofilizado y (-·-·-·-): Suero de soja liofilizado.

CONCLUSIONES

Las proteínas de suero de soja son mejores agentes emulsificantes cuando se encuentran aisladas. La presencia de componentes no proteicos en los sueros, tales como oligosacáridos y sales, reduce la actividad emulsionante de dichas proteínas y ejerce un efecto desestabilizante una vez que las emulsiones están formadas.

Las emulsiones preparadas con el subproducto industrial proveniente de la fabricación del tofu (suero de tofu) son más estables que las preparadas con el suero de soja obtenido en el laboratorio.

Las proteínas aisladas a partir del suero de tofu dan emulsiones más estables que las aisladas a partir del suero de soja, debido a que están desnaturalizadas térmicamente y tienen alto contenido de calcio, cambios generados como parte del procesamiento industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo dado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios PICT 2002-09-10768 y PICTO-UNQ 2006-36473 y en forma especial, el apoyo financiero de la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad Nacional de Quilmes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Antón M, Beaumal V, Brossard C, Llamas G, LeDenmat M. 2002. Droplet flocculation and physical stability of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. En: Anton M, editor. Food emulsions and dispersions. Kerala: Research Signpost. pag 15-28.

Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. 1989. Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas. Zaragoza: Editorial Acribia. pag 257-275.

Dubois M, Gilles KH, Hamilton J, Rebers F, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 349–356.

Espinosa-Martos I, Préstamo G, Rupérez P. 2006. Composición y Propiedades del Suero de Soja, un subproducto de la elaboración del tofu. Alimentaria, marzo: 72-73.

Espinosa-Martos I, Rúperez P. 2006. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. Nutrición Hospitalaria, 21: 92-96

Genta ML., Álvarez N. 2006. CET Revista de Ciencias Exactas e Ingeniería (On line) Extensión 28, 1

Harms-Ringdahl M, Forsberg J, Fedorcsák I., Ehrenberg L. 1979. Trypsin inhibitory activity of a polypeptide isolated from red kidney beans that also enhances lymphocyte stimulation. Biochememical and Biophysical Research Communications, 86: 492-499.

Kennedy AR 1993. Anticarcinogenic activity of protease inhibitors. En: Troll W, Kennedy A, editores. Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents. New York: Plenum Press. pag 9-64

Kishi K, Inoue G. 1987. Improvement of nutritional quality. En: Inoue G, editor. Soy protein in human nutrition. Osaka: International Symposium pag. 45-57.

Lin P, Ng. TB. 2008. A stable trypsin inhibitor from chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities. Process Biochemistry, 43: 993-998.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Rondall, RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265–275.

Matemu, AO, Kayahara H, Murasawa H, Nakamura S. 2009. Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. Food Chemistry, 114: 1328-1334.

Mitidieri FE, Wagner JR. 2002. Coalescence of o/w emulsions stabilized by whey and isolate soybean proteins. Influence of thermal denaturation, salt addition and competitive interfacial adsorption. Food Research International, 35:547-557

Palanuwech J, Potineni R, Roberts RF, Coupland JN. 2003. A method to determine free fat in emulsions. Food Hydrocolloids, 17: 55-62.

Palazolo GG, Sorgentini DA, Wagner JR. 2004. Emulsifying properties and surface behavior of native and denatured whey soy proteins in comparison with other proteins. Creaming stability of oil-inwater emulsions. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81: 625–632.

Palazolo GG, Sorgentini DA, Wagner JR. 2005. Coalescence and flocculation in o/w emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy protein isolates. Food Hydrocolloids, 19: 595-604.

Pearce KN, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of food proteins: evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26: 716–723.

Pearson AM. 1983. Soy proteins. En: Hudson BJF, editor. Developments in Food Protein second edition. Londres: Applied Science Publications. pag 67-108.
Sobral PA, Wagner JR. 2009. Relación entre la composición y la actividad antitríptica de sueros de soja y el comportamiento térmico de sus proteínas Aisladas. Información Tecnológica, 20 (5): en prensa.

Sorgentini DA, Wagner JR. 1999. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins. Journal of Food Biochemistry, 23: 489-507.

Sorgentini DA, Wagner JR. 2002. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. Food Research International, 35: 721-729.

Thanasukarn P, Pongsawatmanit R, McClements DJ. 2004. Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids, 18: 1033-1043.

Tomomatsu H. 1994. Health effects of oligosaccharides. Food Technology, october: 61-65.

Propiedades físicas y texturales de manzanas deshidratadas

Physical properties and texture of dried apples

[1]Sosa N, [2,*]Salvatori D y [1,*]Schebor, C

[1]Departamento de Industrias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. (1428) Ciudad de Buenos Aires. Argentina. nsosa@di.fcen.uba.ar
[2]Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Buenos Aires 1400, (8300) Neuquén. Argentina.
(*) Miembros de CONICET, Argentina

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de diferentes pretratamientos y métodos de deshidratación sobre las propiedades físicas y texturales de discos de manzana. Se utilizaron tratamientos de escaldado e infusión seca en sacarosa (IS) previos al secado. La deshidratación se realizó por secado en corriente de aire y liofilización. Las muestras se humidificaron entre 11 y 43% HR a 20ºC. Se determinó el contenido de agua y la temperatura de transición vítrea (T_g). La movilidad molecular se relacionó con los tiempos de relajación T_2 analizados por RMN. Se evaluó la firmeza a través de la fuerza máxima ($F_{máx}$) obtenida mediante ensayos de punción. Las muestras escaldadas y control presentaron comportamientos similares en cuanto a la isoterma de sorción de agua y a las T_g, para ambos tipos de deshidratación. Las muestras IS presentaron isotermas de sorción diferentes lo cual podría deberse a la formación de una costra superficial en los discos durante el secado en corriente de aire. El tiempo T_2 se puede relacionar con la movilidad molecular de los sólidos y del agua asociada a los mismos. Se observó un aumento de T_2 con el aumento de HR. Las muestras liofilizadas presentaron valores de T_2 mayores que las secadas en aire, aunque no se observaron diferencias entre pretratamientos. Independientemente del método de secado, las muestras IS presentaron valores de T_2 menores, probablemente debido a su menor contenido de agua. El método de deshidratación afectó la respuesta mecánica, si bien las muestras presentaron una baja resistencia a la punción. En las rodajas liofilizadas control no se presentaron diferencias importantes en los valores de $F_{máx}$ con el aumento de HR, pero los picos ocurrieron a mayores distancias de penetración, mostrando matrices más deformables. Las muestras IS liofilizadas presentaron valores mayores de $F_{máx}$, con picos más abruptos, particularmente a valores bajos de HR. La costra formada durante el secado por aire de las manzanas IS generó un material de mayor dureza (> $F_{máx}$). El escaldado no causó diferencias importantes en las propiedades analizadas. El pretratamiento IS modificó significativamente la sorción de agua de las muestras, lo cual se vio reflejado en la disminución de T_2 y en el aumento de $F_{máx}$. Los resultados obtenidos permiten interpretar las diferencias entre los distintos pretratamientos y métodos de deshidratación, contribuyendo así a la elección de tecnologías de procesamiento de frutas deshidratadas organolépticamente aceptables para su consumo directo o su incorporación en alimentos compuestos.

ABSTRACT

The objective of this work was to analyze the effect of different pretreatments and dehydration methods on physical and textural properties of apple discs. Blanching and sucrose infusion (IS) were applied before drying. Dehydration was performed by freeze- and air-drying. Samples were humidified between 11 and 43% RH at 20ºC. Water content and glass transition temperature (T_g) were determined. Molecular mobility was related to relaxation time T_2 analyzed by NMR. Firmness was evaluated through the maximum force (F_{max}) obtained through puncture assays. Blanched and control samples behaved similarly regarding water sorption and T_g for both types of dehydration. IS samples showed different water sorption isotherms, probably because of the formation of a crust on the surface of the discs during air drying. Relaxation time T_2 could be related to the molecular mobility of solids and tight bound water. An increase of T_2 was observed along with an increase in RH. Freeze-dried samples showed higher T_2 values than those for air dried samples, although there were no differences between pretreatments. IS samples always presented lower T_2 values, probably because they had lower

water contents. The dehydration method affected the mechanic behavior, although samples offered low resistance to penetration. The increase in RH did not cause significant differences in the F_{max} values of freeze-dried discs, but the peaks occurred at larger penetration distances, showing more deformable matrices. Freeze-dried IS samples showed higher F_{max} values, with sharper peaks at lower RH values. The crust formed during air-drying generated a harder material ($>F_{max}$). Blanching did not cause important changes in the analyzed properties. IS pretreatment significantly modified the water sorption behavior, which was reflected in the T_2 decrease and the F_{max} increase. The results allow interpreting the differences between different pretreatments and dehydration methods, contributing to the choice of processing technologies of organoleptically acceptable dehydrated fruits for direct consumption or for their incorporation into compound foods.

PALABRAS CLAVE: *manzanas, secado, liofilización, propiedades físicas, textura.*

KEYWORDS: *apples, dehydration, freeze-drying, physical properties, texture.*

INTRODUCCIÓN

La utilización de tratamientos previos a la conservación de frutas permite la obtención de productos con características organolépticas más similares a la de los productos frescos originales. En métodos tradicionales de conservación como el secado, un escaldado previo tiene como función principal inactivar las enzimas responsables del pardeamiento enzimático. Una infusión con azúcares puede afectar significativamente los intercambios de agua y soluto, permitiendo la depresión parcial de la actividad de agua de la fruta antes de pasar a la etapa final de deshidratación. Se consiguen así productos más dulces y con mejores atributos de calidad que los obtenidos sin pretratamientos (Alzamora *et al.* 1998, Torregiani y Bertolo 2002). La textura es uno de los parámetros que se modifica sustancialmente durante estos procesos, así como también otras propiedades físico-químicas como la temperatura de transición vítrea (T_g) y la movilidad molecular de los sólidos y el agua asociada a los mismos.

Un material no cristalino puede existir en el estado vítreo o en el estado líquido sobre-enfriado (gomoso) dependiendo de la temperatura y de la presencia de agua. El cambio entre estos dos estados, se conoce como transición vítrea. Una interesante aplicación del estudio de la transición vítrea es el entendimiento de las propiedades mecánicas de sistemas alimenticios, y la explicación de los cambios que ocurren durante el procesado y almacenamiento de los alimentos (Nelson y Labuza 1994). Los materiales sobre-enfriados están en un estado de no equilibrio y exhiben cambios dependientes del tiempo a medida que se acercan al equilibrio. De esta forma, pueden ocurrir cambios en sus propiedades mecánicas o en la difusión de moléculas (Roos *et al.* 1996). Los cambios en las propiedades mecánicas pueden producir el fenómeno de colapso, que es la resultante de un cambio en la viscosidad, y provoca cambios estructurales, pegajosidad, apelmazamiento y pérdida de porosidad (White y Cakebread 1966, Bellows y King 1973, Tsourouflis *et al.* 1976, To y Flink 1978 a y b, Flink 1983, Levine y Slade 1988, Slade y Levine 1991). En el caso particular de alimentos de baja humedad, el estado vítreo provee una textura firme y crujiente y se caracterizan por tener una fractura quebradiza. Cuando estos productos absorben humedad se pierden las propiedades de crujencia y rigidez del producto y la fractura puede tener lugar con flujo plástico, denominado comportamiento dúctil (Dobraszczyk y Vincent 1999). Este efecto deteriorativo se debe al efecto plastificante del agua y está gobernado por la transición vítrea (Slade y Levine 1991, Ablett *et al.* 1993).

Un parámetro habitualmente utilizado para la evaluación de las propiedades mecánicas es la firmeza o dureza, definida como la resistencia de un material a la deformación o penetración (Szeczesniak 1973, Watada 1995). En productos deshidratados, la pérdida de firmeza o crujencia se puede analizar a través del test de punción, utilizado ampliamente para medir la textura de frutas (Harker *et al.* 1996, Roudaut *et al.* 2002).

La movilidad molecular se puede estimar mediante los tiempos de relajación de la magnetización nuclear (H^1 RMN). El experimento de RMN consiste en inducir la transición entre niveles de energía correspondientes a la magnetización de núcleos atómicos. Luego de la excitación, los espines de los núcleos retornan al estado de equilibro por procesos de transiciones no radiactivas, llamados en conjunto procesos de relajación. La señal obtenida de la recuperación o decaimiento es una característica de los procesos de relajación (Colquhon y Goodfellow 1994). La relajación espín-espín

se realiza a través de núcleos vecinos. Esta relajación generalmente es un proceso de disminución exponencial de primer orden que se caracteriza con un tiempo de relajación T_2. Para sólidos cristalinos o líquidos muy viscosos el fenómeno de relajación espín espín es más eficiente y los tiempos son muy pequeños (10^{-4} s). Cuanto menor es la viscosidad de la muestra más largos son estos tiempos.
La evaluación de estas propiedades, es de gran importancia no sólo durante el procesamiento sino también en el almacenamiento, tanto para control de calidad del producto, como también como herramienta para el análisis de procesos con vistas a definir, ajustar u optimizar la tecnología adecuada a cada matriz vegetal.
El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de diferentes pretratamientos y métodos de deshidratación sobre las propiedades físicas y texturales de discos de manzana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se emplearon manzanas (variedad Granny Smith) obtenidas en el mercado local y almacenadas a 4ºC hasta el momento de su utilización. Las manzanas fueron lavadas, peladas y cortadas en discos (30 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor).

Pretratamientos

Escaldado. Se realizó en vapor de agua a 90ºC durante 90 segundos y posterior enfriamiento en agua a 4 ºC.
Infusión seca (IS). Se preparó una mezcla de sacarosa (calculada para alcanzar una actividad de agua final de 0,85) y conservadores como sorbato de potasio y bisulfito de sodio agregados como agentes antimicrobianos e inhibidores del pardeamiento enzimático.

Métodos de secado

Liofilización. Los discos de manzana se sumergieron en nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 48 horas en un liofilizador Alpha 1-4 LD/2-4 LD-2 (Martin Christ, Gefriertrocknungsaniagen GmbH). Las condiciones de operación del equipo fueron una temperatura de -84°C y una presión de 0,04 mbar en la cámara.
Secado en corriente de aire. Se utilizó una estufa con convección de aire a 60ºC y 10% HR. Las muestras se secaron durante 24 horas.

Humidificación

Luego del secado las muestras se humidificaron a distintas humedades relativas en presencia de soluciones salinas saturadas en un rango de 11 a 43% HR (Greenspan 1977).

Determinación del contenido de agua

Se realizó por diferencia de peso antes y después de secar las muestras en una estufa de vacío a 60ºC en presencia de perclorato de magnesio (desecante).

Determinación de transiciones térmicas

Las transiciones vítreas se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (valores onset) empleando un calorímetro DSC 822^e Mettler Toledo (Schwerzenbach, Switzerland). El instrumento se calibró con indio (156,6ºC), plomo (327,5ºC) y zinc (419,6ºC). Las mediciones se realizaron a 10ºC/minuto en cápsulas de aluminio selladas (empleando como referencia una cápsula vacía y perforada). Los termogramas se evaluaron con el programa Mettler Star^e.

Estimación de la movilidad molecular:

Se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear (^{1}H-NMR) resuelta en el tiempo, para estimar la movilidad molecular de los sólidos y el agua de las muestras. Se empleó un equipo Bruker Minispec mq20 (20 MHz) (Bruker Biospin GimbH, Rheinstetten, Alemania). Los tiempos de relajación espín-espín (T_2) se midieron utilizando el método de libre decaimiento de la inducción (FID) luego de aplicar un pulso de 90º. Las curvas de decaimiento se ajustaron con un modelo monoexponencial según la siguiente ecuación:

$$I = A \exp(-t/T_2)$$

donde I representa la señal de intensidad de los protones, T_2 corresponde a los protones de las cadenas poliméricas de la muestra y A es la señal de intensidad de los protones en el estado T_2. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las rodajas de manzana se analizaron mediante un ensayo de punción utilizando una máquina de ensayos universales (INSTRON Testing Machine, modelo 3344USA) con una punta de penetración cilíndrica de 4 mm de diámetro y a una velocidad de penetración de 50 mm/min. A través de las curvas fuerza-distancia obtenidas se determinó la fuerza máxima de rotura ($F_{máx}$) para evaluar la firmeza o dureza del material. Se realizaron 10 repeticiones por cada condición experimental.

El ensayo de punción se realizó en las muestras en un rango de HR entre 11 y 43%, sin embargo, a 43% HR, sólo se obtuvieron datos de las muestras IS (tanto liofilizadas como secadas en corriente de aire). Esto se debe a que el resto de las muestras se ablandaron notablemente y no pudieron ser ensayadas adecuadamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestran los valores de temperatura de transición vítrea (T_g) y contenidos de agua obtenidos para manzanas deshidratadas por liofilización (**a**) y secado en corriente de aire (**b**) luego de ser sometidas a los pretratamientos de escaldado e infusión seca de sacarosa y una muestra control. El escaldado no causó diferencias importantes en las propiedades de sorción de agua ni en la T_g en función de la HR. El pretratamiento IS modificó la sorción de agua de las muestras de manera diferencial. Las muestras IS-liofilizadas presentaron menor adsorción de agua en todo el rango de HR analizado y los valores de T_g fueron mucho mayores que para las otras muestras. En el caso de las muestras secadas en corriente de aire, probablemente se formó una costra durante el secado que luego dificultó la sorción de agua; las muestras mostraron valores muy bajos de contenido de agua en todo el rango de HR analizado. Sin embargo, los valores de T_g fueron relativamente bajos. Esto podría deberse a que la sacarosa no estuviera en estado amorfo sino cristalino en estas muestras y no contribuyera a aumentar el valor de T_g.

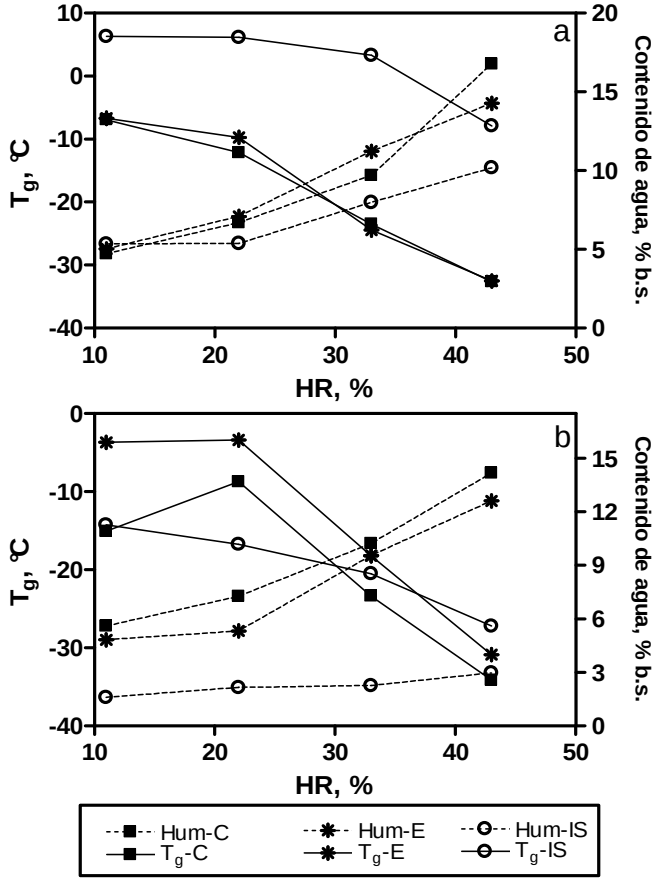


Figura 1. Valores de temperatura de transición vítrea (T_g) y contenido de agua en función de la humedad relativa para muestras de manzana liofilizadas (a) y secadas en corriente de aire (b) sometidas a diferentes pretratamientos: C: control, E: escaldada, IS: infusión seca.

Con la finalidad de estimar la movilidad molecular de los sólidos y del agua presentes en las muestras a diferentes actividades de agua, se determinó el tiempo de relajación transversal (espín–espín) T_2 a través de la técnica de resonancia magnética nuclear (^{1}H – RMN) resuelta en el tiempo. La **Figura 2** muestra los tiempos de relajación (T_2) de los sistemas de manzana sometidos a los diferentes pretratamientos y métodos de secado en función de la humedad relativa. Los valores de T_2 calculados a partir del método FID se atribuyen a la relajación de los protones presentes en los sólidos y a las moléculas de agua asociadas fuertemente mediante puentes de hidrógeno a la matriz sólida (agua de monocapa) (Kalichevsky *et al.* 1992, Ruan *et al.* 1999, Rugraff *et al.* 1996, Choi y Kerr 2006). Las muestras mostraron un aumento en los valores de T_2 al aumentar la humedad relativa, y variaron en un rango de 5 a 40 microsegundos. Las muestras liofilizadas presentaron valores de T_2 mayores que las secadas en aire, aunque no se observaron diferencias importantes entre muestras control y escaldadas. Esto podría deberse a que las muestras liofilizadas mostraron mayores contenidos de agua que las secadas en corriente de aire en el rango de HR analizado. Independientemente del método de secado, las muestras IS presentaron valores de T_2 menores, probablemente debido a su menor contenido de agua.

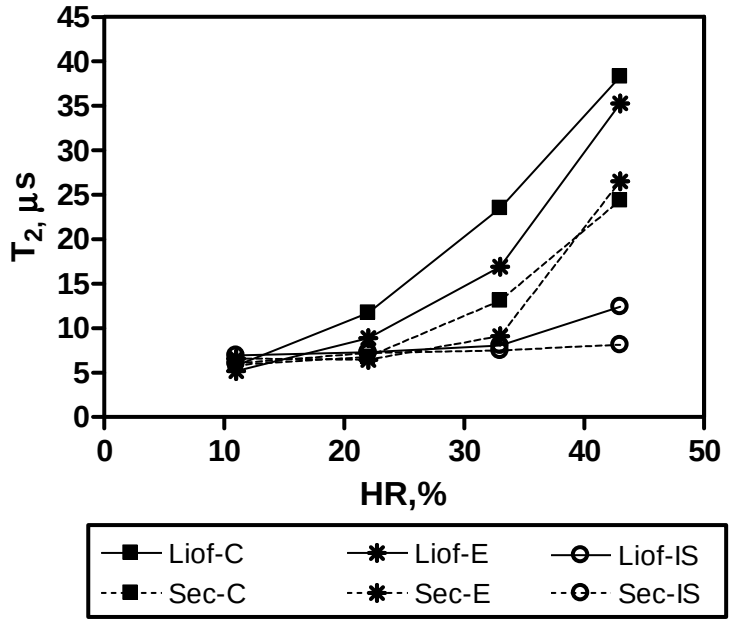


Figura 2. Tiempos de relajación T_2 obtenidos por ^{1}H RMN en función de la humedad relativa para muestras de manzana liofilizadas y secadas en corriente de aire sometidas a diferentes pretratamientos: C: control, E: escaldada, IS: infusión seca.

El comportamiento mecánico obtenido en las rodajas de manzana luego de los distintos procesos de deshidratación puede observarse en las **Figuras 3 y 4**. La **Figura 3** muestra las curvas fuerza-distancia obtenidas luego de un ensayo de punción sobre muestras liofilizadas (**a y b**) y secadas por corriente de aire (**c y d**). Las rodajas liofilizadas presentaron una baja resistencia a la punción y no mostraron diferencias significativas en los valores de $F_{máx}$ ($p < 0,05$) (**Figura 4a**). Sin embargo, si bien todas las muestras presentaron un comportamiento típico de alimentos blandos con picos redondeados, a mayor HR los picos ocurrieron a mayores distancias de penetración, mostrando matrices más deformables (**Figura 3a**). Las muestras liofilizadas con un tratamiento previo de IS presentaron valores mayores de $F_{máx.}$ (**Figura 4a)** y mostraron comportamientos diferentes en función de la HR. A bajas HR se presentaron varios picos y más abruptos (**Figura 3b**) que los observados en las muestras control (**Figura 3a**), típico de productos más quebradizos. A partir de 33% de HR las matrices presentaron el comportamiento de un material más deformable **(Figura 3b)**.

La respuesta mecánica observada en las muestras de 11% HR deshidratadas por secado convectivo fue similar a la obtenida para las muestras liofilizadas control al mismo valor de HR (**Figura 3a**). Sin embargo a 33% HR, la $F_{máx}$ fue mucho mayor ($p < 0,5$). La sorción de agua provocó modificaciones en las propiedades mecánicas de los materiales. Por un lado, es esperable que un material previamente deshidratado, se vea plastificado por la adsorción de agua y disminuya su viscosidad de manera que se

convierta en un material más blando. Sin embargo, la adsorción de agua también hace que el material deje de ser quebradizo y adquiera cierta gomosidad, lo cual puede provocar que el mismo sea tanto o más resistente a la punción que el material más seco (Peleg 2006). Por otro lado, a diferencia de las muestras liofilizadas, las muestras sometidas a secado convectivo presentaron encogimiento, lo que implica una mayor compactación del material, dando lugar a un producto de mayor dureza. Esto podría explicar el aumento observado en el valor de $F_{máx}$ a 33% HR.

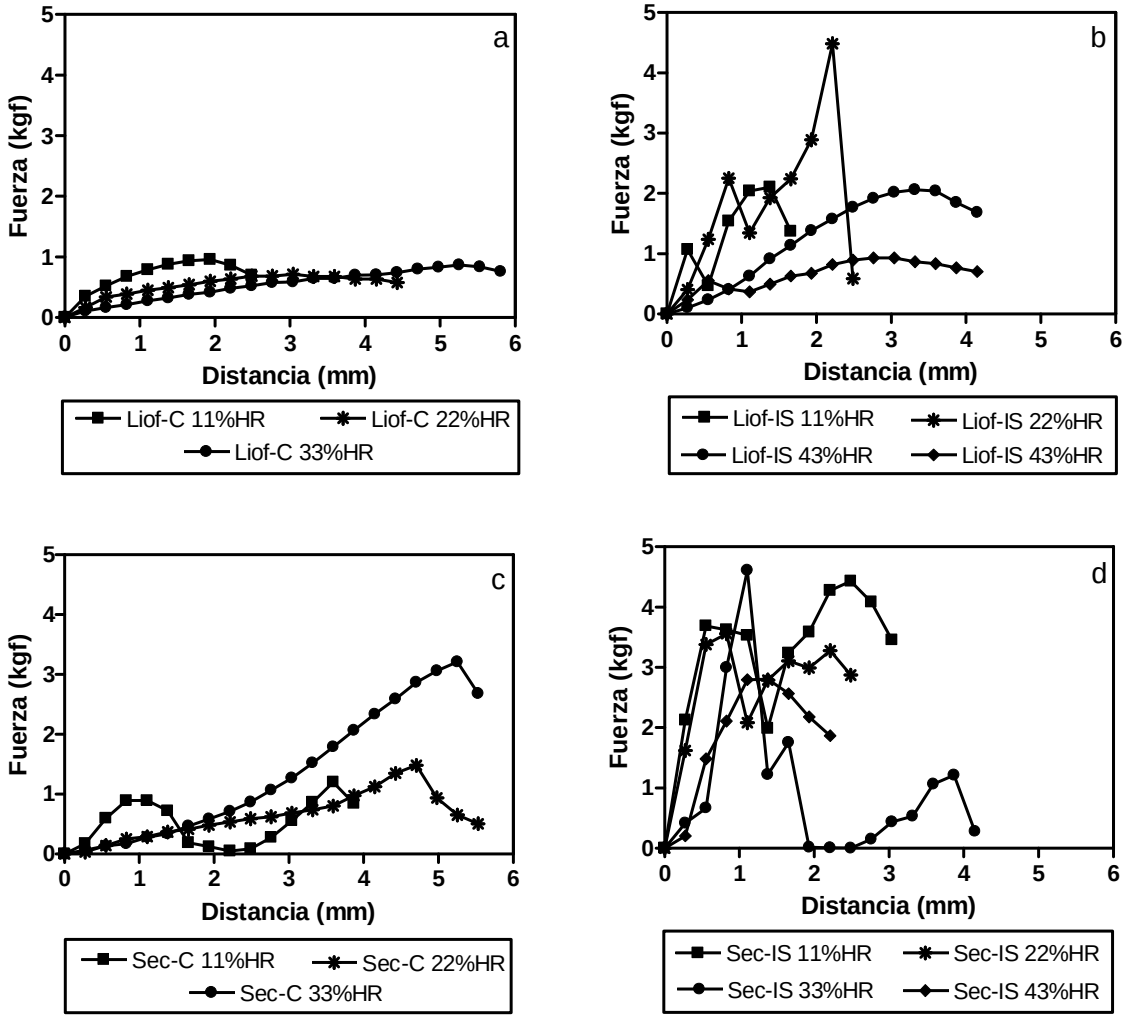


Figura 3. Curvas fuerza-distancia obtenidas luego de un ensayo de punción en manzanas deshidratadas: muestras control liofilizadas (a), control secadas en aire (b), IS liofilizadas (c), IS secadas en aire (d).

Las muestras IS sometidas a secado convectivo presentaron varios picos de elevada $F_{máx}$, con características similares a las observadas para las muestras IS liofilizadas de baja HR, aunque con valores mayores de $F_{máx}$ (**Figura 3d**). La costra formada durante el secado por aire de las manzanas IS permitió generar un material más duro con elevados valores de $F_{máx}$ en todo el rango de HR (**Figura 4b**). La presencia de azúcar en las matrices pretratadas estaría generando materiales más resistentes a la punción, lo que podría justificar las diferencias observadas en los valores de $F_{máx}$ obtenidos.

Un tratamiento previo de escaldado no modificó de manera significativa el comportamiento mecánico de las manzanas deshidratadas con respecto a su respectivo control, tanto liofilizado como secado por corriente de aire (**Figura 4a, b**).

La ventaja de aplicar una infusión con azúcar (IS) como tratamiento previo al proceso de deshidratación es que provee frutas con menores contenidos de agua y con una mayor resistencia del tejido lo que permite contar con materiales más duros y crujientes, incluso en condiciones desfavorables de humedad relativa ambiente. Por otro lado el hecho de que el material IS adsorba

menos agua conduce a la obtención de menores tiempos de relajación T_2 en todo el rango de HR, lo cual indica que la movilidad molecular de los sólidos y del agua asociada a los mismos es muy baja. Estos resultados contribuyen a explicar la mayor estabilidad del material frente al aumento de HR.

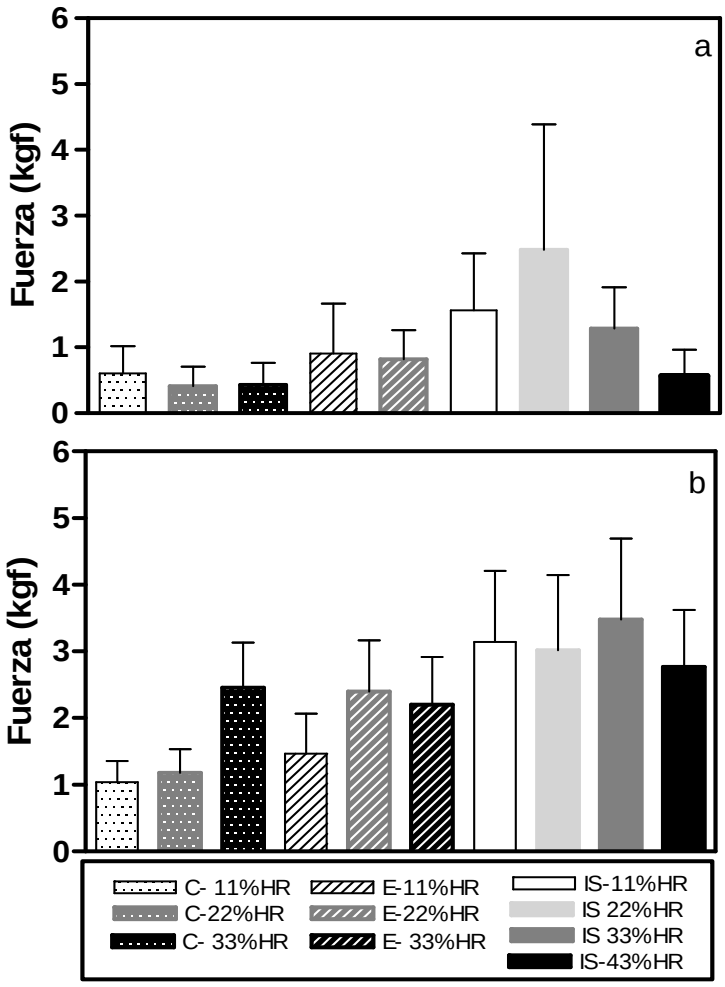


Figura 4. Valores de fuerza máxima ($F_{máx}$) obtenidos en un ensayo de penetración en manzanas deshidratadas: liofilizadas (a), secadas en corriente de aire (b).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten interpretar las diferencias entre los distintos pretratamientos y métodos de deshidratación, contribuyendo así a la elección de tecnologías de procesamiento de frutas deshidratadas organolépticamente aceptables para su consumo directo o su incorporación en alimentos compuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ablett S, Darke AH, Izzard MJ, Lillford PJ. 1993. Studies of the glass transition in malto-oligomers. En: Blanshard JMV, Lillford PJ, editores. The Glassy State in Foods. Loughborough UK: Nothingham University Press. pag 189-206.

Alzamora SM, Tapia MS y Welti-Chanes J. 1998. New strategies for minimal processing of foods: the role of multi-target preservation. Food Science and Technology International, 4: 353-361.

Bellows R y King C. 1973. Product collapse during freeze drying of liquid foods, AIChE Symposium Series, 69: 33-41.

Choi SG y Kerr WL. 2003. ^{1}H NMR studies of molecular mobility in wheat starch. Food Research International, 36: 341-348.

Colquhon IJ, Goodfellow BJ. 1994. Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. En: Reginald W, editor. Spectroscopic techniques in food analysis, New York: VCH Publishing. pag 87-145.

Dobraszczyk BJ, Vincent JV. 1999. Measurement of mechanical properties of food materials in relation to texture: the materials approach. En: Rosenthal AJ, editor. Food Texture, Maryland: Aspen Pub. Cap. 5. pag 99-151.

Flink JM. 1983. Nonenzymatic browning of freeze-dried sucrose. J. Food Sci., 48: 539-542.
Greenspan L, 1977. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. Journal of research, 8: 89-96.

Harker FR, Maindonald JH, Jackson PJ. 1996. Penetrometer measurement of apple and kiwifruit firmness: operator and instrument differences. Journal of American Society of Horticultural Science, 121: 927-936.

Kalichevsky MT, Jaroszkiewicz EM, Ablett S, Blanshard JMV y Lillford PJ. 1992. The glass transition of amylopectin measured by DSC, DMTA and NMR. Carbohydrate Polymers, 18: 77-88.

Levine H y Slade L. 1988. "Collapse" phenomena - a unifying concept for interpreting the behaviour of low moisture foods. En: J. Blanshard y R. Nitchell, editores. Food Structure - Its Creation and Evaluation. London: Butterworths. pag 149-180.

Nelson K y Labuza T. 1994. Water activity and food polymer science: implications of state on Arrhenius and WLF models in predicting shelf life. J. Food Eng., 22: 271-287.

Peleg M. 2006. On fundamental issues in texture evaluation and texturization-A view. Food Hydrocolloids, 20: 405-414.

Roos Y, Jouppila K y Zielasko B. 1996. Nonenzimatic browning-induced water plasticization: Glass transition temperature depression and reaction kinetics determination using differential scanning calorimetry. J. Thermal Anal., 47: 1437-1450.

Roudaut G, Dacremont B, Vallès Pàmies B, Colas B, Le Mesle M. 2002. Crispness: a critical review on sensory and material science approaches. Trends in Food Science and Technology, 13: 217-227.

Ruan R, Wang X, Chen PL, Fulcher RG, Pescheck P y Chakrabarti S. 1999. Study of water in dough using nuclear magnetic resonance. Cereal Chemistry, 76: 231-235.

Rugraff YL, Desbois P y Le Botlan DJ. 1996. Quantitative analysis of wheat starch–water suspensions by pulsed NMR spectroscopy measurements. Carbohydrate Research, 295: 185-194.

Slade L y Levine H. 1991. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 30: 115-360.

Szczesniak, AS. 1973. Instrumental methods of textural measurements. En: Kramer A, Szczesniak AS, editores. Texture Measurements of Foods. USA: Reidel Pub. pag 71-104.

To E y Flink J. 1978 a. Collapse, a structural transition in freeze dried carbohydrates I. Evaluation of analytical methods. J. Food Technol., 13: 551-565.

To EC y Flink JM. 1978 b. “Collapse”, a structural transition in freeze-dried carbohydrates. III Prerequisite of recrystallization, J. Food Technol., 13: 586-594.

Torregiani D y Bertolo G. 2002. The role of an osmotic step: combined processes to improve quality and control functional properties in fruit and vegetables. En: Welti-Chanes J, Barbosa Cánovas GV y Aguilera JM0, editores. Engineering and food for the 21st century. USA: Boca Raton. pag 651-670.

Tsourouflis S, Flink J y Karel M. 1976. Loss of structure in freeze-dried carbohydrates solutions: Effect of temperature, moisture content and composition. J. Sci. Food Agric., 27: 509-519.

Watada AE 1995. Methods for determining quality of fruits and vegetables. Acta Hort. 379: 559-567.

White G y Cakebread S. 1966. The glassy state in certain sugar- containing food products. J. Food Technol. 1: 73.

Características bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de miofibrillas de músculo de pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*)

Biochemical , physicochemical and functional characteristics of myofibrils from Striped weak fish muscle

Suárez D (1,2) Elias M (1), Crupkin M (1), Paredi M E (1,2)

(1) Área de Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, Ruta 226 km 73,5, Balcarce
(2) Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Buenos Aires (CIC)
elima_1930@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue investigar las características bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de las miofibrillas de pescadilla. Los ejemplares fueron obtenidos de buques comerciales y transportados en hielo hasta el laboratorio. Se utilizaron hembras de postdesove, en postrigor temprano, las que fueron evisceradas y fileteadas. Los filetes fueron utilizados para la extracción y purificación de miofibrillas (MF). Las propiedades bioquímicas, fisicoquímicas de la MF obtenidas fueron monitoreadas a través de electroforesis en geles SDS-PAGE 10%, actividades de Mg^{2+} Ca^{2+} y Mg^{2+}(EGTA) ATPasa,. Se determinaron las condiciones óptimas (concentraciones de ATP y enzima, tiempo y temperatura) para la cuantificación de las actividades enzimáticas. Paralelamente se monitoreó la actividad emulsificante (IAE) y la estabilidad de la emulsión. (EE). Los perfiles electroforéticos mostraron la presencia de las bandas polipeptídicas características del complejo miofibrilar mayoritario con presencia de cadena pesada de miosina (200kDa), actina (43 KDa), tropomiosina (36kDa) y cadenas livianas de miosina (19-23kDa). El análisis fotodensitométrico de los geles de MF mostró una composición cuantitativa similar a la de otras especies pesqueras. Las preparaciones de MF mostraron alta actividad $Mg^{2+}Ca^{2+}$ATPasa y baja de Mg^{2+} (EGTA) ATPasa, lo que indica que las mismas tenían buena sensibilidad al calcio y funcionalidad. Esas MF presentaron también buenas características emulsificantes y de estabilidad de emulsión, sugiriendo que las proteínas miofibrilares de esta especie poseen buenas propiedades funcionales. Estos resultados pueden ayudar a establecer pautas tecnológicas adecuadas para su conservación y procesamiento

ABSTRACT

The biochemical, physicochemical and functional properties of myofibrils from Stripped weakfish muscle, were investigated. The specimens were harvested by commercial vessels and kept on ice. Mature post-spawned female fish in early postrigor stage were used. Fillets were used to myofibrils extraction and purification. SDS-PAGE profiles of purified myofibrils showed the characteristic polypeptide bands of the major myofibrillar proteins. Photodensitometric analysis of the gels showed similar composition of the structural proteins of the muscle that those of other fish species. In addition, the obtained myofibrils had high ATPases activities and calcium sensitivity, which are incators of good functionality. The myofibrils presented also had good functional properties as juzgued by their emulsifying properties and emulsion stability. The reported results can to help to establish adequate technological conditions for storing and processing of this fish specie.

PALABRAS CLAVE: *miofibrillas, propiedades funcionales, pescadilla de red.*

KEYWORDS: *myofibrils, physicochemical and functional properties, Stripped weakfish.*

INTRODUCCIÓN

La pescadilla de red es una especie que habita desde Río de Janeiro (22° 35'S), en Brasil hasta los 43° S en Argentina. Es un pez demersal, que puede vivir en aguas tanto salobres estuarinas (de salinidad no menor a 20 por mil), como en ambientes marinos. Aparentemente tiene un desplazamiento hacia aguas costeras en épocas reproductivas. (Díaz de Astarloa, *et al*. 1997; Cousseau y Perrota 1998). Es

capturada por las 3 flotas, con mayor incidencia de la costera, utilizando red de arrastre de fondo. Es además una especie subutilizada generalmente destinada al mercado interno (Redes, 2008)

Es ampliamente conocido que las proteínas miofibrilares son las principales responsables de las propiedades funcionales de la carne: capacidad de gelación, capacidad emulsificante, capacidad de retención de agua, etc. (Xiong, 1994). El almacenamiento del pescado refrigerado o congelado produce cambios que conducen a la desnaturalización y agregación de esas proteínas (Seki y Narita 1980, Tachibana *et al*. 1993, Roura 1992, Shenouda 1980, Mackie, 1993, Montecchia *et al*, 1997), provocando un descenso de la capacidad de retención de agua, con pérdida del valor nutritivo y de la textura de la carne (Sikorski *et al.* 1975, Sikorski 1980, Shenouda, 1980, Mackie, 1993).

Se ha informado que el ciclo reproductivo de la merluza (*Merlucci hubbsi*) influencia la composición de la actomiosina, la proteína miofibrilar mayoritaria (Crupkin *et al*. 1988). En ese sentido se ha informado que la actomiosina de post-desove tiene una mayor relación miosina/actina que la de pre-desove. Beas *et al*.. (1988) y Roura *et al*, (1990) demostraron que la actomiosina de la merluza de post-desove posee mejores propiedades bioquímicas (mayor actividad de $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ y (Ca^{2+})ATPasa) y funcionales (viscosidad reducida y capacidad de gelación) que las correspondientes de pre desove. La condición gonadal de los ejemplares de diferentes especies pesqueras, también influencia el comportamiento de las propiedades bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de sus proteínas durante el almacenamiento refrigerado o congelado (Montecchia 1997 *et al.*, Pagano *et al*., 2001, Paredi y Crupkin 2007).

Contrastando con toda la información disponible respecto del comportamiento de las propiedades bioquímicas y funcionales de distintas especies pesqueras, no se tiene conocimiento acerca de las características de las proteínas miofibrilares de la pescadilla de red y del comportamiento de las mismas durante el almacenamiento del pescado a bajas temperaturas. Dada la declinación de stocks de algunas especies como la merluza argentina, es importante conocer el comportamiento de las propiedades bioquímicas y funcionales de las proteínas responsables de la calidad tecnológica de la carne de especies subutilizadas. Por esa razón, el objetivo del presente trabajo fue investigar las características bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de la pescadilla de red.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hembras maduras de pescadilla de red (*Cynoscion guatucupa*) en postdesove de 37 a 45 cm de largo, capturadas por buques costeros comerciales. Los ejemplares fueron acondicionados en hielo relación (1:1) y transportados al laboratorio dentro de las 24 horas de su captura. La condición gonadal de los ejemplares se determinó por análisis macroscópico de las gónadas. En el laboratorio fueron descabezados, eviscerados y fileteados. Los filetes de 12 ejemplares fueron utilizados para la extracción y caracterización de las proteínas miofibrilares. Cada ejemplar fue analizado individualmente.

Extracción y purificación de miofibrillas

Las miofibrillas constituyen la unidad funcional del músculo esquelético, por lo tanto es necesario mantener su integridad durante los pasos de purificación. Se utilizaron soluciones de baja fuerza iónica sin el agregado de Tritón X 100 en los lavados de acuerdo a lo sugerido por Roura (1992). Todos los pasos de extracción se realizaron a 2 - 4 ºC.

Cuantificación de proteínas

Las proteínas fueron cuantificadas por el método Lowry (Lowry *et al.* 1951), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Actividades $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ y Mg^{2+}(EGTA) ATPasas

La determinación de las actividades enzimáticas se realizó de acuerdo a lo descripto en un trabajo previo (Pagano *et al.* 2001). Se determinaron las condiciones óptimas de cada enzima, para ello se realizaron: curvas de concentración de sustrato (0,75 a 2.0 mM ATP), concentración de enzima (0,10 a 0,3mg/ml), temperatura (10-50 °C) y tiempo de incubación (1 a 10 min). Las condiciones óptimas obtenidas se muestran en la **Tabla 1**. Con los resultados de actividades enzimáticas se calculó también la sensibilidad al calcio. Según la siguiente formula:

Sensibilidad al Ca^{2+} = (1- Mg^{2+}(EGTA) ATPasa/ $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ x 100.

Las restantes condiciones fueron las mimas que las descriptas en un trabajo previo (Pagano *et al.* 2001).

Electroforesis en geles de SDS-PAGE

La electroforesis se efectuó de acuerdo a lo descripto en un trabajo previo (Laemmli, 1970). La composición cuantitativa de bandas se determinó por análisis fotodensitométrico de los geles en un fotodensitómetro Shimadzu CS 910 y el programa Gel-pro Analyzer.

Indice de actividad emulsificante (IAE)

Se determinó el índice de actividad emulsificante por el método turbidimético (Pearce y Kinsella 1978). Se homogeneizaron 6 ml de suspensión de MF (0,1% P/V) en buffer fosfato 10mM (pH 7,0) conteniendo 0,6M NaCl y 2 ml de aceite de girasol por 1 minuto a 5000 rpm en un Omni-mixer Sorvall 17106 con un microadaptador. Se tomaron 50 µl de la emulsión formada de la base del recipiente a tiempo 0 y 10 minutos y fueron diluidos en 5ml de buffer fosfato 0,01M (pH 7,0) conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,1% (P/V). Las lecturas de absorbancia se realizaron a 500nm. La lectura de absorbancia a tiempo 0 fue definida como IAE. La estabilidad de la emulsión fue calculada de acuerdo a los descripto por Xie y Hettiarachchy (1997), EE= T/T_0 donde T_0 y T corresponden a la turbidez a tiempo 0 y 10 min. respectivamente Todas las determinaciones se realizaron por cuadruplicado

Análisis estadísticos

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y para determinar la diferencia entre medias por el test de rango múltiple de Duncan, utilizando un paquete estadístico Statistica (Statistica, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1**, se muestra el perfil de los geles en SDS-PAGE 10 % de las miofibrillas purificadas de pescadilla de red. En el mismo se observan las bandas polipeptìdicas del complejo miofibrillar mayoritario: cadena pesada de miosina (200kDa), actina (43 KDa), tropomiosina (36kDa) y cadenas livianas de miosina (19-23kDa). Perfiles similares han sido informados para merluza (*Merluccius hubbsi Marini*), (Pagano y col., 2001), lenguado (Paredi y Crupkin, 2007) y corvina (Pagano , 2004). El análisis fotodensitométrico de los geles de MF también mostró una composición cuantitativa similar a la de otras especies pesqueras (**Tabla 2**).

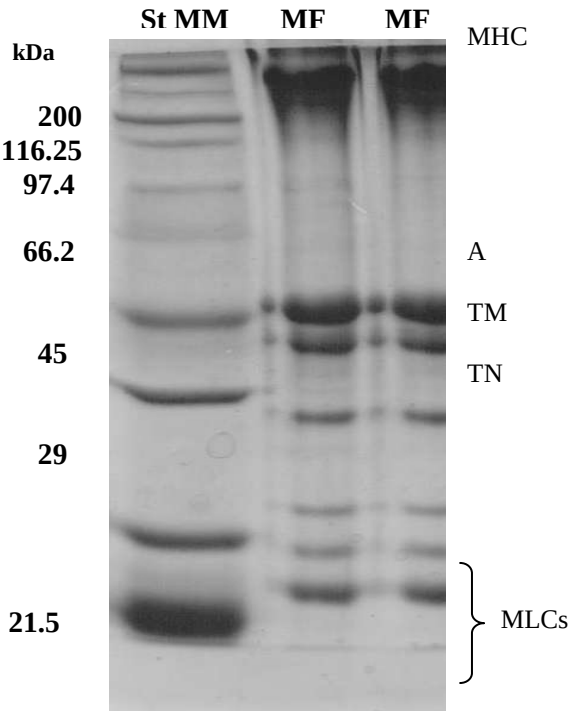


Figura 1. Perfil electroforético de miofibrillas de pescadilla de red. StMM. Estándar de masa molecular. MF : miofibrillas. MHC: cadena pesada de miosina (200KDa), A: Actina (45 kDa), TM: tropomiosina (36 kDa), TN: troponina (31 kDa). MLCs (Cadenas livianas de miosina.)

Tabla 1. Condiciones óptimas Actividades enzimáticos.

	ATP mM	Enzima (mg/mL)	T (°C)	Tiempo min
$Mg^{2+}(Ca^{2+})$	1	0,10	35	4
Mg^{2+}(EGTA)	1,25	0,15	35	4

Las actividades ATPásicas miofibrilares son ampliamente utilizadas para monitorear la integridad de la actomiosina y los cambios postmortem en especies pesqueras, durante el almacenamiento en frio (Roura 1992, Pagano *et al*, 2001, Paredi *et al* 1990, Benjakul *et al*, 1997). La actividad de Mg^{2+} y $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ ATPasa es una medida de la interacción miosina-actina en el complejo actomosina en miofibrillas en presencia de calcio endógeno u exógeno, respectivamente. (Roura, *et al*, 1990). La actividad de Mg^{2+} (EGTA) ATPasa indica la integridad del complejo tropomiosina-troponina (Ebashi y Endo, 1968, Watabe *et al* 1989).
Los resultados de las actividades enzimàticas utilizando las condiciones óptimas encontradas también se muestran en la **Tabla 2**. Como se puede observar las MF de la pescadilla de red, presenta altos valores de actividad de $Mg^{2+}(Ca^{2+})$ ATPasa y bajos valores de actividad de Mg^{2+} (EGTA) ATPasa, lo que indica una buena funcionalidad de las mismas. Estos resultados concuerdan también con la alta sensibilidad al calcio evidenciada (**Tabla 2**). Similares resultados han sido obtenidos con miofibrillas purificadas a partir de otras especies pesqueras (Pagano 2004).

Tabla 2. Propiedades bioquímicas, fisicoquímicas y funcionales de miofibrillas purificadas de pesadilla de red.

Propiedades fisicoquímicas y bioquímicas y funcionales	**Valores promedio**
$Mg^{2+}(Ca^{2+})$ ATPasa (µmolPi/min. mg proteína)	0,358±0,032
Mg^{2+}(EGTA) ATPasa(µmolPi/min. mg proteína)	0,178±0,046
Sensibilidad al calcio (%)	65%± 2.0
Porcentaje relativo de miosina (%)	46,5± 4,90
Porcentaje relativo de actina (%)	26,30±4,19
Relación M/A	1,80 ± 0,011
IAE	0,148 ±.0,032
EE	0,562± 0,040

Se representan los valores promedios ± DS (n= 12)

Paralelamente se monitoreo la actividad emulsificante (IAE) y la estabilidad de la emulsión. (EE) Los valores de IAE y EE de las emulsiones formuladas con las miofibrillas se muestran en la **Tabla 2**. Esas MF presentaron también buenas características emulsificantes y de estabilidad de emulsión, sugiriendo que las proteínas miofibrilares de esta especie poseen buenas propiedades funcionales.
Valores de IAE similares han sido informados para emulsiones formuladas con actomiosina de pez palo (Tarnowski *et al*, 2006), aunque los valores de EE con emulsiones de MF de pescadilla fueron superiores a las obtenidos con actomiosina de aquella especie.

CONCLUSIONES

Los valores de actividades ATPásicas, composición relativa de miosina, actina y de relación miosina/actina son característicos de miofibrillas funcionales. Los valores de IAE y EE permiten predecir buenas propiedades emulsificantes de las proteínas miofibrilares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la CIC, Universidad Nacional de Mar del Plata y FONCYT .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beas VE., Crupkin M, Trucco RE. 1988 Gelling properties of actomyosin from pre and post- spawned hake (M. hubbsi) Journal of Food Science, 53:1322-1328

Benjakul S, Seymor TA, Morrisey MT, An H.1997. Physicochemical changes in Pacific whithing muscle protein during ice storage . Journal of Food Science, 63: 729-733.

Cousseau, MB, Perrota RG. 1998. Peces marinos de Argentina.Mar del Plata. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP).

Crupkin M, Montecchia CL, Trucco, RE 1988. Seasonal variations in gonadosomatic index, liver somatic index and myosin/ actin ratio in actomyosin of mature hake (M. hubbsi) Comparative Biochemistry and Physiology, 89A:7-10

Diaz De Astarloa JM, Carozza CR, Guerrero RA, Baldoni, AG, Cousseau MB. 1997. Algunas características biológicas de peces capturados en una campaña costera invernal en 1993, en el área comprendida entre 34°y 41°S y su relación con las condiciones ambientales. INIDEP Informe Técnico, 14:35-46.

Ebashi, S, Endo M. 1968. Calcium and muscle contraction . Progress in Biophysis and Molecular Biology, 18: 123-183.

Laemmli, VH 1970. Clevage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. T4. Nature 227:680-682

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.1951.Protein measurement with Folin reagent. Journal Biological Chemistry, 193:265-275

Mackie, IM. 1993. The effect of freezing of flesh proteins. Food Review International 9(4): 575-610.

Montecchia CL, Roura SI, Roldán HA, Pérez-Borla O, Crupkin M. 1997. Biochemical and physicochemical properties of actomyosin from frozen pre and post-spawned hake. Journal Food Science. 62: 491-497.

Pagano MR. 2004. Propiedades bioquímicas de miofibrillas de distintas especies pesqueras.Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata.

Pagano MR., Paredi, M.E, Crupkin, M 2001. Influence of gonadal stage of(*Merluccius hubbsi Marini*) on the biochemical properties of myofibrils stored at 2-4 °C Journal of Food Science, 66: 252-256-

Paredi ME., de Vido de Mattio N, Crupkin M. 1990. Biochemical properties of actomyosin of cold stored striated adductor muscles of aulacomya ater ater (Molina). Journal of Food Science 55: 1567-1570.

Paredi ME, Crupkin M 2007. Biochemical and phisicochemical properties of actoymyosin form pre and post-spawned flounder (*Paralichthys patagonicus*) stored on ice. LWT. Food. Science and Technology, 40: 1716-1722.

Pearce, KN, Kinsella, JE 1978. Emulsifyng properties of proteins- Evaluation of turbidimetric technique. Journal Agricultural and Food Chemistry. 26: 716-723.

Redes, 2008. Redes de la Industria Pesquera Argentina, 148: 138-154

Roura S.I. 1992. Propiedades bioquímicas y funcionales de las proteínas miofribrilares de la merluza *(M. hubbsi*) Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Nat. UNMDP.

Roura SI, Goldemberg AL, Trucco RE, Crupkin M. 1990. Biochemical and physicochemical properties of actomyosin from pre and post- spawned hake (M. hubbsi) stored on ice. Journal of Food Sience, 55:692-697

Seki, N., Narita, N. 1980. Changes in ATPase activities and other properties of carp myofibrillar protein during ice-storage. Bulletin Japanese of Society and Scientific Fishery, 46 : 207-213.

Shenouda, S. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh, Advance Food Research. 26: 275-311.

Sikorski, Z. 1980. Structure and protein of fish and shellfish, Part II, En J. Connell, ed: Advances in Fish Science and Technology. Surrey, England Fishing News (Books) Ltd..pag 78-81.

Sikorski, Z., Kostuch, S. Y Kolodziejska. 1975. Denaturation of protein in fish flesh. Nahrung 19:997-1010.

STATISTICA / MAC. 1994. *Statistica for Macintosh.* Tulsa, OK, USA, Statsoft Inc

Tachibana K, Misima T, Tsuchimoto, M. 1993.Changes of ultrastructure and cytochemical Mg^{+2} ATPase in ordinary muscle of cultured and wild red sea bream during storage in ice. Nippon Suisan Gakkaishi 59 (5): 721-727.

Tarnoswki A, Crupkin, M, Paredi ME. 2006. Comportamiento de las propiedades bioquímicas y funcionales de la actomiosina de filetes de pez Palo **(***Percophis brasiliensis*) durante el almacenamiento congelado. Congreso Inernacional de Ciencia y Tecnología de Alimenntos. Córdoba Argentina. 15,16 y 17 de noviembre 2006.

Xie YR., Hettiarachchy NS. 1997. Xhanten gom effects on solubility and emulsification properties of soy protein isolate. Journal of Food Sciencie, 62(6) 1101-1104.

Xiong, Y 1994. Myofibrillar protein form different muscle fiber tpes: implications of biochemical and functional properties in meat processing. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 34 (3), 293-320.

Watabe S, Ushio I, Iwamoto H, Yamanaka H, Hashimoto K. 1989. Temperature dependence of rigor mortis, of fish muscle myofibrillar Mg^{2+} ATPase activity and Ca^{2+} uptake by sarcoplasmic reticulum. Journal of Food Science, 54: 1167-1168

Determinación de la composición química del aroma de orégano comercial mediante Microextraccion en Fase Sólida con posterior análisis por GC/MS

Determination of the chemical composition of commercial oregano aroma with Headspace - Solid Phase Microextraction with subsequent analysis by GC/MS

Vázquez, AM(1), Demmel, GI(1), Ferrari, MC(1), Criado, SG(1), Cavaglia, DJ(1), Aimar, ML(2)

(1)Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.
(2)Subsecretaría Ceprocor, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina.
ana.vazquez.s@gmail.com

RESUMEN

Se realizó un estudió sobre la composición del aroma (Compuestos Orgánicos Volátiles, COVs) de nueve marcas comerciales de orégano, recolectadas en la Ciudad de Córdoba, Argentina. Para la realización de los análisis, se empleó la técnica de Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (HS-SPME/GC-MS). De esta manera, se logró establecer el perfil químico de los COVs presentes en cada muestra. Para reconocer similitudes y diferencias (agrupamiento de las muestras según su composición de COVs), a los resultados obtenidos se les aplicó un análisis estadístico multivariado mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Conglomerados (CA). El estudio estadístico indicó diferencias en la composición cualitativa y cuantitativa de las muestras: de los 56 COVs identificados, sólo 20 resultaron comunes y se encontraron, además, diferentes proporciones de los mismos en las distintas muestras. A partir del análisis PCA y CA, las muestras se distribuyeron en cinco grupos de acuerdo a su composición química. El origen de las diferencias en la composición de los COVs en las muestras, puede deberse a que se utilizan diferentes especies de *Origanum* para la elaboración del orégano comercial, a diferentes orígenes territoriales de las especies utilizadas para elaborar el producto (regiones de cultivo) o una mezcla de ambos factores.

ABSTRACT

A study on the composition of the aroma (Volatile Organic Compounds, VOCs) was performed on nine commercial brands of oregano collected in the city of Cordoba, Argentina. The technique of Headspace - Solid Phase Microextraction (HS-SPME) with subsequent analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HS-SPME/GC-MS) was used to perform the analysis. In this way, it was able to establish the chemical profile of VOCs present in each sample. A multivariate statistical analysis using Principal Component Analysis (PCA) and Cluster Analysis (CA) was applied to the results in order to recognize similarities and differences (grouping samples according to their composition of VOCs). The statistical analysis indicated differences in the qualitative and quantitative composition of the samples: of the 56 VOCs identified, only 20 were commons, besides, there were different proportions of them in the different samples. From PCA and CA analysis, samples were divided into five groups according to their chemical composition. The origin of the differences in the composition of VOCs in the samples may be due to the use of different species of *Origanum* for the preparation of commercial oregano, to the different regional origins of the species used to make a product (growing regions) or be a mixture of both factors.

PALABRAS CLAVE: *orégano, aroma, HS-SPME, análisis multivariado, PCA, CA.*

KEYWORDS: *oregano, aroma, HS-SPME, multivariate analysis, PCA, CA.*

INTRODUCCIÓN

Origanum vulgare L, (orégano), es una herbácea perenne aromática cuyas hojas desecadas se utilizan como condimento por poseer glándulas productoras de aceite esencial, lo que le da el sabor y aroma característicos. El género *Origanum* pertenece a la familia Lamiaceae y se caracteriza por una gran diversidad de especies diferentes desde el punto de vista morfológico y químico. En Argentina, las especies mayormente cultivadas son híbridos entre *O. vulgare* y *O. mejorana* denominados *Origanum x aplii* (orégano criollo) y *Origanum x majoricum* (orégano mendocino). Por sus propiedades aromáticas, se emplea como especia y condimento tanto en el consumo popular como en la industria.

En nuestro País, las Provincias de Mendoza y Córdoba se destacan como productoras de esta hierba aromática y uno de los desafíos actuales del sector es poder contar con herramientas analíticas que permitan determinar la calidad del orégano producido (Arizio y Curioni 2003, COFECYT 2007).

La calidad sensorial de una especia aromática está determinada por su aroma y sabor, la cual se relaciona estrechamente a la composición de su fracción orgánica volátil. Por esa razón, se realizó un estudio del aroma (Compuestos Orgánicos Volátiles, COVs) presente en nueve marcas diferentes de orégano comercializadas en la ciudad de Córdoba, Argentina. Para ello, se utilizó como técnica analítica la combinación de Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza (HS-SPME) con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

La HS-SPME es una técnica recientemente desarrollada (Arthur y Pawliszyn 1990) y ha tenido una gran aceptación debido a sus grandes ventajas comparativas con respecto a las técnicas clásicas de muestreo (Kataoka *et al* 2000 y Krutz *et al* 2003); en especial, por ser una técnica de extracción libre de solventes, sensible y selectiva (Lord y Pawliszyn 2000). Se lleva a cabo mediante la exposición de una fibra recubierta con uno o varios polímeros (fase extractante) dentro del espacio de cabeza de una muestra. La fibra concentra los analitos orgánicos y la cantidad extraída es directamente proporcional a su concentración en la matriz de la muestra. La fibra luego se inserta directamente en el puerto de inyección de un Cromatógrafo de Gases, donde los analitos se desorben térmicamente.

En la actualidad, hay un gran número de fibras SPME comercialmente disponibles, que se diferencian por su tipo de recubrimiento y han sido utilizadas para la caracterización de los COVs presentes en plantas aromáticas y medicinales (Liang *et al*. 2005, Chen *et al*. 2006, Fang *et al*. 2006, Cao *et al*. 2006 y Broki *et al* 2006) entre otros usos.

En este trabajo, se realizó la determinación de la composición de COVs mediante HS-SPME/GC-MS, de nueve marcas diferentes de orégano, y, sobre estos resultados, se realizó un análisis estadístico multivariado a través de Análisis de Componentes Principales (PCA) y Análisis de Conglomerados (CA), con la finalidad de determinar si se producían agrupamientos entre las muestras de acuerdo a su composición química y poder visualizarlos gráficamente. El PCA es una herramienta estadística que permite encontrar un nuevo conjunto de variables (componentes principales) no correlacionadas entre sí, que expliquen la estructura de variación de los datos, mientras que el CA es un método que permite obtener mayor conocimiento sobre la estructura de las variables en estudio. La síntesis de la información disponible sobre las unidades consideradas, realizada por estos métodos estadísticos, facilita notablemente la visualización de relaciones multivariadas de naturaleza compleja (Luthria *et al*. 2008). A través de este estudio, se lograron establecer similitudes y diferencias entre las muestras estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la realización del presente estudio se seleccionaron nueve muestras comerciales de orégano, las cuales fueron colectadas desde distintos puntos de venta de la Ciudad de Córdoba (Argentina). Todas las muestras mostraban en sus rótulos el número de certificado de inscripción en el Registro Nacional de Productos Alimenticios (RNPA). Para la realización de los estudios, cada una de ellas fue identificada con una letra por orden alfabético desde la A hasta la I.

Alícuotas de (100,0 ± 0,1) mg de orégano fueron colocadas en viales de vidrio de 20 cm^3 y se cerraron herméticamente con septa de Vitón (Supelco de Sigma-Aldrich, Argentina) y precintos de aluminio. Posteriormente los viales sellados fueron introducidos en un baño de agua termostatizado (precisión ± 0,2 ºC) marca PolyScience modelo 8005 para conducir los ensayos bajo condiciones de temperatura controlada. Para la introducción de las fibras en el HS de las muestras, se utilizó un portafibra manual para SPME (Supelco de Sigma-Aldrich de Argentina).

Métodos

Determinación de COVs en muestras de orégano. La determinación de los COVs en las muestras, se llevó a cabo empleando la técnica de Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza acoplada a un Cromatógrafo de Gases con detector por espectrometría de Masas (HS-SPME/GC-MS). La optimización de las condiciones de trabajo fueron previamente establecidas (Vázquez *et all* 2009): fibra para SPME compuesta por Divinilbenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS, Supelco, Sigma-Aldrich de Argentina), temperatura de trabajo de 40ºC, tiempo de equilibrio, 10 min y tiempo de exposición de la fibra al HS, 60 min.

El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard HP 5890 Serie II adosado a un Espectrómetro de Masas HP 5970, equipado con un puerto de inyección manual *split/splitless* y una columna capilar RTX-5 (15 m x 0,25 mm DI x 0,25 μm d_f). Las condiciones cromatográficas fueron: inyector 225 ºC; hormo 40 ºC (5 min) hasta 200 ºC (5 min), velocidad de calentamiento: 5 ºC/min; gas carrier: He 99,99 %; presión de cabeza: 5 psi. El espectrómetro de masas operó a 70 eV y los espectros se registraron en el rango de *m/z* 25-550 uma en el modo de adquisición "*scan-full*". La temperatura de la interfase fue 230 ºC. El sistema de procesamiento de datos usado fue un HP MS *ChemStation* incluyendo las bases de datos WILEY 275 y NIST. Cada determinación fue realizada por triplicado y el desvío estándar relativo del promedio fue menor al 5 % en todos los casos.

La identidad de los COVs en los cromatogramas fue establecida mediante la comparación de sus espectros de masas con los reportados en las Bibliotecas NIST y Wiley y a través de la determinación de los respectivos índices de retención de Kovats (KI), los cuales fueron comparados con los reportados en las bases de datos NIST 2008 y Pherobase 2008. La mayoría de los COVs fueron identificados con Match > 90, excepto Carvona, Elemicin y Geranil Acetona cuyos Match fueron > a 70, aunque sus KI se correspondieron con los reportados en las bases de datos.

La composición porcentual de los COVs fue establecida mediante la normalización de las áreas de los picos del cromatograma con respecto al área total.

Análisis estadístico. Con los resultados de la composición de COVs se calcularon medias y desvíos estándares. Además se les aplicó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilks modificado) y de homogeneidad de la varianza. En aquellos casos donde se cumplieron los supuestos estadísticos, se analizaron diferencias significativas mediante un análisis de varianza (ANOVA) paramétrica, con test posterior de Tukey a un nivel de significancia del 5 % (α =0,05). En los casos donde los supuestos estadísticos no se cumplieron se analizaron diferencias significativas mediante un análisis de varianza no paramétrica (Kruskal-Wallis) con test posterior de Dunn, para un nivel de significancia del 5% (α = 0,05).

El análisis estadístico multivariado se realizó a través de un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre la matriz de correlación de COVs por muestra, y a través de un Análisis de Conglomerados (CA) jerárquico con el método de encadenamiento promedio (average linkage) y distancia Euclídea.

En el PCA se especificaron como variables a todas las mediciones de COVs y como criterio de clasificación, a las muestras comerciales de orégano. En el CA, se especificaron como variables a las cuatro primeras componentes del PCA y como criterio de clasificación, a las muestras comerciales de orégano.

Para el procesamiento estadístico de los datos, se utilizó el software Infostat (versión 2008p, desarrollado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 56 COVs en total, lo que correspondió a más del 95 % del total de picos observados en los cromatogramas (**Tabla 1**). De ellos, sólo 20 resultaron comunes a todas las muestras: α-Tujeno, Sabineno, Mirceno, α-Terpineno, γ-Terpineno, *trans*-Sabineno Hidrato, α-Terpinoleno, *cis*-Sabineno Hidrato, *l*-Linalol, 4-Terpineol, α-Terpineol, Carvacrol Metil Éter, Timol, Carvacrol, β-Cariofileno, α-Cariofileno, β-Bisaboleno, δ-Cadineno, Spatulenol y Óxido de Cariofileno.

En todas las muestras estudiadas, Timol resultó ser el COV mayoritario a excepción de la muestra A (13,07%). En dicha muestra 4-Terpineol (17,36%) fue el compuesto que se observó en mayor proporción. La muestra C fue la que mayor porcentaje de Timol presentó (55,46 %).

Tabla 1. Composición porcentual de COVs en las muestras de orégano.

Nº	Compuesto	KI^{e}	KI^{r}	A (RA%)	B (RA%)	C (RA%)	D (RA%)	E (RA%)	F (RA%)	G (RA%)	H (RA%)	I (RA%)	ANOVA
1	α-Tujeno	918	919	0,39^{a}	0,77^{a,b}	0,47^{a}	0,37^{a}	1,32^{b}	0,84^{a,b}	0,92^{a,b}	0,57^{a}	1,18^{b}	Tukey
2	Sabineno	963	964	0,73^{a}	1,43^{a,b}	0,71^{a}	0,67^{a}	2,50^{c}	1,55^{a,b}	1,71^{b,c}	1,10^{a,b}	2,59^{c}	Tukey
3	1-Octen-3-ol	977	978	0,25^{b}	0^{a}	0,13^{a,b}	0,13^{a,b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0,12^{a,b}	0^{a}	Dunn
4	Mirceno	982	983	0,72^{b,c}	0,43^{a,b}	0,93^{c}	0,76^{b,c}	0,88^{b,c}	0,64^{b,c}	0,07^{a}	0,54^{b,c}	0,48^{a,b,c}	Tukey
5	α-Felandreno	988	989	1,12^{b}	1,19^{b}	1,14^{b}	0^{a}	0,80^{b}	0,92^{b}	0,88^{b}	1,26^{b}	0,65^{b}	Tukey
6	α-Terpineno	998	993	1,80^{b}	1,68^{b}	2,30^{b}	0,60^{a}	2,43^{b}	1,92^{b}	1,66^{b}	2,08^{b}	1,83^{b}	Tukey
7	*p*-Cimeno	1008	1010	4,89^{c}	6,77^{c}	**10,06**^{c}	1,05^{a,b}	6,47^{c}	4,86^{c}	0^{a}	5,95^{c}	4,27^{b,c}	Tukey
8	β-Felandreno	1013	1012	2,96^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	2,26^{b}	0^{a}	0^{a}	Dunn
9	*cis*-Ocimeno	1027	1028	0,90^{b}	0,19^{a,b}	0^{a}	0,38^{a,b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
10	*trans*-β-Ocimeno	1032	1032	0,26^{a,b}	0^{a}	0,64^{c}	0,23^{a,b}	0,33^{b,c}	0,18^{a,b}	0^{a}	0,29^{a,b}	0^{a}	Tukey
11	γ-Terpineno	1047	1049	4,68^{b,c}	4,88^{c}	**7,04**^{d}	2,01^{a}	**9,46**^{e}	6,17^{c,d}	3,22^{a,b}	5,12^{c}	6,73^{d}	Tukey
12	*trans*-Sabineno Hidrato	1081	1089	1,72^{a,b}	3,44^{c}	1,35^{a}	0,87^{a}	**7,22**^{e}	2,20^{a,b,c}	5,16^{d}	2,79^{b,c}	5,89^{d,e}	Tukey
13	α-Terpinoleno	1071	1072	1,07^{a,b}	0,96^{a,b,c}	1,03^{a,b}	0,26^{a}	1,13^{c}	0,70^{a,b,c}	0,69^{b,c}	1,12^{a,b,c}	0,93^{c}	Dunn
14	*cis*-Sabineno Hidrato	1086	1097	3,50^{a,b,c}	4,28^{a,b,c,d}	1,64^{a}	2,29^{a,b}	6,00^{c,d}	**7,28**^{d}	5,67^{b,c,d}	2,12^{a}	**15,62**^{e}	Tukey
15	*l*-Linalol	1090	1092	3,85^{a,b,c}	5,98^{b,c,d}	1,26^{a}	**7,37**^{d}	5,59^{b,c,d}	6,52^{c,d}	4,54$^{\mathbf{a,b,c,d}}$	4,60$^{\mathbf{a,b,c,d}}$	2,42^{a,b}	Dunn
16	p-Menta-2-en-1-ol	1100	1097	1,51^{c,d}	1,40^{b,c,d}	1,01^{b,c}	0^{a}	0,65^{a,b}	0,80^{a,b,c}	2,34^{e}	2,04^{d,e}	2,20^{d,e}	Tukey
17	1-Terpineol	1122	1130	1,18^{c}	1,11^{c}	0,53^{a,b,c}	0^{a}	0,32^{a,b}	0,55^{a,b,c}	0,90^{b,c}	1,21^{c}	0,76^{b,c}	Tukey
18	DL-Borneol	1146	1152	0^{a}	0^{a}	0,51^{b}	0,30^{a,b}	0^{a}	0^{a}	0,41^{b}	0,40^{a,b}	0,13^{a,b}	Dunn
19	4-Terpineol	1162	1161	**17,36**^{d,e}	**18,06**^{e}	**12,41**^{c}	2,62^{a}	**8,23**^{b}	**14,19**^{c,d}	**12,10**^{c}	**16,54**^{d,e}	6,32^{a,b}	Tukey
20	α-Terpineol	1174	1172	4,50^{a}	3,75^{b,c}	3,09^{b,c}	0,87^{a}	2,04^{a,b}	2,87^{b,c}	3,10^{b,c}	3,01^{b,c}	2,60^{b}	Tukey
21	Estragol	1177	1188	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0,40^{b}	0,40^{b}	1,03^{c}	0,96^{c}	0,87^{c}	0^{a}	Tukey
22	Linalil propanoato	1185	1215	0^{a}	1,82^{b,c}	2,71^{d}	0^{a}	1,55^{b}	1,66^{b,c}	1,55^{b}	2,12^{c}	0^{a}	Tukey
23	*cis*-Piperitol	1202	1199	1,42^{c}	0,29^{b}	0,30^{b}	0^{a}	0^{a}	0,20^{a,b}	0^{a}	0,30^{b}	0^{a}	Tukey
24	Timil Metil Eter	1215	1216	2,30^{c}	2,17^{c}	0^{a}	1,25^{b}	1,48^{b}	1,15^{b}	1,04^{b}	1,31^{b}	1,45^{b}	Tukey
25	Carvacrol Metil Eter	1225	1228	4,71^{c}	3,39^{b,c}	1,94^{a,b}	1,54^{a}	3,22^{b,c}	2,12^{a,b}	2,04^{a,b}	2,95^{a,b,c}	2,46^{a,b,c}	Dunn
26	Timoquinona	1232	1242	0,64^{a}	1,35^{b}	0,56^{a}	0^{a}	0,34^{a}	0,21^{a}	0,19^{a}	0,15^{a}	0,08^{a}	Tukey
27	Nerol	1234	1232	0^{a}	0^{a}	0^{a}	1,65^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
28	Linalil Acetato	1249	1248	5,77^{b}	0^{a}	0^{a}	3,84^{b}	0,57^{a,b}	0,23^{a,b}	0^{a}	0,38^{a,b}	0^{a}	Dunn
29	*trans*-Anetol	1262	1261	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0,36^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
30	Carvona	1262	1265	0^{a}	0^{a}	0,24^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
31	Piperitona	1273	1282	0^{a}	0,17^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
32	Timol	1292	1292	**13,07**^{a}	**24,40**^{b}	**32,81**^{c,d}	**55,46**^{e}	**25,29**^{b,c}	**31,90**^{b,c,d}	**34,05**^{d}	**27,88**^{b,c,d}	**25,17**^{b,c}	Tukey
33	Carvacrol	1295	1296	**9,70**^{e}	0,74^{a}	5,63^{d}	3,90^{c}	2,10^{b}	0,82^{a}	0,54^{a}	0,57^{a}	0,66^{a}	Tukey
34	α-Cubebeno	1319	1322	0^{a}	0^{a}	0,09^{a,b}	0,13^{a,b}	0^{a}	0,17^{b}	0^{a}	0,07^{a,b}	0,27^{a,b}	Dunn
35	α-Ylangeno	1325	1342	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0,08^{c}	0^{a}	0,04^{b}	Dunn
36	α-Copaeno	1343	1347	0	0,12	0,12	0	0,09	0,11	0,10	0,12	0,08	p>0,05
37	Neril Acetato	1347	1345	0,17^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
38	β-Burboneno	1353	1356	0^{a}	0,27^{b}	0,13^{b}	0,20^{c,d}	0,16^{b,c}	0,14^{b}	0,23^{d,e}	0,17^{b,c}	0,23^{d,e}	Tukey
39	Geranil Acetato	1364	1364	0,21^{a,b}	0^{a}	0^{a}	0,49^{b}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0,12^{a,b}	0^{a}	Dunn
40	*n*-Tetradecano	1378	1399	0,78	0,08	0	0,14	0	0,16	0,06	0,05	0,11	p>0,05

Tabla 1. (Continuación).

Nº	Compuesto	KI[e]	KI[r]	A (RA%)	B (RA%)	C (RA%)	D (RA%)	E (RA%)	F (RA%)	G (RA%)	H (RA%)	I (RA%)	ANOVA
41	β-Cariofileno	1387	1390	$3,79^{e,f}$	$1,81^{a}$	$3,90^{f}$	$2,21^{a,b}$	$2,52^{b,c}$	$2,14^{a,b}$	$3,18^{d,e}$	$2,86^{c,d}$	$2,55^{b,c}$	Tukey
42	β-Cubebeno	1394	1395	0^{a}	$0,13^{b}$	$0,17^{b}$	$0,16^{b}$	$0,13^{b}$	$0,15^{b}$	$0,16^{b}$	$0,14^{b}$	$0,16^{b}$	Tukey
43	Aromadendreno	1404	1439	0,19	0	0,17	0,43	0,13	0,13	0,16	0,29	0,16	p>0,05
44	α-Cariofileno	1419	1423	$0,47^{f}$	$0,23^{a,b}$	$0,39^{e,f}$	$0,19^{a}$	$0,28^{a,b,c}$	$0,27^{a,b,c}$	$0,37^{d,e}$	$0,29^{b,c,d}$	$0,33^{c,d,e}$	Tukey
45	Geranil Acetona	1430	1436	0,19	0,16	0,16	0	0	0,20	0,20	0,12	0,20	p>0,05
46	α-Amorfeno	1445	1485	0^{a}	0^{a}	0^{a}	$0,60^{b}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
47	Germacreno D	1448	1455	0^{a}	$0,51^{b}$	$1,00^{c,d}$	0^{a}	$1,25^{d}$	$0,87^{c}$	$1,58^{e}$	$0,86^{c}$	$2,05^{f}$	Tukey
48	Germacreno B	1464	1463	$0,14^{b}$	$0,14^{b}$	0^{a}	0^{a}	$0,29^{c,d}$	$0,33^{d}$	$0,31^{c,d}$	$0,21^{b,c}$	$0,46^{e}$	Tukey
49	α-Muroleno	1469	1480	0^{a}	0^{a}	0^{a}	$0,14^{c,d}$	$0,17^{d}$	$0,17^{d}$	$0,09^{b,c}$	$0,07^{a,b}$	$0,06^{a,b}$	Tukey
50	β-Bisaboleno	1482	1484	$0,61^{a}$	$2,18^{c,d}$	$0,52^{a}$	$1,26^{b}$	$1,62^{b,c}$	$2,38^{d}$	$3,16^{e}$	$3,17^{e}$	$3,07^{e}$	Tukey
51	δ-Cadineno	1493	1495	$0,18^{a}$	$0,23^{a}$	$0,55^{b}$	$0,39^{a,b}$	$0,33^{a,b}$	$0,39^{a,b}$	$0,42^{a,b}$	$0,32^{a,b}$	$0,40^{a,b}$	Tukey
52	*cis*-α-Bisaboleno	1511	1514	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	$0,06^{a,b}$	$0,07^{a,b}$	$0,09^{b}$	Dunn
53	Elemicin	1536	1540	0^{a}	0^{a}	0^{a}	$0,06^{b}$	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	0^{a}	Dunn
54	Spatulenol	1543	1537	0,48	0,18	0,37	0,41	0,19	0,25	0,53	0,42	0,36	p>0,05
55	Óxido de Cariofileno	1546	1549	0,25	0,11	0,14	0,30	0,06	0,10	0,17	0,22	0,17	p>0,05
56	Salvial-4(14)-en-1-ona	1557	1568	0^{a}	0^{a}	0^{a}	$0,07^{a,b}$	0^{a}	0^{a}	$0,15^{b}$	$0,11^{a,b}$	$0,11^{a,b}$	Dunn
Total				98,46	96,80	98,15	96,00	97,53	99,82	97,06	97,07	95,29	

A-I: Muestras de orégano. **RA%**: Área relativa porcentual. .^{a,b,c,d} Letras distintas indican diferencias significativas entre las muestras. **KI[e]**: Índice de retención de Kovats obtenido experimentalmente. **KI[r]**: Índice de retención de Kovats de referencia. Con variables que cumplían los supuestos estadísticos, se utilizó ANOVA paramétrica y test posterior TUKEY ($p<0,05$). Con las variables que no cumplían los supuestos estadísticos, se usó ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis, $p<0,05$) con test posterior de Dunn.

Como se puede observar en la **Tabla 1**, la composición de COVs fue diferente en cada muestra, incluso en los COVs más significativos en proporción (aquellos cuyos porcentajes correspondieron al 5 % o más). Muestra **A**: *p*-Cimeno (4,89 %), γ-Terpineno (4,68 %), 4-Terpineol (17,36 %), α-Terpineol (4,50 %), Carvacrol Metil Éter (4,71 %), Linalil Acetato (5,77 %), Timol (13,07 %) y Carvacrol (9,70 %). Muestra **B:** *p*-Cimeno (6,77 %), γ-Terpineno (4,88 %), 4-Terpineol (18,06 %) y Timol (24,40 %). Muestra **C**: *p*-Cimeno (10,06 %), γ-Terpineno (7,04 %), 4-Terpineol (12,41 %), Timol (32,81 %) y Carvacrol (5,83 %). Muestra **D**: *l*-Linalol (7,37 %) y Timol (55,46 %). Muestra **E**: *p*-Cimeno (6,47 %), γ-Terpineno (9,46 %), *trans*-Sabineno Hidrato (7,22 %), *cis*-Sabineno Hidrato (6,00 %), *l*-Linalol (5,59 %), 4-Terpineol (8,23 %) y Timol (25,29 %). Muestra **F**: *p*-Cimeno (4,86 %), γ-Terpineno (6,17 %), *cis*-Sabineno Hidrato (7,28 %), *l*-Linalol (6,52 %), 4-Terpineol (14,19 %) y Timol (31,90). Muestra **G**: *trans*-Sabineno Hidrato (5,16 %), *cis*-Sabineno Hidrato (5,67 %), *l*-Linalol (4,54 %), 4-Terpineol (12,10 %) y Timol (34,05 %). Muestra **H**, *p*-Cimeno (5,95 %), γ-Terpineno (5,12 %), *l*-Linalol (4,60 %), 4-Terpineol (16,54 %) y Timol (27,88 %). Muestra **I**: *p*-Cimeno (4,27 %), γ-Terpineno (6,73 %), *trans*-Sabineno Hidrato (5,89 %), *cis*-Sabineno Hidrato (15,62 %), 4-Terpineol (6,32 %) y Timol (25,17 %).

En la **Tabla 1** se muestran también los resultados del análisis de varianza (ANOVA), no observándose diferencias significativas ($p<0,05$) en la composición de α-Copaeno, *n*-Tetradecano, Aromadendreno, Geranil Acetona, Spatulenol y Óxido de Cariofileno. En la composición de los demás COVs se observaron diferencias significativas con un nivel de significancia del 5 % ($p<0,05$).

Cuando se realizó el análisis de PCA sobre la totalidad de COVs de la **Tabla 1**, se obtuvieron ocho componentes principales, reuniendo las tres primeras componentes el 68 % de la varianza total (**Tabla 2**). Las **Figuras 1**, **2** y **3** muestran los gráficos de las tres primeras componentes rotadas (PC1 vs. PC2; PC1 vs PC3 y PC2 vs PC3). A partir de un análisis de los gráficos se puede observar que las muestras se separan en cinco: B, E y F forman un grupo con características similares, H, G e I forman otro grupo, mientras que A, C y D están separadas entre sí y del resto.

Tabla 2. Autovalores de la matriz de correlación del Análisis de Componentes Principales (PCA).

	PC 1	PC 2	PC 3	PC 4	PC 5	PC 6	PC 7	PCA 8
Autovalor	15,21	14,30	8,18	6,91	4,62	2,81	2,22	1,75
% de la varianza total	27	26	15	12	8	5	4	3

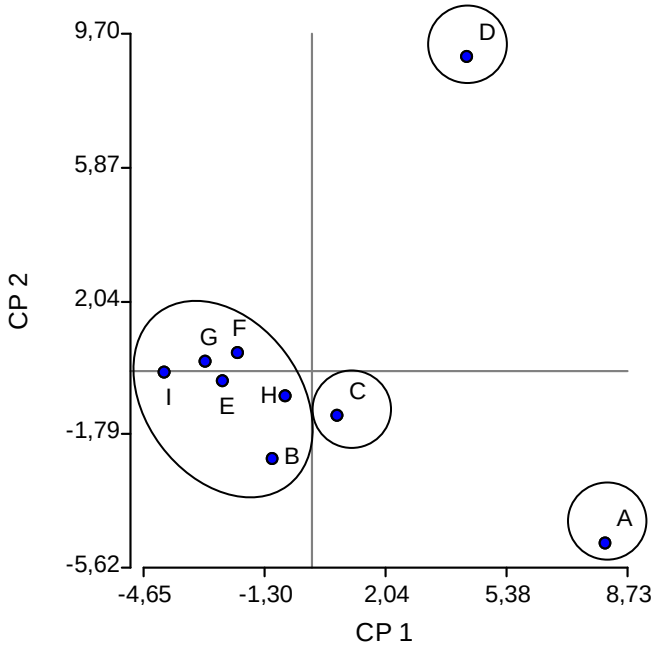


Figura 1. Gráfico de los componentes principales 1 y 2 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los COVs presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

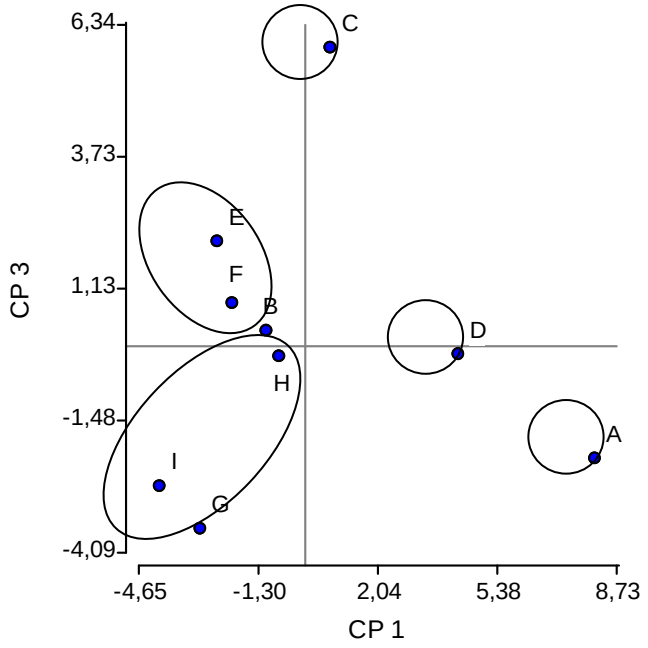


Figura 2. Gráfico de los componentes principales 1 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los COVs presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

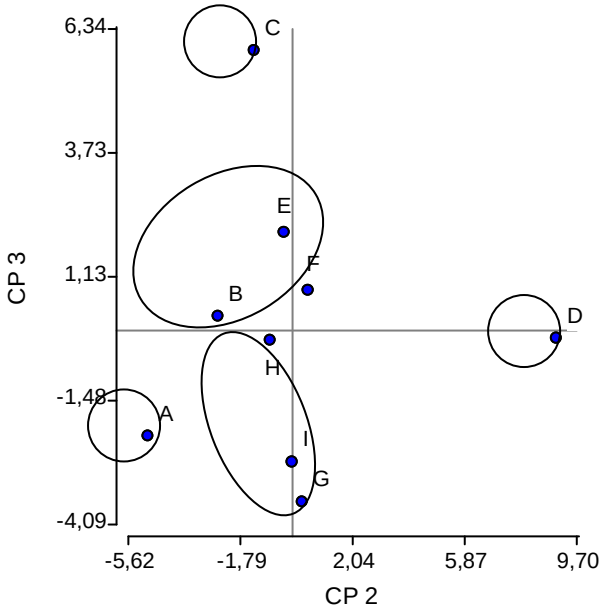


Figura 3. Gráfico de los componentes principales 2 y 3 rotados, resultantes del PCA sobre la matriz de correlación de los COVs presentes en las nueve muestras comerciales de orégano.

La **Figura 4** presenta el dendograma correspondiente a la evolución del agrupamiento de conglomerados en función de la distancia Euclídea a las variables COVs (en porcentaje) usando como criterio de clasificación las muestras comerciales de orégano y las cuatro primeras componentes principales del PCA. Fijando un criterio de corte arbitrario en la distancia 1,79 (50 % de la distancia máxima), la muestra D se separa del resto. Las muestras más alejadas entre sí son A y D, las muestras G, H e I forman un grupo, mientras que las muestras B, E y F forman otro grupo. Las muestras A, C y D se separan entre sí y del resto.

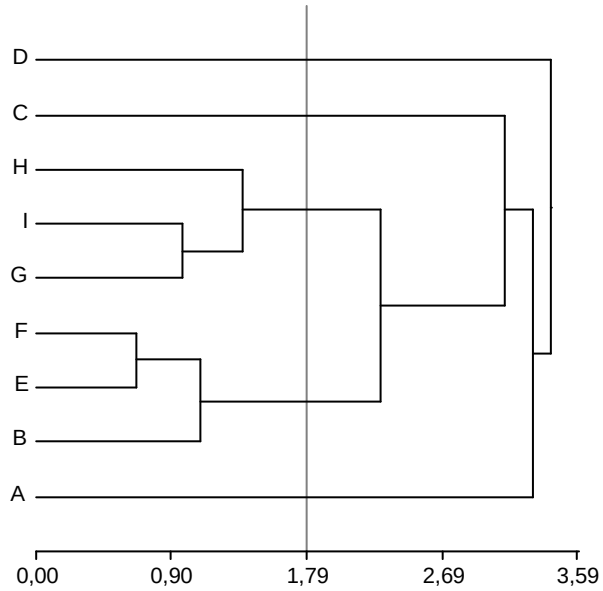


Figura 4. Dendrograma obtenido al realizar un Análisis por Conglomerados jerárquicos con el método de encadenamiento promedio y distancia Euclídea sobre la base de la variedad de COVs de las muestras comerciales de orégano y las cuatro primeras componentes principales.

CONCLUSIONES

La HS-SPME/GC-MS resultó un sistema analítico sencillo, rápido, selectivo y sensible, capaz de proveer valiosa información sobre la composición de COVs de las muestras comerciales de orégano. Además, la potencialidad de la técnica se vio amplificada a través del uso de las herramientas estadísticas utilizadas, en especial el análisis multivariado, ya que permitieron establecer similitudes y diferencias entre las muestras a partir de los agrupamientos obtenidos por la aplicación de dicho análisis.

Con el ANOVA se pudieron establecer similitudes y diferencias significativas en la composición de las muestras. Además, los correspondientes análisis por PCA y CA establecieron agrupamientos entre muestras según la composición de los COVs.

La visualización a través del análisis multivariado de distintos agrupamientos y las diferencias en la composición de las muestras, pueden deberse a que se utilizan diferentes especies de *Origanum* para la elaboración del orégano comercial, a los diferentes orígenes territoriales de las especies utilizadas (regiones de cultivo) o una mezcla de ambos factores.

Es de esperar, que estas diferencias en la composición de las muestras estudiadas, tengan algún tipo de efecto sobre la aceptación o rechazo por parte de lo consumidores. En la actualidad, se están llevando a cabo mayores estudios para apoyar esta hipótesis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico brindado por: UCC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arizio O y Curioni A. 2003. Productos aromáticos y medicinales. Estudio 1. EG. 33. 7. Estudios Agroalimentarios. Componente A: Fortalezas y debilidades del sector agroalimentario. Instituto Interamericano de Cooperación Agrícola (IIICA)-CEPAL. URL: http://www.iica.org.ar.

Brokl M, Flores G, Blanch G y Ruiz del Castillo M. 2006. Changes in the enantiomeric distribution of selected volatile constiuents of *Mentha pulegium* L. powders caused by hot water treatment. J. Agric. Food Chem. 54, 8836-8841.

Cao J, Qi M, Fang L, Zhou S, Fu R, Zhang P. 2006. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatile compounds from *Curcuma wenyujin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 552–558.

Chen JL, Yan S, Feng Z, Xiao L, Hu XS. 2006. Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Yali pear (*Pyrus bertschneideri* Reld) during storage. Food Chem. 97, 248.

Consejo Federal de Ciencia y Tecnología (COFECYT). 2007: Proyectos Federales de Innovación Productiva – Eslabonamientos Productivos (PFIP-ESPRO): Debilidades y desafíos tecnológicos del sector productivo: Especias, hierbas aromáticas y medicinales.c Catamarca, Córdoba, Misiones, Salta.

Fang L, Qi M, Li T, Shao Q, Fu R. 2006. Headspace solvent microextraction-gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. J. of Pharm. and Biomed. Anal. 41, 791.

Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. J. Chromatogr. A 880, 35–62.

Krutz LJ, Senseman SA, Sciumbato AS. 2003. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. J. Chromatogr. A 999, 103–121.

Liang M, Qi M, Zhang C, Zhou S, Fu R, Huang J. 2005. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds from *Houttuynia cordata* Thunb after extraction by solid-phase microextraction, flash evaporation and steam distillation. Anal. Chim. Acta 531, 97–104.

Lord H y Pawliszyn J 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. J. Chromatogr. A, 885, 153-193.

Luthria D, Lin L, Robbins R, Finley J, Banuelos G y Harnly J. 2008. Discriminating between Cultivars and Treatments of Broccoli Using Mass Spectral Fingerprinting and Analysis of Variance−Principal Component Analysis. *J. Agric. Food Chem. 56*, 9819–9827.

NIST. 2008. Base de Datos de Referencia Estándar. URL: http://webbook.nist.gov/chemistry/

Pawliszyn J, y Arthur, CI. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 62, 2145.

Pherobase. 2008. Base de datos: URL: http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php

Vázquez AM, Demmel GI, Ferrari MC, Criado SG, Cavaglia DJ, Aimar ML. 2009. Optimización de un método de microextracción en fase sólida/cromatografía gas-masa para determinar la composición del aroma de orégano comercial. III Congreso Iternacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Córdoba, Argentina. Código GP10.

Optimización del método de Microextracción en Fase Sólida acoplada a cromatografía de gases con detector de masas para la determinación de la composición del aroma de orégano comercial

Optimization of the method of Solid Phase Microextraction coupled to gas chromatography with mass detector for determining the composition of the aroma of commercial oregano

Vázquez, AM(1), Demmel GI(1), Ferrari MC(1), Criado SG(1), Cavaglia DJ(1), Aimar ML(2)

(1) Laboratorio de Tecnología Química, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba, Argentina.
(2) Subsecretaría Ceprocor, Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba, Argentina.
ana.vazquez.s@gmail.com

RESUMEN

Se realizó un estudio sobre la optimización de la Microextracción en Fase Sólida del Espacio de Cabeza con posterior análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (HS-SPME/GC-MS) para usar en la determinación de la composición de los Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs) presentes en muestras comerciales de orégano. Se estudió el efecto del tipo de fibra, de la temperatura de extracción, del tiempo de equilibrio del espacio de cabeza (HS) y del tiempo de exposición de la fibra al HS sobre el proceso de microextracción. Como criterio de comparación se utilizaron las áreas de los picos obtenidos en los cromatogramas. Los mejores resultados se obtuvieron empleando una fibra de Divinilbenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS), trabajando a 40 ºC, dejando el sistema alcance el equilibrio durante 10 minutos y exponiendo la fibra en el HS durante 60 minutos. En esas condiciones se analizó una muestra de orégano elegida entre nueve muestras comerciales, pudiéndose identificar 38 compuestos en total, lo cual correspondió a alrededor del 95 % de los picos observados.

ABSTRACT

A study on the optimization of Headspace - Solid Phase Microextraction (HS-SPME) with subsequent analysis by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry was performed to use for determining the composition of volatile organic compounds (VOCs) of commercial samples of oregano. It was studied the effect of fiber composition (extracting phase), extraction temperature, equilibrium time of the HS and extraction time on the process of micro-extraction. The peak areas obtained in the chromatograms was used as comparison criterion. The best results were obtained using the phase Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS), working at 40 ºC, with 10 minutes of equilibrium of HS and 60 minutes of exposure in the HS. A sample of oregano was analysed in those conditions, 38 compounds was identified, which corresponded around 95% of the observed picks.

PALABRAS CLAVE: *orégano, aroma, optimización, HS-SPME, GC-MS.*

KEYWORDS: *oregano, aroma, optimization, HS-SPME, GC-MS.*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) representan una pequeña fracción de la composición química de los vegetales, sin embargo son, en última instancia, los responsables del aroma que caracteriza a las plantas aromáticas, utilizadas como especias en la condimentación de alimentos.

Esta compleja mezcla de COVs, que se extiende desde algunas decenas hasta varios centenares de compuestos químicos, por lo general, está formada por hidrocarburos (terpenos y

sesquiterpenos) y por compuestos oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, fenoles, óxidos, lactosas, acetales, éteres y ésteres). La proporción de cada uno de ellos en la composición de la mezcla es diferente y el aroma y el sabor de la especia es el resultado de la combinación de todos los ellos, incluidos los que se encuentran a nivel de trazas (Anitescu, *et al.* 1997).

Varias metodologías analíticas para obtención y caracterización de estos COVs han sido utilizadas para tratar de establecer las propiedades aromáticas de plantas que presentan interés para la industria farmacéutica, de fragancias y de alimentos (Pourmotazavi, *et al*. 2007). Entre ellas se destacan, la destilación por arrastre con vapor de agua, la extracción con solventes orgánicos, la extracción por fluidos supercríticos, sistemas de purga y trampa, etc. No obstante, todas ellas presentan algunas claras desventajas (Illes, *et al.* 2000; Eikani, *et al.* 1999). Una vez obtenida la mezcla de los COVs (por ejemplo, el aceite esencial), esta es analizada generalmente mediante el empleo de métodos cromatográficos acoplados a una posterior identificación por espectrometría de masas.

La Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica que ha sido desarrollada recientemente (Pawliszyn y Arthur 1990). Debido a sus grandes ventajas comparativas con respecto a las técnicas clásicas de extracción, ha alcanzado una rápida aceptación (Kataoka *et al* 2000, Krutz *et al* 2003). Es una metodología libre de solventes, sensible, selectiva (Lord y Pawliszyn 2000), que necesita una pequeña cantidad de muestra y que puede ser aplicada a una amplia variedad de analitos orgánicos. El procedimiento de toma de muestra es muy sencillo y se realiza mediante la exposición de una fibra de sílice recubierta con polímeros (fase extractante) al espacio de cabeza (HS) de la matriz de una muestra. Allí, se produce un equilibrio de partición del analito entre la fibra y la matriz de la muestra: el film polimérico sobre la fibra concentra los analitos orgánicos sobre su superficie (adsorción o absorción) y la cantidad de analito extraído es directamente proporcional a su concentración en el HS. Posteriormente, la fibra es introducida directamente dentro del puerto de inyección de un Cromatógrafo de Gases donde los analitos se desorben térmicamente para su correspondiente análisis e identificación.

En la actualidad, se dispone de un número importante de fibras comerciales para SPME las que se diferencian por tipo de recubrimiento y polaridad. Las fibras comúnmente utilizadas son las recubiertas por Polidimetilsiloxano (PDMS), Divilnilbenceno (DVB), Carboxeno (CAR) y Poliacrilato (PA) o combinaciones dobles o múltiples de ellas. Es de destacar que se ha observado que para muestras complejas, las fibras recubiertas con mezclas de polímeros poseen mayor eficiencia de extracción (Pellati *et al*. 2005, Adam *et al.* 2005, Deng *et al.* 2004).

Esta nueva forma de muestreo es actualmente muy utilizada para la caracterización de COVs presentes en diferentes muestras; ejemplos de ello son las determinaciones realizadas sobre plantas aromáticas y medicinales (Chen *et al.* 2006, Fang *et al*. 2006, Cao *et al*. 2006, Liang *et al*. 2005, Broki *et al*. 2006), en alimentos como aceite de oliva (Flores, *et al.* 2006), vinos (Cámara, *et al.* 2006, Demyttenaere, *et al.* 2003, Rocha, et al. 2006), aromas de duraznos (Guillot, *et al.* 2006), en determinaciones de feromonas en orina (Kayali-Sayadi, et al. 2003) y en determinaciones de pesticidas en agua (Chen, et al. 2006), entre otros.

En el caso particular de la producción de plantas aromáticas, uno de los principales problemas es establecer procesos productivos que determinen la calidad del producto. Más aun, el control de calidad del producto terminado es un problema analítico de relativa complejidad cuando se utilizan técnicas de extracción de COVs clásicas.

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, el presente trabajo se desarrolló con el propósito de encontrar las mejores condiciones analíticas, para la determinación de los COVs presentes en muestras comerciales de orégano, a fin de establecer una metodología de control de calidad capaz de diferenciar productos provenientes de diversos orígenes y que presenten diferente calidad.

Por este motivo, describimos aquí, los resultados alcanzados en un estudio sistemático sobre el efecto que ejercen las variables: tipo de fibra, temperatura de extracción, tiempo de equilibrio del HS y tiempo de exposición de la fibra al HS (Fang *et al.* 2006, Guo *et al.* 2006, Deng *et al*. 2006), sobre el proceso de HS-SPME/GC-MS con el objetivo de desarrollar un método de control de calidad en muestras comerciales de *Origanum sp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la realización del presente estudio se seleccionaron nueve muestras comerciales de orégano, las cuales fueron colectadas desde distintos puntos de venta de la Ciudad de Córdoba (Argentina). A cada muestra se le asigno una letra desde la A hasta la I. En un análisis exploratorio previo, se observó que la muestra comercial identificada con la letra A fue la que presenta mayor cantidad de compuestos orgánicos volátiles en sus cromatogramas. Por esta razón, se utilizó la muestra A para obtener las mejores condiciones de análisis.

Para la realización de los estudios, se emplearon alícuotas de (100,0 ± 0,1) mg de la muestra A, que fueron colocadas en viales de vidrio de 20 cm^3 cerrados herméticamente con septa de Vitón (Supelco de Sigma-Aldrich, Argentina) y precintos de aluminio. Posteriormente los viales sellados conteniendo las muestras fueron introducidos en un baño de agua termostatizado (precisión ± 0,2 ºC) marca PolyScience modelo 8005 para realizar los ensayos bajo condiciones de temperatura controlada y determinar la temperatura de trabajo. Para la introducción de las fibras en el HS de las muestras, se utilizó un portafibra manual (Holder) para SPME.

Durante los estudios descriptos en le presente trabajo, se evaluaron cinco tipos de fibras diferentes: Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm; Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65 μm; Carboxeno-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) de 85 μm, Divinilbenceno-Carboxeno-Polidimetilsiloxano (DVB-CAR-PDMS) de 50/30 μm y Poliacrilato (PA) de 85 μm (Supelco de Sigma-Aldrich, Argentina). Antes de ser utilizadas en los análisis correspondientes, las fibras fueron acondicionadas, dentro del inyector del cromatógrafo a 225 ºC, durante 8 horas para eliminar cualquier contaminación. Una vez que las fibras fueron activadas, éstas fueron guardadas en recipientes herméticos, limpios y secos hasta su uso.

Métodos

El estudio del efecto de cada variable (tipo de fibra, temperatura, tiempo de equilibrio del HS y tiempo de exposición de la fibra) sobre el proceso de microextracción, se realizó modificando una de ellas mientras las demás variables se mantuvieron constantes.

Una vez que los COVs fueron absorbidos o adsorbidos por las fibras, éstas fueron introducidas en el inyector del cromatógrafo para su desorción durante 5 minutos. El equipo utilizado para la realización de todos los análisis fue un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard HP 5890 Serie II adosado a un detector de Masas HP 5970, equipado con un puerto de inyección manual *split/splitless* y una columna capilar RTX-5 (15 m x 0,25 mm DI x 0,25 μm d_f). Las condiciones cromatográficas fueron: inyector 225 ºC; hormo 40 ºC (5 min) hasta 200 ºC (5 min), velocidad de calentamiento: 5 ºC/min; gas carrier: He 99,99 %; presión de cabeza: 5 p.s.i. El Espectrómetro de Masas operó a 70 eV y los espectros se registraron en el rango de *m/z* 25-550 uma en el modo de adquisición "*scan-full*". La temperatura de la interfase fue 230 ºC. El sistema de procesamiento de datos usado fue un HP MS *ChemStation*. Cada determinación fue realizada por triplicado y el desvío estándar relativo del promedio fue menor al 5 % en todos los casos.

La identidad de los COVs en los cromatogramas fue establecida mediante la comparación de sus espectros de masas con los reportados en las Bibliotecas NIST y Wiley (match > 70) y a través de la determinación de los respectivos índices de retención de Kovats (KI), los cuales fueron comparados con los reportados en las bases de datos NIST 2008 y Pherobase 2008.

La composición porcentual de los COVs fue establecida mediante la normalización de las áreas de los picos del cromatograma con respecto al área total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que durante los análisis, en ningún caso se vio afectada la cantidad de picos obtenidos en los cromatogramas, se utilizó la sumatoria de las áreas de los picos para evaluar el efecto de las variables: tipo de fibra, temperatura, tiempo de equilibrio del HS y tiempo de exposición de la fibra al HS, sobre el proceso de microextracción. La **Figura 1** muestra el área total de picos de los cromatogramas para cada tipo de fibra evaluada.

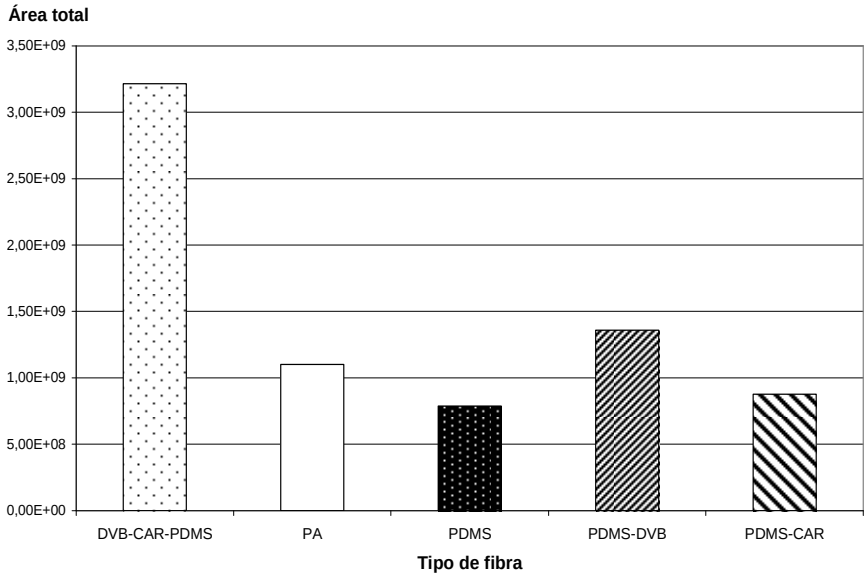
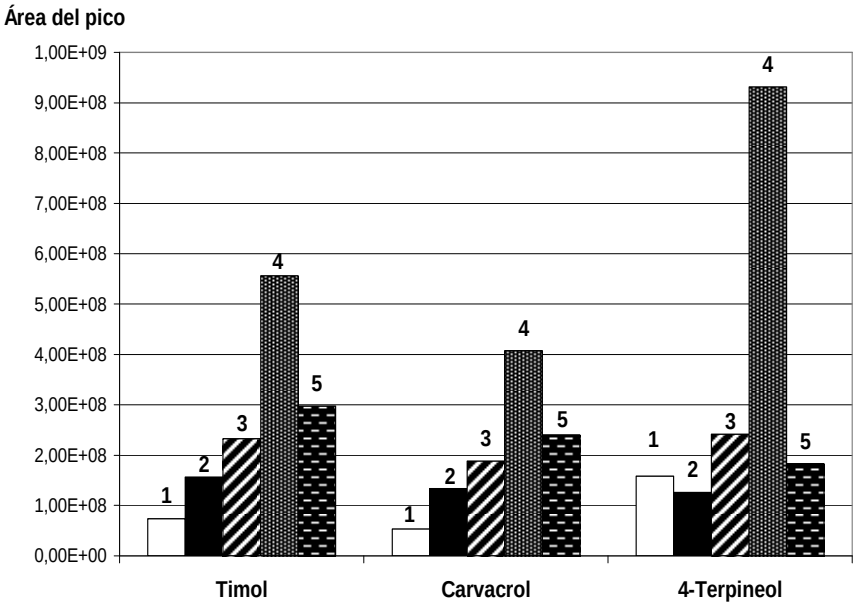


Figura 1.Efecto del tipo de fibra sobre el área total de picos obtenida en los cromatogramas.

Como se puede observar en dicha figura, la fibra DVB-CAR-PDMS fue la que presentó mayor eficiencia de extracción. De manera similar, la **Figura 2** muestra el efecto del tipo de fibra sobre la extracción de los COVs mayoritarios de la muestra de orégano analizada (Timol, Carvacrol y 4-Terpineol) y nuevamente, la fibra DVB-CAR-PDMS mostró mayor capacidad de extracción. Es de destacar que la fibra DVB-CAR-PDMS mostró una afinidad por los COVs presentes en la muestra de orégano, de más del doble comparada con las otras fibras estudiadas.



(**1**) PDMS; (**2**) CAR-PDMS; (**3**) DVB-PDMS; (**4**) DVB-CAR-PDMS; (**5**) PA.

Figura 2. Efecto del tipo de fibra sobre el área de los picos mayoritarios de orégano.

El efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción de COVs se llevó a cabo utilizando la fibra compuesta por DVB/CAR/PDMS y se trabajó a 10 minutos de tiempo de equilibrio del HS y 10 minutos de exposición de la fibra en el HS. Las temperaturas estudiadas fueron 25; 30; 35; 40; 50; 70; 80 y 90ºC. Los resultados alcanzados son resumidos en la **Figura 3**. Como se puede observar en dicha figura, el área total de los picos se incrementa siempre, cuando aumenta la temperatura.

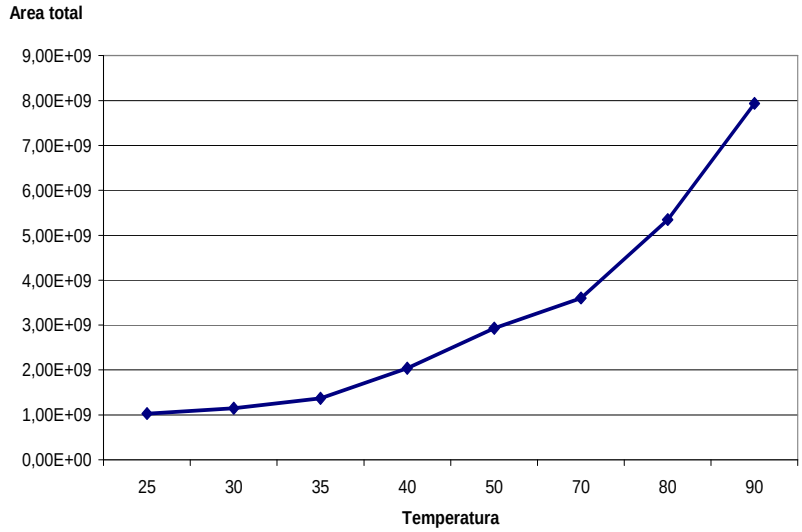
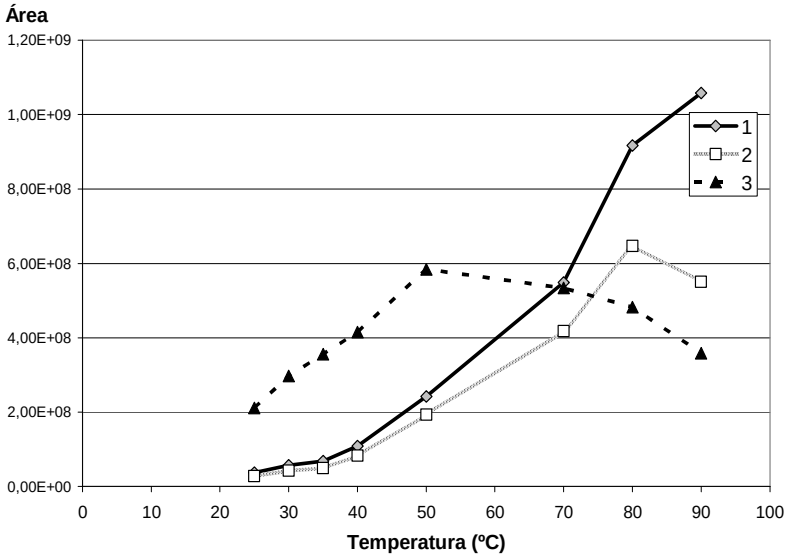


Figura 3. Efecto de la temperatura de extracción sobre el área total de picos del cromatograma.

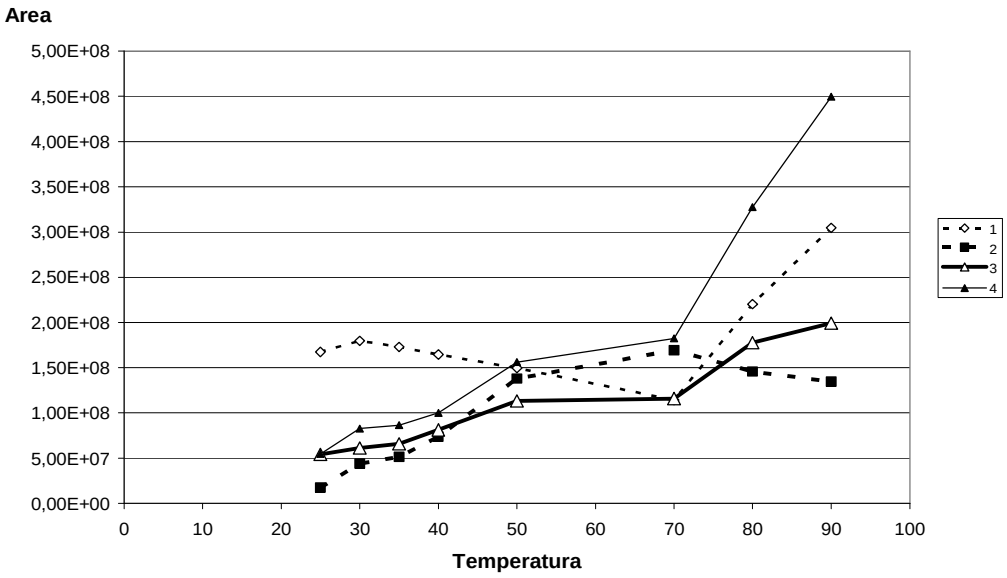
La **Figura 4** muestra el efecto de la temperatura sobre las áreas individuales de los COVs cuyas áreas correspondieron al 10 % o más del área total de picos obtenidos. En este caso, el área de Timol aumenta de manera proporcional a la temperatura, mientras que el área de Carvacrol aumenta hasta los 80 ºC y posteriormente disminuye. En el caso de 4-Terpineol, el área aumenta con la temperatura hasta los 50 ºC, a partir de la cual su área comienza a disminuir.



(**1**) Timol; (**2**) Carvacrol; (**3**) 4-Terpineol.

Figura 4. Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los COVs mayoritarios de orégano.

La **Figura 5** muestra el efecto comparado de la temperatura sobre las áreas individuales de COVs minoritarios (γ-Terpineno; α-Terpineol; Carvacrol Metil Éter y Linalil Acetato) cuyas áreas correspondían aproximadamente al 5 % o más del área total de picos obtenidos. En la mayoría de los casos, el área aumentó con la temperatura. Excepto con γ–Terpineno, que al aumentar la temperatura su área se mantiene aproximadamente constante hasta 40 ºC, luego disminuye hasta los 70 ºC y a partir de la cual aumenta bruscamente. De manera similar, el área de α-Terpineol aumenta hasta los 70 ºC, y posteriormente comienza a disminuir su área a medida que la temperatura aumenta.



(**1**) γ-Terpineno; (**2**) α-Terpineol; (**3**) Carvacrol Metil Éter y (**4**) Linalil Acetato.

Figura 5. Efecto de la temperatura de extracción sobre las áreas de los COVs minoritarios de orégano.

Como se puede observar en las **Figuras 4** y **5**, la temperatura ejerce un efecto diferente sobre cada COV, aunque, en general, hasta los 40 ºC todos aumentan su área con el aumento de dicha variable. Debido a esta razón, la temperatura de trabajo elegida para continuar los estudios fue 40 ºC.
El estudio del efecto del tiempo de equilibrio del HS y de exposición de la fibra al HS se llevó a cabo a 40 ºC, usando la fibra DVB/CAR/PDMS. Los tiempos se variaron desde los 10 minutos hasta los 60 minutos en ambos casos. Los resultados se pueden observar en la **Figura 6**. Como se puede apreciar, el tiempo de exposición de la fibra ejerce mayor influencia sobre el área total de picos que el tiempo de equilibrio del HS, siendo ésta mayor a los 60 minutos de exposición.

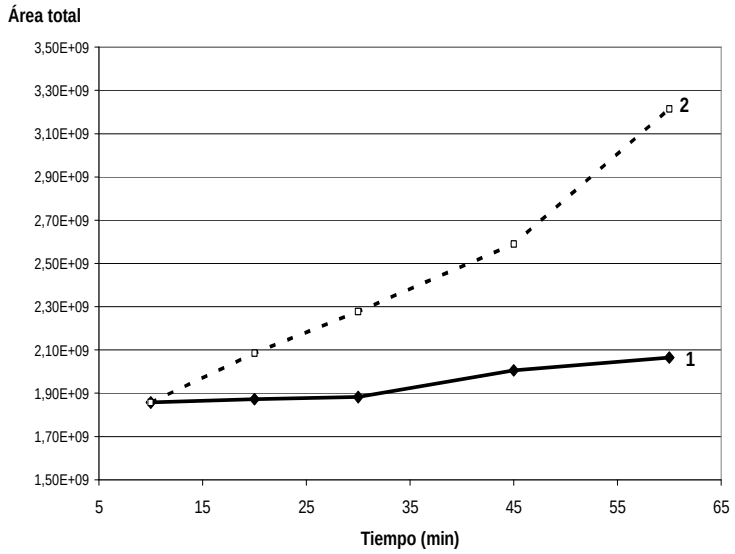


Figura 6. Efecto del tiempo de equilibrado del HS y de exposición de la fibra sobre la microextracción de COVs. (**1**) Efecto del tiempo de equilibrio del HS; (**2**) Efecto del tiempo de exposición de la fibra.

La **Figura 7** presenta el cromatograma de la muestra de orégano analizada, obtenido en las condiciones óptimas de HS-SPME/GC-MS. En dichas condiciones lograron identificarse 39 COVs, lo que correspondió a alrededor del 95 % del total de picos observados en el cromatograma (**Tabla 1**).

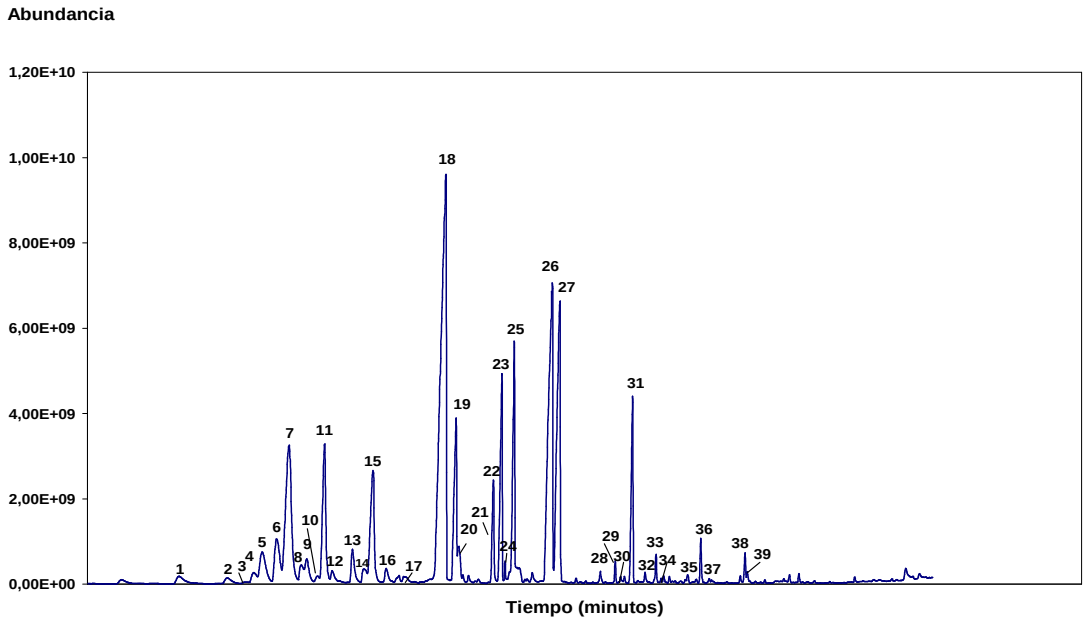


Figura 7. Cromatograma obtenido con la muestra A de orégano comercial una vez establecidas las condiciones óptimas de microextracción.

Tabla 1. Composición porcentual de COVs en la muestra A de orégano comercial.

Nº	Compuesto	KI^{e}	KI^{r}	A (RA%)
1	α-Tujeno	918	919	0,39
2	Sabineno	963	964	0,73
3	1-Octen-3-ol	977	978	0,25
4	Mirceno	982	983	0,72
5	α-Felandreno	988	989	1,12
6	α-Terpineno	998	993	1,80
7	*p*-Cimeno	1008	1010	4,89
8	β-Felandreno	1013	1012	2,96
9	*cis*-Ocimeno	1027	1028	0,90
10	*trans*-β-Ocimeno	1032	1032	0,26
11	γ-Terpineno	1047	1049	4,68
12	*trans*-Sabineno Hidrato	1081	1089	1,72
13	α-Terpinoleno	1071	1072	1,07
14	*cis*-Sabineno Hidrato	1086	1097	3,50
15	*l*-Linalol	1090	1092	3,85
16	p-Menta-2-en-1-ol	1100	1097	1,51
17	1-Terpineol	1122	1130	1,18
18	4-Terpineol	1162	1161	17,36
19	α-Terpineol	1174	1172	4,50
20	*cis*-Piperitol	1202	1199	1,42
21	Timil Metil Eter	1215	1216	2,30
22	Carvacrol Metil Eter	1225	1228	4,71
23	Timoquinona	1232	1242	0,64
24	Linalil Acetato	1249	1248	5,77
25	Timol	1292	1292	13,07

Tabla 1. (Continuación).

26	Carvacrol	1295	1296	9,70
27	Neril Acetato	1347	1345	0,17
28	Geranil Acetato	1364	1364	0,21
29	*n*-Tetradecano	1378	1399	0,78
30	β-Cariofileno	1387	1390	3,79
31	Aromadendreno	1404	1439	0,19
32	α-Cariofileno	1419	1423	0,47
33	Geranil Acetona	1430	1436	0,19
34	Germacreno B	1464	1463	0,14
35	β-Bisaboleno	1482	1484	0,61
36	δ-Cadineno	1493	1495	0,18
37	Spatulenol	1543	1537	0,48
38	Óxido de Cariofileno	1546	1549	0,25
TOTAL	94,67			

KI^e: Índice de Retención de Kovats obtenido experimentalmente; **KI^r:** Índice de Retención de Kovats de bibliografía; **RA%:** Área Relativa Porcentual.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las condiciones de microextracción de COVs del orégano analizado por HS-SPME/GC-MS fueron: fibra DVB-CAR-PDMS, tiempo de equilibrio del HS: 10 minutos, tiempo de exposición de la fibra al HS: 60 minutos, temperatura de trabajo: 40 ºC. En todas las condiciones, la reproducibilidad analítica fue satisfactoria y los desvíos estándares relativos porcentuales resultaron menores al 5 % en las réplicas por triplicado de todas las determinaciones.

Con respecto al aumento del área de los picos en los cromatogramas con la temperatura, es posible que ésta se deba a un aumento de la concentración de volátiles en el HS, mientras que la disminución del área que experimentan algunos compuestos a temperaturas elevadas, puede ser debida a su descomposición o a procesos de desorción parcial desde la fibra. No obstante, mayores estudios son necesarios para corroborar estas hipótesis. Además, estos resultados apoyan las observaciones descriptas en bibliografía (Lord y Pawliszyn 2000), que la temperatura de extracción tiene una influencia significativa en el proceso de HS-SPME debido a que se ven afectados los coeficientes de distribución de los COVs entre la matriz de la muestra y el HS, y entre el HS y la fibra.

Una vez estandarizada la metodología de trabajo, la combinación HS-SPME/GC-MS, resultó un sistema analítico sencillo, rápido, selectivo y sensible, capaz de proveer valiosa información sobre la composición de una muestra de orégano comercial.

De esta manera, es posible plantear como una metodología analítica para la realización de controles de calidad sobre muestras de orégano comercial a la poderosa combinación HS-SPME/ GC-MS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico brindado por UCC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam M, Juklová M, Bajer T, Eisner A y Ventura K. 2005. Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacon (Smallanthus sonchifolius) leaves. J. Chromatogr. A 1084, 2–6.

Anitescu G, Doneanu C, Radulescu V. 1997. Isolation of Coriander Oil: Comparison Between Steam Distillation and Supercritical CO_2 Extraction. J. Flavour Fragr. 12, 173-178.

Brokl M, Flores G, Blanch G y Ruiz del Castillo M. 2006. Changes in the enantiomeric distribution of selected volatile constiuents of *Mentha pulegium* L. powders caused by hot water treatment. J. Agric. Food Chem. 54, 8836-8841.

Cámara JS, Alves MA, Marquez JC. 2007. Classification of Boal, Malvazia, Sercial and Verdelho wines based on terpenoid patterns. Food Chem. 101(2), 475-484.

Cao J, Qi M, Fang L, Zhou S, Fu R, Zhang P. 2006. Solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatile compounds from *Curcuma wenyujin*. J. Pharm. Biomed. Anal. 40, 552–558.

Chen JL, Yan S, Feng Z, Xiao L, Hu XS. 2006. Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Yali pear (*Pyrus bertschneideri* Reld) during storage. Food Chem. 97, 248.

Chen PS, Huang SD. 2006. Determination of ethoprop, diazinon, disulfoton and fenthion using dynamic hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. Talanta 69, 669-675.

Demyttenaere JCR, Dagher C, Sandra P, Kallithraka S, Verhé R, De Kimpe R. 2003. Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr. A 985, 233-246.

Deng C, Ji J, Li N, Yu Y, Duan G, Zhang X. 2006. Fast determination of curcumol, curdione and germacrone in three species of Curcuma rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1117, 115-120.

Deng X, Peng J, Luo B, Wei M, Hu W, Du J. 2004. A direct quantitative analysis method for monitoring biogenic volatile organic compounds released from leaves of *Pelargonium hortorum* in situ. Anal. Bioanal. Chem. 380, 950–957.

Eikani, M. H., Goodarznia, I., Mirza, M. 1999. Supercritical carbon dioxide extraction of cumin seeds (Cuminum cyminum L.) Flavour Fragr. J. 14, 29-36.

Fang L, Qi M, Li T, Shao Q, Fu R. 2006. Headspace solvent microextraction-gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. J. of Pharm. and Biomed. Anal. 41, 791.

Flores G, Ruiz del Castillo ML, Blanch GP, Herraiz M. 2006. Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. Food Chem. 97, 336-342.

Guillot S, Peytavi L, Bureau S, Boulanger R, Lepoutre JP, Couzet J, Schorr-Galindo S. 2006. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography and gas chromatography-olfactometry. Food Chem. 96,147-155.

Guo FQ, Huang LF, Zhou SY, Zhang TM, Liang YZ. 2006. Comparison of the volatile compounds of Atractylodes medicinal plants by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 570, 73–78.

Illes V, Daood HG, Perneczki S, Szokonya L, Perneczki S, Szokonya L, Then M. 2000. Extraction of coriander seed oil by CO_2 and propane at super- and subcritical conditions. Supercrit. Fluids. 17, 177-182.

Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. J. Chromatogr. A 880, 35–62.

Kayali-Sayadi MN, Bautista JS, Polo-Diez LM, Salazar I. 2003. Identification of pheromones in mouse urine by head-space solid phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatrogr. B 796, 55-62.

Krutz LJ, Senseman SA, Sciumbato AS. 2003. Solid-phase microextraction for herbicide determination in environmental samples. J. Chromatogr. A 999, 103–121.

Liang M, Qi M, Zhang C, Zhou S, Fu R, Huang J. 2005. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile compounds from *Houttuynia cordata* Thunb after extraction by solid-phase microextraction, flash evaporation and steam distillation. Anal. Chim. Acta 531, 97–104.

Lord H y Pawliszyn J. 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. J. Chromatogr. A, 885, 153-193.

NIST. 2008. Base de Datos de Referencia Estándar. URL: http://webbook.nist.gov/chemistry/

Pawliszyn J, y Arthur, CI. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 62, 2145.

Pellati F, Benvenuti S, Yoshizaki F, Bertelli D, Rossi MC. 2005. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. J. Chromatogr. A 1087, 265–273.

Pherobase. 2008. Base de datos: URL: http://www.pherobase.com/database/kovats/kovats-index.php

Pourmortazavi SM, Hajimirsadeghi SS. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. J. Chromatogr. A 1163, 2-24.

Rocha SM, Coutinho P, Barros A, Delgadillo I, Coímbra MA. 2006. Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. J. Chromatogr. A 1114, 188-197.

Origen floral y características físico-químicas de mieles de *Apis mellifera L.* del Valle Central de Catamarca, Argentina.

Floral origin and physico-chemical characteristics of *Apis mellifera L.* honey produced in the central valley of the Province of Catamarca, Argentine

Vergara Roig VA (1), Kivatinitz SC (2), Costa MC (3)

(1) Dpto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Catamarca.
(2) Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
(3) Área de Proyectos Especiales, Laboratorio de Palinología. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba.
avroig@c.exactas.unca.edu.ar

RESUMEN

Se analizaron 18 muestras provenientes de diferentes apiarios localizados en el Valle Central de la provincia de Catamarca. Se practicaron análisis melisopalinológicos y análisis físicos y químicos: humedad, acidez, índice de diastasa, color, pH, contenidos de: hidroximetilfurfural (HMF), cenizas totales, sodio y potasio. Los indicadores físico-químicos evaluados, revelan valores típicos de mieles frescas y genuinas. Los espectros polínicos mostraron que *Prosopis spp.*, *Geoffroea decorticans, Ziziphus mistol* Griseb. *y Larrea spp,* determinaron mieles monofloras en el 72% de las muestras analizadas. Las asociaciones botánicas más frecuentes fueron las de *Prosopis* y *Larrea* que ocurrieron en el 90% de las mieles estudiadas. Caracterizar regionalmente éstas mieles es importante para aumentar el valor de comercialización ya que hay un elevado porcentaje de mieles monoflorales. Este hallazgo favorece a los pequeños y medianos apicultores de la provincia de Catamarca quienes podrán producir mieles orgánicas con características particulares y más competitivas en el mercado nacional e internacional.

ABSTRACT

Samples (eighteen) from different apiaries located in the Central Valley of Catamarca province. Melisopalinological analyses were performed as well as physical and chemical analyses: moisture, free acidity, diastase index, color, pH, content hydroxymethylfurfural (HMF), total ash, sodium and potassium. Physical-chemical indicators assessed values are in agreement with that of typical fresh and genuine honey. The pollen spectra showed *Prosopis spp. Geoffroea decorticans*, *Ziziphus* mistol *Griseb.* and *Larrea spp*, identified 72% monofloral honey of the samples tested. The most frequent botanical associations were that of Larrea and Prosopis that account to 90% of the studied honeys. The characterization of honeys from this region is important since there was a high percentage of monofloral honeys a characteristic that confer a higher market value to this product. This finding favors the small and medium apiarists of the province of Catamarca, who may produce honey with distinctive features and placed them in a more competitive way in the national and international market.

PALABRAS CLAVE: *miel, origen floral, polen, parámetros físicos y químicos.*

KEYWORDS: *honey, floral origin, pollen, chemical and physical parameters.*

INTRODUCCIÓN

Argentina es uno de los principales países productores (según información de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación, 72 mil toneladas en el año 2008) y exportadores de miel en el mundo. Este alimento posee atributos sensoriales y nutricionales que dependen, de las fuentes florales que le dieron origen. La abeja melífera es un insecto antófilo por excelencia y utiliza como alimento las recompensas florales primarias: néctar y polen.

El polen presente en las mieles responde a varios factores: ambientales, topográficos, la época del año en la que se produce el acopio, manejo del apiario, entre los que, la flora adquiere un papel preponderante (Lieux, 1975; Costa, 1995). La Provincia de Catamarca se extiende entre los paralelos 25° y 30° de LS y entre los meridianos 64º y 69º LW. Desde el punto de vista fitogeográfico, la provincia posee formaciones boscosas correspondientes a las regiones del Parque Chaqueño, Selva Tucumano Boliviana y Monte (Cabrera et al 1980) (Figura 1). El área de estudio del presente trabajo corresponde a la Región Chaqueña. (Morlans, M.C. 1995). Esta región está representada en Catamarca por dos sub-regiones: el Chaco Serrano y el Chaco Árido. La subregión del Chaco Árido ocupa el SE de Catamarca y su Valle Central; está rodeada por el Chaco Serrano en casi toda su extensión, hacia el NE limita con el Chaco Semiárido. Las fisonomías leñosas tienen una importante contribución de comunidades arbustivas, el sobrepastoreo ha difundido muchas especies leñosas, destacándose las del género *Prosopis*. Como comunidades principales se destacan árboles y arbustos nativos tales como: *Schinopsis* spp. "quebrachos", *Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. "molle de beber", *Zanthoxylum coco* Gillies ex Hook et Arn. "coco", *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan “cebil”, *Celtis* spp. "talas", *Schinus* spp. "aguaribay, molle", *Acacia* spp. "espinillos, aromito", *Condalia microphylla* Cav. "piquillín", *Aspidosperma quebracho-blanco* Schltdl., *Geoffroea decorticans* (Gillies ex Hook et Arn.) Burkart "chañar” y *Larrea* spp. “jarillas".

La provincia produce aproximadamente 70 toneladas anuales de miel y cuenta con más de un centenar de apicultores inscriptos en el RENAPA (Registro Nacional de Productores Apícolas), con unas 6200 colmenas, según el último registro de Fiscalización Apícola (2009), dependiente de la Dirección Provincial de Agricultura. Debido a que estas cifras son poco relevantes, es necesario para la rentabilidad de la producción lograr mieles diferenciadas y con certificación de origen. Son escasos los antecedentes sobre la tipificación y clasificación botánica de las mieles producidas en esta provincia; en contraste con otras regiones productoras de Argentina, pudiendo citarse varios estudios melisopalinológicos, como los de Andrada, A., 2003; Andrada, A.& Tellería, C. 2002, 2005; Basilio, A & Romero, E. 1996, Costa, M.C. 1982; Costa, M. C. et al, 1995, 2003, 2007 a, b; Fagúndez, G. & Caccavari, M. 2002, 2006; Forcone, A. 2002, 2008; Forcone, A. & Tellería, C. 2000; Naab, O. 1993; Naab, O. Et al. 2001, 2007; Salgado, C. & Pire, S. 1998, 1999; Tellería, M. C.; 1988, 1992, 1995, 2000; entre otros.

El objetivo de este trabajo es contribuir a la caracterización de las mieles producidas en la Provincia de Catamarca, abordando el estudio a través del análisis polínico y de análisis físico-químicos. La caracterización que se está realizando, conjuntamente con los análisis sensoriales que se realizarán en una segunda etapa, permitirá que la producción apícola de esta provincia se pueda comercializar en condiciones más favorables y con mayor valor agregado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio (Figura 1)

Los dieciocho apiarios muestreados corresponden a las siguientes localidades: Huillapima (muestras 1 y 2), Nueva Coneta (muestras 7, 9 y 18), Pomancillo Oeste (muestras 8 y 14) y Colonia del Valle (muestra 16) todas del Departamento Capayán; Piedra Blanca (muestras 3 y 13), San Antonio (muestra 5) todas del Departamento Fray M. Esquiú; La Bajada (muestra15), Departamento Paclín; La Antena (muestra 6), Santa Rosa (muestras 10 y12), La Antena (muestra11), Aeropuerto (muestra 4), Santa Cruz (muestra17), todas del Departamento Valle Viejo.

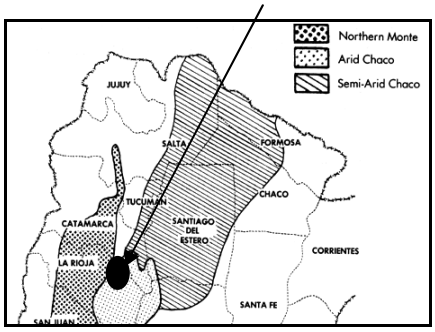


Figura 1. Área de Estudio.

Registros de vegetación

Los registros de vegetación se realizaron en el área de influencia de cada apiario considerando un radio de 3 Km desde el lugar de emplazamiento colmenar. Se realizaron campañas para relevar y recolectar la flora durante el período apícola 2007-2008. Los ejemplares botánicos, herborizados e identificados se encuentran depositados en el Área de Proyectos Especiales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba. Se determinaron los estados fenológicos (inicio, plenitud y fin de floración) siguiendo el criterio de Anderson & Hubritch (1940).

Muestreos y tratamientos

El procesamiento de las mieles se efectuó de acuerdo a Louveaux et al. (1978). Los preparados se realizaron montando el residuo en gelatina glicerinada coloreada con safranina. La frecuencia relativa de los tipos polínicos se obtuvo contando un total de 400 granos. Se utilizó la clasificación de Zander (1935) para indicar la relación entre el polen y la fuente de néctar: polen dominante (más de 45%), polen secundario (16-45%), polen menor (1-15%) y polen en traza (menos del 1%). La presencia de polen dominante denota mieles uniflorales; asimismo, la presencia de polen secundario y menor, caracteriza a las plurifloras (Lieux, 1972). Las determinaciones se llevaron a cabo con microscopio óptico y se utilizó como referencia la palinoteca del Laboratorio de Palinología del Área de Proyectos Especiales (FCEFyN, UNC).

Análisis estadístico

Se efectuó el análisis descriptivo de los parámetro físico-químicos según muestras de origen monoflorales y multiflorales, se utilizaron los gráficos box-plot y para estudiar si los parámetros considerados presentaban diferencias significativas, se aplicó la prueba t de Student para dos muestras independientes (según origen floral) aplicando el software InfoStat/P versión 2009p.

Propiedades físico - químicas

Humedad. Se determinó indirectamente midiendo el índice de refracción a 20 ºC con un refractómetro de mesa tipo Abbe, marca Atago, modelo1T4T, con termosonda en el prisma principal y relacionando este valor con las tablas correspondientes al contenido de humedad.

Índice de diastasa. Se empleo el método de Schpartz y Subers 1966.

Color. Se midió directamente en mm de la escala Pfund, mediante un Colorímetro para miel marca Hanna, Mod. C221, calibrado con glicerol p.a. (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Escala internacional de color de miel.

Color	mm Pfund
Blanco agua	< 8
Extra blanco	9-17
Blanco	18-34
Ámbar extra claro	35-50
Ámbar claro	51-85
Ámbar	86-114
Oscuro	> 114

Acidez libre. Se realizó por titulación de ácidos con hidróxido de sodio en presencia de fenolftaleína como indicador, empleando la muestra disuelta en agua destilada.

Cenizas totales. Se determinaron en forma indirecta, midiendo la conductividad eléctrica, a partir de una solución de miel al 20% (sustancia seca) a 20ºC. Se empleó un conductímetro digital CIBA CORNING NY 14813, con compensación automática de temperatura. Se buscó el valor correspondiente al porcentaje de cenizas en una tabla preparada en función de la conductividad y de los datos de cenizas obtenidos por el método del Codex Alimentarius, FAO/OMS, mediante el método de cuadrados mínimos (Bianchi, M. UNSE.1997).

HMF. Se basa en la relación del hidroximetilfurfural contenido en la muestra de miel, con la p-toluidina y el ácido barbitúrico y se cuantificó a 550 nm con un espectrofotómetro por el Método de Winkler (White 1979).

pH. Para la determinación del pH se empleó 10 g de miel disuelta en agua destilada libre de dióxido de carbono hasta completar 100 ml. La lectura se realizó con pH- metro, previamente calibrado con solución reguladoras de pH 7 y pH 4.

Sodio y potasio. La cuantificación de estos elementos se practicó, analizando una solución de miel, con un Fotómetro de llama, marca Jenway PFP7 calibrado con soluciones patrones de los respectivos iones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo de muestreo se registraron en floración 60 taxones correspondientes a 32 familias. Las Fabaceae, Asteraceae y Anacardiaceae fueron las familias mas representadas por su polen en las mieles.

Del total de polen identificado el 87 % corresponde a especies nativas características del Chaco Árido. Los espectros polínicos muestran que *Prosopis spp., Geoffroea decorticans, Ziziphus mistol* Griseb. *y Larrea spp,* determinan mieles monofloras en el 72% de las muestras analizadas. Asociaciones botánicas de *Prosopis* y *Larrea* ocurren en el 90% de las mieles estudiadas, si en los próximos análisis, al incorporar muestras provenientes de otras localidades cercanas, estas asociaciones permanecen, permitirían determinar el origen geográfico.

Los parámetros físicos y químicos medidos (**Tablas 1** y **2**), condicen con un producto de cosecha reciente, y de acuerdo a las especificaciones del Reglamento Técnico MERCOSUR, se observa que las variables: humedad, cenizas totales, índice de diastasa, acidez libre, HMF no superan los máximos permitidos; por lo tanto, los indicadores de madurez, frescura, limpieza y deterioro, aseguran la aptitud del producto para su consumo como alimento. Si atendemos a los criterios fijados en el Código Alimentario Argentino (CAA), cinco muestras exceden el contenido de humedad autorizado, (máximo 18%); todas las muestras cumplen con holgura los niveles de HMF permitidos, y en el caso del indicador acidez libre, solo una muestra excedió los 40 meq/kg fijados como máximo. El contenido de sodio y potasio es muy variable en las diferentes muestras, sin embargo el aporte nutricional de este último, resulta más importante en todos los casos. Pudo observarse correlación entre el contenido de cenizas totales y el contenido de potasio, pero no entre los niveles de este último mineral y el color. En cuanto a las tonalidades de la miel analizada, estas varían desde el blanco hasta el ámbar, pudiéndose afirmar que predominan los tonos claros. Del total de muestras analizadas: 10 muestras presentan color ámbar claro, 2 muestras son de color ámbar, 5 muestras color ámbar extra claro y 1 muestra de color blanco. Atendiendo a los valores de la **Tabla 1**, se observan valores más elevados de las medias correspondientes al color, la acidez y agua en las mieles monoflorales, en cambio para la muestras multiflorales los valores de las medias son más elevados para las variables HMF, Na y K, presentándose valores similares en las cenizas entre ambos orígenes florales. Visualizando los gráficos boxplot (**Figuras 2** y **3**) para los indicadores acidez y agua, se observa una marcada variabilidad en ellas según el origen floral, por lo cual se aplicó la prueba t de Student (**Tabla 3**), detectando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0054$ y $p < 0,0106$ respectivamente, al 5% de nivel de significación).

Tabla 2. Media, desvío estándar e intervalo de confianza según origen floral.

Monoflorales	**Media**	**DE**	**LI (95%)**	**LS (95%)**
mm Pfund	63,7	18,99	50,12	77,28
HMF (mg/kg)	14,43	7,01	9,42	19,45
Acidez (meq/kg)	28,1	8,09	22,31	33,89
Humedad (%)	17,5	1,04	16,76	18,24
Cenizas (g %)	0,26	0,09	0,19	0,32
Sodio (mg/kg)	17,5	16,91	5,4	29,6
Potasio (mg/kg)	1260,5	373,6	993,24	1527,76
Multiflorales	**Media**	**DE**	**LI (95%)**	**LS (95%)**
mm Pfund	51,29	16,17	36,33	66,24
HMF (mg/kg)	15,41	11,34	4,93	25,9
Acidez(meq/kg)	15,29	6,26	9,49	21,08
Humedad (%)	16,03	1,59	14,56	17,5
Cenizas (g %)	0,26	0,12	0,15	0,37
Sodio (mg/kg)	43,29	55,62	-8,15	94,73
Potasio (mg/kg)	1327,57	458,32	903,69	1751,45

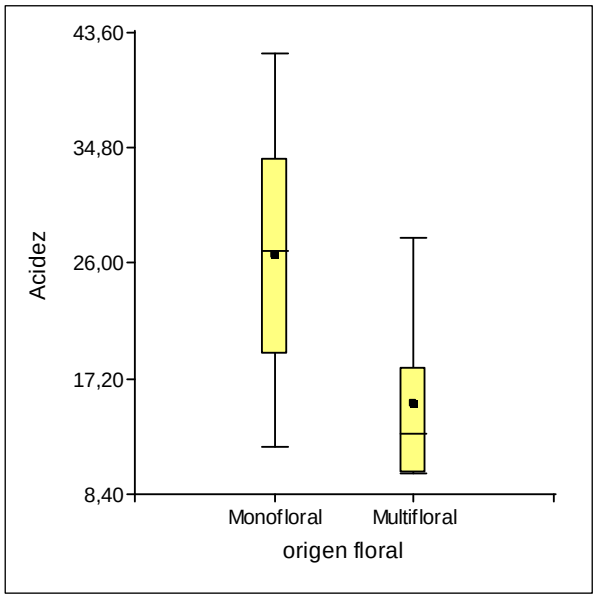


Figura 2. Boxplot de acidez de la miel según rigen floral.

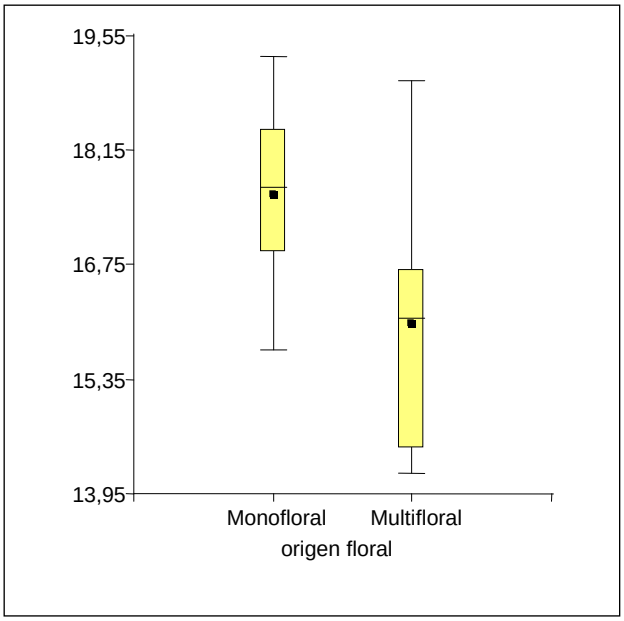


Figura 3. Boxplot de contenido de humedad (%) en miel según origen floral.

Tabla 3. Prueba t Student (Unilateral α=0,05).

Variables	p(Var.Hom.)	T	gl	p
pfund	0,6420	1,66	16	0,0579
HMF	0,1593	-0,1	16	0,5389
Acidez	0,3761	2,88	16	**0,0054**
Agua	0,2244	2,55	16	**0,0106**
Cenizas	0,3942	-0,26	16	0,6019
Sodio	0,0659	-0,94	16	0,8185
Potasio	0,5417	-0,52	16	0,6956

CONCLUSIONES

Caracterizar regionalmente la miel que se produce en el Valle Central de Catamarca, es un factor importante para aumentar el valor de comercialización. De acuerdo a los estudios polínicos

practicados, hay un elevado porcentaje de mieles monoflorales, con una mayor representación de las familias botánicas Fabaceae, Asteraceae y Anacardiaceae. Sin embargo, de acuerdo a los parámetros físico-químicos evaluados, se observa un mejor comportamiento de los mismos en las mieles de origen multifloral, con relación a las de origen monofloral; detectándose diferencias estadísticamente significativas en las variables acidez y contenido de agua.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por las Secretarías de Ciencia y Tecnología de las Universidades Nacionales de Catamarca y Córdoba y por aportes del COFECYT a través del Proyecto Federal de Innovación Productiva-2007 "Desarrollo y fortalecimiento de laboratorio para la determinación del origen botánico, caracterización física, química y microbiológica de miel producida en Catamarca"

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, E.& L. HUBRITCH.1940. A method for describing and comparing blooming season. Bull. Torrey Club 67: 639-649.

ANDRADA, A. C. & M. C. TELLERÍA. 2002. Botanical origin of honey from south of Caldén district (Argentina). Grana 41: 58-62.

ANDRADA, A. C. & M. C. TELLERÍA. 2005. Pollen collected by honey bees (*Apis mellifera L.*) from south of Caldén district (Argentina): botanical origin and protein content. Grana 44: 115-122.

ANDRADA, A. C. 2003. Flora utilizada por Apis mellifera L. en el sur del Caldenal (Provincia Fitogeográfica del Espinal), Argentina. Revista Museo Argent. Cs. Nat., n.s. 5: 329-336.

BASILIO, A. & E. ROMERO. 1996. Contenido polínico en las mieles de la región del Delta de Paraná (Argentina). Darwiniana 34: 113-120.

BIANCHI, M. 1997. Determinación del contenido de sustancias minerales en la miel por conductimetría. CEDIA- FAyA-UNSE.

CABRERA, A. L. y WILLINK, A. 1980. Biogeografía de América Latina 2° Ed. Monografía N°13. Serie Biología. Secret. Gral. de la O.E.A.

CABRERA, A. L. y A.WILLINK, 1980. Biogeografía de América Latina 2° Ed. Monografía N°13. Serie Biología. Secret. Gral. de la O.E.A.

COSTA, M. C. & E. PISTONE. 2007 b. Vinculación entre el contenido polínico de mieles y la flora de la provincia fitogeográfica chaqueña. Terceras Jornadas de la Asociación Argentino Uruguaya de Economía Ecológica. Nº 28, 8 pág. cuadros y fig. en DVD. De ISEE, ASAUEE.

COSTA, M. C. et al. 2007 a. Mapa Apibotánico para los departamentos del oeste de la provincia de Córdoba. Espacio Apícola 80:22-40.

COSTA, M. C. et al. 1995. Análisis polínico de las mieles del norte de la provincia de San Luis, Argentina. Kurtziana 24: 133-144.

COSTA, M. C. et al. 2003. Determinación de origen botánico de las mieles de la región oeste de la provincia de Córdoba: II – Dpto. Cruz del Eje, Espacio Apícola 59:4 - 15.

COSTA, M.C. 1982. Contribución al conocimiento de la flora melífera de la provincia de Córdoba. I Dpto. Río Segundo. Bol. Soc. Argent. Bot. 21 (1-4): 247 – 258.

COSTA, M.C. et al. 1995. Análisis polínico de las mieles del norte de la provincia de San Luis, Argentina. Kurtziana 24: 133-144.

CHATAWAY–WEDMORE, 1932-1955. Relación del índice de refracción con el contenido de humedad. 1968. Códex FAO/WHO,

FAGUNDEZ, G. y M. CACCAVARI. 2002. Mieles entrerrianas de Isla: tipificación del origen botánico. Rev. Argent. Prod. Animal 22:436.

FAGUNDEZ, G. y M. CACCAVARI. 2006. Pollen analysis of honeys from the central zone of the Argentine province of Entre Rios. Grana 45: 305-320.

FORCONE, A. & TELLERIA, M. C. 1998. Caracterización palinológica de las mieles del Valle Inferior del Río Chubut (Argentina). Darwiniana 36: 81-86.

FORCONE, A. 2002. Bee-collected pollen in the lower Valley of the Chubut River (Argentina). Bol. Soc. Argent. Bot. 37: 251-259.

FORCONE, A. 2008. Pollen analysis of honey from Chubut (Argentinean Patagonia). Grana 47: 147-158.
http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/02_estadis/d_graficos/evo_prod_miel_arg_tn.htm

LIEUX, M. A. 1972. Mesissopalynological study of 54 Louisiana (U.S.A.) honeys. Rev. Paleobot. Palynol. 13: 95-124.

LIEUX, M. 1975. Dominant pollen types recovered from commercial Louisiana honeys. J. Econ. Bot. 29: 87-96.

LIEUX, M. 1975. Dominant pollen types recoveret from commercial Louisiana honeys. *J. Econ. Bot.* 29: 87-96.

LOUVEAUX, J. 1968. L'analyse pollinique des miels. en Traité de Biologie de l'abeille. MASSON et CIE, Paris. Tomo 3. Cap. 3. L'abeille et la fleur, Le Miel, pag 326-362.

LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A & G.VORWOHL. 1978. Methods of melissopalynology by International Commission for bee botany of IUBS. Bee World 59:139-157.

LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A & G.VORWOHL. 1978. Methods of melissopalynology by International Comisión for bee botany of IUBS. Bee World 59:139-157.

MAIDANA, J. F. 2004. La miel, características y composición. Análisis y adulteración. CEDIA-FAyA-UNSE.

MAIDANA, J.F. 2004. La miel, características y composición. Análisis y adulteración. CEDIA-FAyA-UNSE.

MORLANS, M.C. 1995. Regiones Naturales de Catamarca: provincias geológicas y provincias fitogeográficas. Rev. C y T UNCa Nº 2.

NAAB, O. & TAMAME, M.A. 2007. Flora apícola en la Región del Monte de la Provincia de La Pampa (Argentina). Bol. Soc. Argent. Bot. 42 (3-4): 251 -259.

NAAB, O. A. 1993. Análisis polínico de mieles de la Provincia de La Pampa, Argentina. V Jornadas Pampeanas de Ciencias Naturales, Actas-Tomo I: 106-112. Consejo Profesional de Ciencias Naturales de La Pampa. Santa Rosa.

NAAB, O. A., CACCAVARI, M.A., TROIANI, H. & PONCE, A. 2001. Melisopalinología y su relación con la vegetación en el Departamento de Utracán, La Pampa, Argentina. Polen 11: 99-113.

SALGADO, C. R. & PIRE, S. M. 1998. Análisis Polínico de mieles del Noroeste de la Provincia de Corrientes. (Argentina). Darviniana, 36, 87-93.

SALGADO, C. R. & PIRE, S. M. 1999. Contribución al conocimiento del contenido polínico de mieles de Corrientes, Argentina. Asoc. Paleontol. Argent., Publi. Esp., 6, 95-99.

SCHEPARTZ, A.I. & M.H. SUBERS. Observations on honey diastase. J. Apic. Res. 5(1): 45-48. 1966.

TELLERIA, M. C. 1988. Analyse pollinique des miels du Nordouest de la Province de Buenos Aires (République Argentine). Apidologie, 19, 275-290.

TELLERIA, M. C. 1992. Caracterización botánica y geográfica de las mieles de la Provincia Fitogeográfica Pampeana (República Argentina) I: Distrito Oriental. Darviniana, 3, 345-350.

TELLERIA, M. C. 1995. El polen de las mieles del noroeste de la Provincia de Buenos Aires. Darviniana, 33, 347-364.

TELLERIA, M. C. 2000. Contribución a la identificación del polen de mieles pampeanas (República Argentina). Bol. Soc. Argent. Bot., 35, 125-136.

WHITE, J. 1979. Spectrophotometric Method for Hydroxymethylfurfural in Honey. J. AOAC, 509.

ZANDER, E. 1935. Beitrage zur Herkunftsbestimmung bei ONG. Pollengestaltung u. Herkunftsbestimmung bei Blutenhonig. Reichsfachgruppe Imker, Berlin.343pp. Obra no vista, datos tomados de M. H. LIEUX, 1972.

ZANDER, E. 1935. Beitrage zur Herkunftsbestimmung bei ONG. Pollengestaltung u. Herkunftsbestimmung bei Blutenhonig. Reichsfachgruppe Imker, Berlin.343pp. Obra no vista, datos tomados de M. H. LIEUX, 1972.

Comportamiento físico y térmico de harinas y almidones de amaranto (*Amaranthus cruentus)*

Physical and thermal behavior of amaranth (*Amaranthus cruentus)* flours and starches

Villarreal ME (1, 2), Lescano NE (1,2), Iturriaga LB (1, 2)

(1) Instituto de Ciencias Químicas – Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina
(2) Instituto de Cs. y Tgía. de Alimentos - Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina
mevilla@unse.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar propiedades fisicoquímicas de harinas de grano entero (GE) y de una fracción rica en carbohidratos (RCH) de *Amaranthus cruentus* y de almidones extraídos de ellas. La forma y tamaño de las semillas y gránulos de almidón fue observada por microscopía electrónica de barrido. El diámetro del grano estuvo en el rango de 1 a 2mm, mientras que el de los gránulos de almidón fue de 0,5 a 1,5µm. Las semillas mostraron forma esférica y los almidones forma poligonal. Se observó una matriz estrechamente empacada de gránulos de almidón sin presencia de cuerpos proteicos o espacios vacíos que sugieran su extracción. El contenido de amilosa total en almidón desgrasado con hexano y de amilosa aparente en almidón sin desgrasar, determinados por el método colorimétrico de Juliano, fue de 3,66 y 3,33g/100g de almidón respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ellos (P≤0,05), esto podría atribuirse al bajo contenido de lípidos presentes en los almidones, del orden del 0,6%, o al bajo contenido de amilosa. Estos resultados ubican a los almidones de amaranto de esta especie como de bajo contenido de amilosa. Para evaluar la cristalinidad de las muestras se realizó difracción de rayos X. Los difractogramas de las harinas exhibieron un pico definido a 3,8 Å, mientras que los almidones mostraron un patrón tipo A propio de los almidones de cereales con tres picos a 3,8; 5,2 y 5,8Å. El grado de cristalinidad observado en las harinas de GE y fracción RCH fue de 14,3% y 26,1%, respectivamente, mientras que para los almidones extraídos de las mismas fue de 26,8% y 44,4%, respectivamente. Las diferencias significativas (P≤0,05) entre las harinas podrían atribuirse a la posible interferencia de las proteínas y fibras que se encuentran en mayor cantidad en el GE comparativamente con la fracción RCH. En idéntico sentido podría explicarse la mayor cristalinidad de los almidones. El análisis térmico de las muestras se efectúo por calorimetría diferencial de barrido (DSC) a distintos contenido de agua, 70-30 y 50-50 (agua:harina/almidón). Las entalpías de gelatinización de los almidones, del orden de 14J/g, fueron significativamente mayores (P≤0,05) que la de las harinas, del orden de 2,5J/g, debido al alto contenido de proteínas y de otros componentes en las harinas. Las temperaturas de gelatinización mostraron un incremento con la disminución del contenido de agua y diferencias entre los almidones y las harinas en el rango de 73 a 75ºC para 70-30 y de 75 a 78ºC para 50-50, lo cual se explica por la competitividad por el agua que ejercen la fibra y las proteínas presentes en las harinas. Comportamiento similar se observó en el almidón de la fracción RCH comparativamente con el almidón de GE.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the physical-chemical properties of whole grain flours (WG) and of a carbohydrate-rich fraction (RCH) of *Amaranthus cruentus* as well as of starches extracted from them. Seed and granule shapes and sizes were observed through scanning electron microscopy. The grain diameter ranged between 1 and 2 mm, while that of the granules did between 0.5 and 1.5 µm. The seeds appeared spherical and the starches polygonal. It was observed a tightly packed matrix of starch granules with no protein body present or empty spaces that suggest extraction. The amylose total content in starch degreased with hexane and the apparent amylose in starch non-degreased determined by the Juliano colorimetric method was 3.66 and 3.33 g/100g of starch respectively, being not observed significant differences between them (P≤0.05). This might be attributed to whether the

low content of lipids present in the starches, of about 0.6% or the low amylose content. These results place the amaranth starches as being of low amylose content. To evaluate the crystalline quality of the sample was used X-ray diffraction. The flours difractographs exhibited a clear peak at 3.6Å while the starches showed a type A pattern that is characteristic of cereal starches with peaks at 3.8; 5.8; and an overlapped double peak at 4.9 and 5.2 Å. The crystalline degree observed for WG flours and for the RCH fraction was namely 23.40% and 32.10% while for their respective starches extracted were 38.55 and 59.01% respectively. The significant differences between the flours ($P \leq 0.05$) might be due to the potential interference of proteins and fibers that are in higher amount in GE flours if compared with the RCH fraction. It might identically be explained the higher crystalline quality of starches. The thermal analysis of the samples was made by scanning differential calorimetry (SDC) on different water content: 70-30 and 50-50 (water:flour/starch). The enthalpies of gellification for the starches, in the order of 14 W/g, were considerably higher ($P \leq 0.05$) than that of the flours, in the order of 2,5 W/g, due to the high content of proteins and other flour components. Gellification temperatures increased as water content diminution and differences between the starches and flours in the interval 74-75ºC for 70-30 and between 75-80º for 50-50 which is explained by the competitiveness for water exerted by the fibers and proteins present in the flours. Similar behavior was observed for the starch in the RCH fraction when compared to the GE starch.

PALABRAS CLAVE: *almidón, amaranto, amilosa, cristalinidad, propiedades térmicas.*

KEYWORDS: *starch, amaranth, amylose, cristalinity, thermal properties.*

INTRODUCCIÓN

El amaranto es una especie vegetal dicotiledónea, anual, herbácea o arbustiva de la familia de las Amarantaceae. Es de rápido crecimiento, requiere muy pocos cuidados durante su cultivo, es resistente al stress hídrico y produce buenos rindes de granos. Es una fuente potencial de nutrientes alimenticios básicos y muy versátil para la transformación e industrialización (Breene 1991, Lehmann 1996, Hozova *et al.* 1997).

El almidón es el principal constituyente de la semilla de amaranto. Su contenido varía entre el 48 al 69% del peso total del grano según la especie. Se encuentra localizado en el perispermo como una matriz estrechamente empacada (Irving *et al.* 1981, Becker *et al.* 1981, Bestchart *et al.* 1981, Willett 2001). El endospermo; rico en proteínas, lípidos y fibras; rodea completamente al perispermo y dada la estructura y morfología particular del grano ha sido posible aplicar métodos de molienda y separación de sus componentes estructurales y obtener fracciones de diferente composición, ricas en carbohidratos o en proteínas, minerales y fibras (Bestchart *et al.* 1981, Tosi *et al.* 2001).

El almidón de este vegetal presenta una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas lo cual lo hace susceptible de utilizarlo en una gran cantidad de productos, tales como espesantes para sopas, sustitutos de grasas, aderezos, cereales para desayuno, galletas, snacks, pastas, películas biodegradables, papeles de recubrimiento y en almidones de lavandería (Choi *et al.* 2004, Kong *et al.* 2009).

El tamaño extremadamente reducido del gránulo de almidón (1 a 2 μm) y los contenidos variables de amilosa (3 al 11%) según las especies (Radosavljevic *et al.* 1998, Marcone 2001, Kong *et al.* 2009) afectan de manera importante sus propiedades funcionales (Baker y Rayas Duarte 1998) y le confieren características diferentes a la de los almidones de trigo y maíz y similares a las de algunos arroces céreos (Iturriaga *et al.* 2001). A pesar de los avances realizados poco se conoce aún acerca de la estructura del almidón del amaranto y de su incidencia sobre el comportamiento físico y químico en los sistemas a los cuales se los incorpora. El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar las propiedades fisicoquímicas de harinas de grano entero y de una fracción rica en carbohidratos de *Amaranthus cruentus* y de almidones extraídos de ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se trabajó con el grano completo (GE) de semillas de *Amaranthus cruentus*, con una fracción rica en carbohidratos (RCH) de la misma partida obtenida por molienda diferencial según el procedimiento

descrito por Tosi *et al.* (2001) y con el almidón extraídos de aquellas por el método de álcali diluido reportado por Yánez y Walker (1986) modificado por Villarreal *et al*. (2008). El GE y la RCH fueron provistos por el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de Alimentos (CIDTA) de la Facultad Regional de Rosario de la Universidad Tecnológica Nacional, Argentina.

Microestructura

La microestructura del GE, de la RCH, de las harinas y de los almidones obtenidos de ellas se estudió en un microscopio electrónico de barrido Philips SEM 505. El material se preparó colocando una pequeña cantidad de muestra seca en un portaobjeto a la cual se le agregó una gota de acetona que se dejó secar al aire, luego se procedió a recubrirlas con una capa de oro de aproximadamente 150 Å y se tomaron micrografías a 21x y 71x de los GE y de la RCH, a 3100x y 5100x de las harinas y a 10000x de los almidones.

Amilosa Total (AMT) y Amilosa Aparente (AMAp)

La determinación del contenido de AMT y de AMAp se realizó por el método colorimétrico propuesto por Juliano *et al.* (1981), para lo cual se prepararon muestras de almidón desgrasado y sin desgrasar respectivamente. Se emplearon amilosa y amilopectina de papa (SIGMA) como estándares de medida. La absorbancia fue medida a 620nm en un espectrofotómetro Hitachi UV/Vis. El desgrasado de los almidones se efectuó con hexano siguiendo el método 32.1.14 de la Association of Oficial Analytical Chemists (1995).

Difracción de rayos X

La cristalinidad de las harinas de GE y de la RCH y de los almidones desgrasados y sin desgrasar obtenidos de las mismas fue determinada en un difractómetro de polvo Philips PW 1710 equipado con un monocromador de grafito cristalino. Las condiciones operativas fueron las siguientes: radiación Kα de Cu, voltaje 40kV, velocidad de corrida 2θ/min desde 5° hasta 40°. Las muestras se prepararon, conforme a la técnica propuesta por Priestley (1975), mezclando las harinas y los almidones con $CaCO_3$ al 5% p/p, y homogeneizándolas en mortero durante 30 minutos, luego cada muestra se colocó en el portamuestra del equipo tratando de obtener una superficie lisa y sin vacíos, paralela a la cara del portamuestra. El grado de cristalinidad fue calculado como el porcentaje obtenido entre la altura del pico correspondiente al $CaCO_3$ (3,04Å) y la altura del pico de las harinas (3,6Å) y de los almidones (3,8Å) más claramente definido en el espectro de rayos X correspondiente.

Propiedades Térmicas

Las propiedades térmicas fueron analizadas usando un Calorímetro Diferencial de Barrido TA Instruments, Universal, modelo V4 2E Q100 V9.9. Las harinas y almidones con diferentes contenidos de agua 70-30 y 50-50 (agua-harina/almidón) fueron preparados en cápsulas, en las cuales se pesó la muestra con precisión de 0,01mg y se agregó agua destilada con microjeringas, homogeneizándolas adecuadamente. Las cápsulas fueron selladas herméticamente y equilibradas sus temperaturas a la del ambiente por un lapso de aproximadamente 2hs. Luego se sometieron a barrido de temperatura desde 20 a 140°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Las curvas térmicas generadas se caracterizaron por los siguientes parámetros: temperatura de inicio (T_o), temperatura de gelatinización (T_G), entalpía total de gelatinización (ΔH_G), temperaturas (Tp_1 y Tp_2) y entalpía (ΔH_f) de fusión del complejo amilosa-lípidos para cada endoterma obtenida.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó usando el paquete de programas estadísticos STATISTICA 2.0. Los datos fueron evaluados usando el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) para un nivel de significancia $P \leq 0,05$. Se empleó el test de comparaciones múltiples de Tukey para establecer las diferencias significativas entre muestras. En todos los casos se realizaron las determinaciones por duplicado y se informan los resultados como el valor promedio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Microestructura

El diámetro estimado de la semilla de *Amaranthus cruentus* determinado por microscopía electrónica de barrido estuvo en el rango de 1 a 2mm, mientras que el de los gránulos de almidón fue de 0,5 a 1,5µm. Las semillas mostraron forma esférica y los almidones forma poligonal (**Figura 1**). Se observó una matriz estrechamente empacada de gránulos de almidón sin presencia de cuerpos proteicos o espacios vacíos que sugieran su extracción. El tamaño, forma y distribución de los gránulos de

almidón fueron acordes a los reportados en trabajos previos (Kong *et al.* 2009, Marcone 2001, Willett 2001, Radosavljevic *et al.* 1998, Irving *et al*. 1981). La presencia de aglomerados multigranulares podría deberse a las condiciones alcalinas empleadas durante la extracción. La RCH (**Figura 1b**) muestra la casi completa eliminación del endospermo durante el proceso de molienda diferencial, lo cual deja el perispermo, principalmente constituido por almidón de bajo contenido de amilosa (Irving *et al*. 1981, Betschart *et al.* 1981), en óptimas condiciones para su extracción.

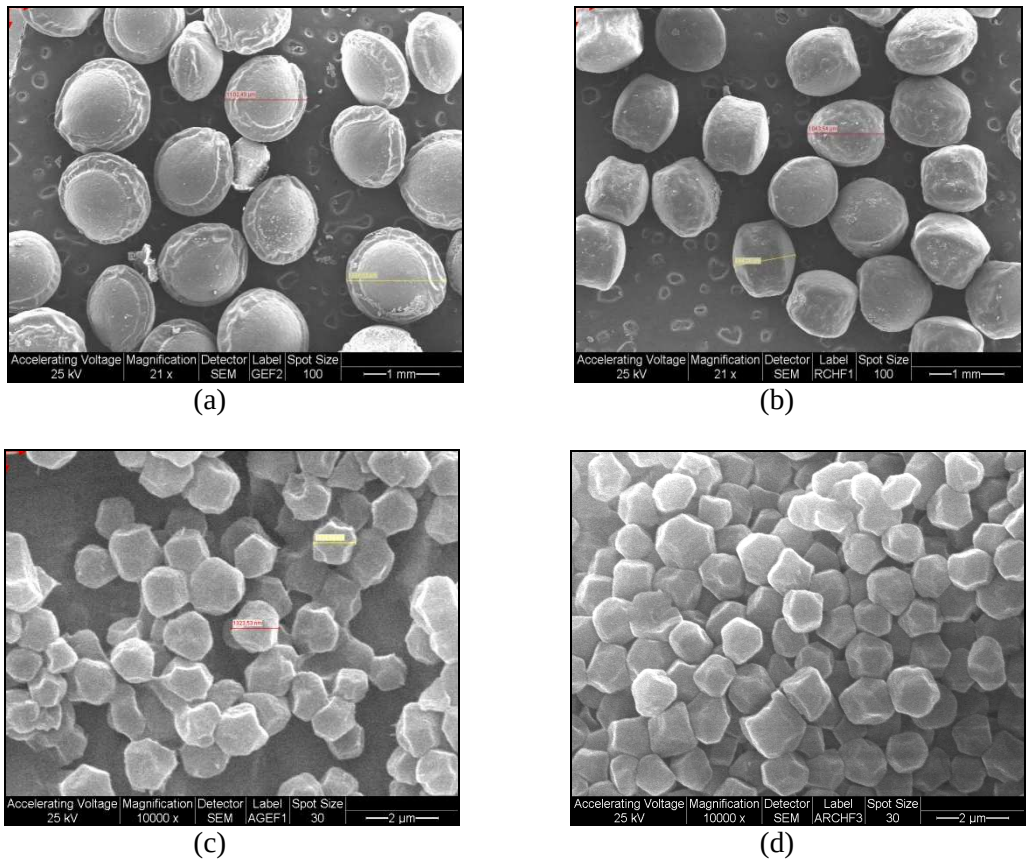


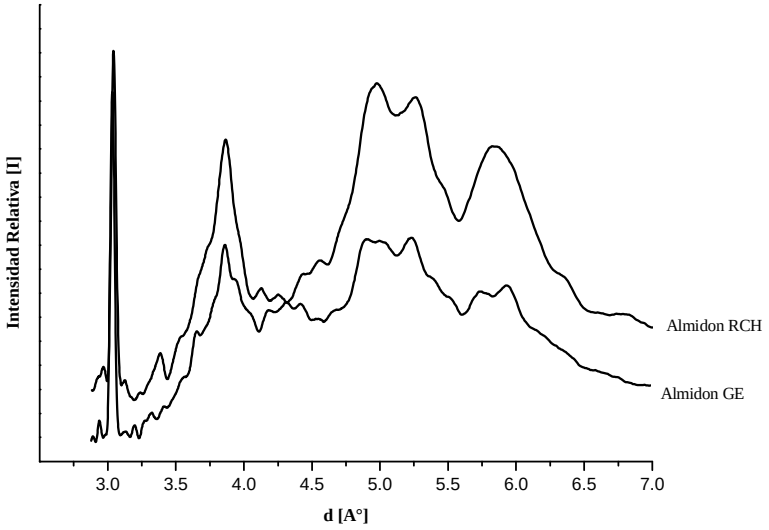
Figura 1. Micrografías electrónicas de barrido de GE (a) RCH (b) y almidones (c, d) de *Amaranthus cruentus*.

Amilosa Total y Amilosa Aparente

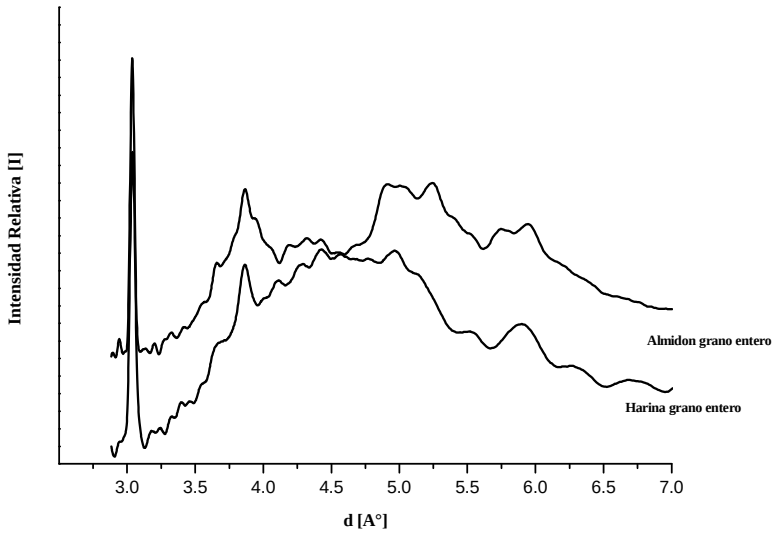
El contenido de amilosa total en almidón desgrasado con hexano y de amilosa aparente en almidón sin desgrasar fue de 3,66 y 3,33g/100g de almidón respectivamente, no observándose diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0,05$), esto podría atribuirse al bajo contenido de lípidos presentes en los almidones, del orden del 0,6%, o al bajo contenido de amilosa. Estos resultados ubican a los almidones de amaranto de esta especie como del tipo céreo en coincidencia con lo informado por Irving *et al*. (1981) y Betschart *et al.* (1981).

Cristalinidad Relativa

Los espectros de las harinas exhibieron un pico definido a 3,6 Å, mientras que los almidones mostraron un patrón tipo A propio de los almidones de cereales con picos a 3,8; 5,8 y un doble pico solapado a 4,9 y 5,2Å (**Figura 2**), estos resultados aportarían a la clasificación comúnmente realizada del amaranto en cuanto a considerarlo como un pseudocereal. El grado de cristalinidad observado en las harinas de GE y de RCH fue de 23,4% y 32,1%, mientras que para los almidones extraídos de las mismas fue de 38,55% y 59,01%, respectivamente. Las diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre las harinas podrían atribuirse a la posible interferencia de las proteínas y fibras que se encuentran en mayor cantidad en el GE comparativamente con la RCH. En idéntico sentido podría explicarse la mayor cristalinidad de los almidones comparativamente con la de las harinas. El alto grado de cristalinidad obtenido en los almidones de amaranto es similar a los reportados por Iturriaga *et al.* (2004) para almidones céreos de arroz y estaría relacionado con una estructura granular más ordenada y con los contenidos de amilopectina presentes (Gernat *et al*. 1993).



(a)



(b)

Figura 2. Espectros de Rayos X de almidones de GE y RCH (a) y almidón y harina de GE (b) de semillas de *Amaranthus cruentus.*

Estos resultados permitirían afirmar, por un lado, que el almidón es el que determina la cristalinidad de las harinas y, por otro, que los almidones obtenidos de la fracción RCH (0,256% sbs de proteínas y 0,024% sbs de fibra) presentan una mayor pureza comparativa a la de los almidones de GE (0,722% sbs proteínas y 0,054% sbs de fibra), evidenciada por su mayor grado de cristalinidad.

Análisis Térmico

En la **Figura 3** se muestran los termogramas que corresponden a las harinas y almidones de semillas de amaranto a altos contenidos de agua (70:30). En los termogramas de las harinas (**Figuras 3a** y **3c**) se observan claramente dos picos definidos, el primero se corresponde al proceso de gelatinización (endoterma G) y un pico menor, probablemente asociado a los lípidos que pueden formar complejos con la amilosa y otros componentes. Este pico es mucho más suave en los almidones (**Figuras 3b** y **3d**), posiblemente debido a su menor contenido de lípidos (menor del 0,6%) (Biliaderis 1990), sin embargo se muestran mucho más pronunciados en el sistema con menor contenido de agua.

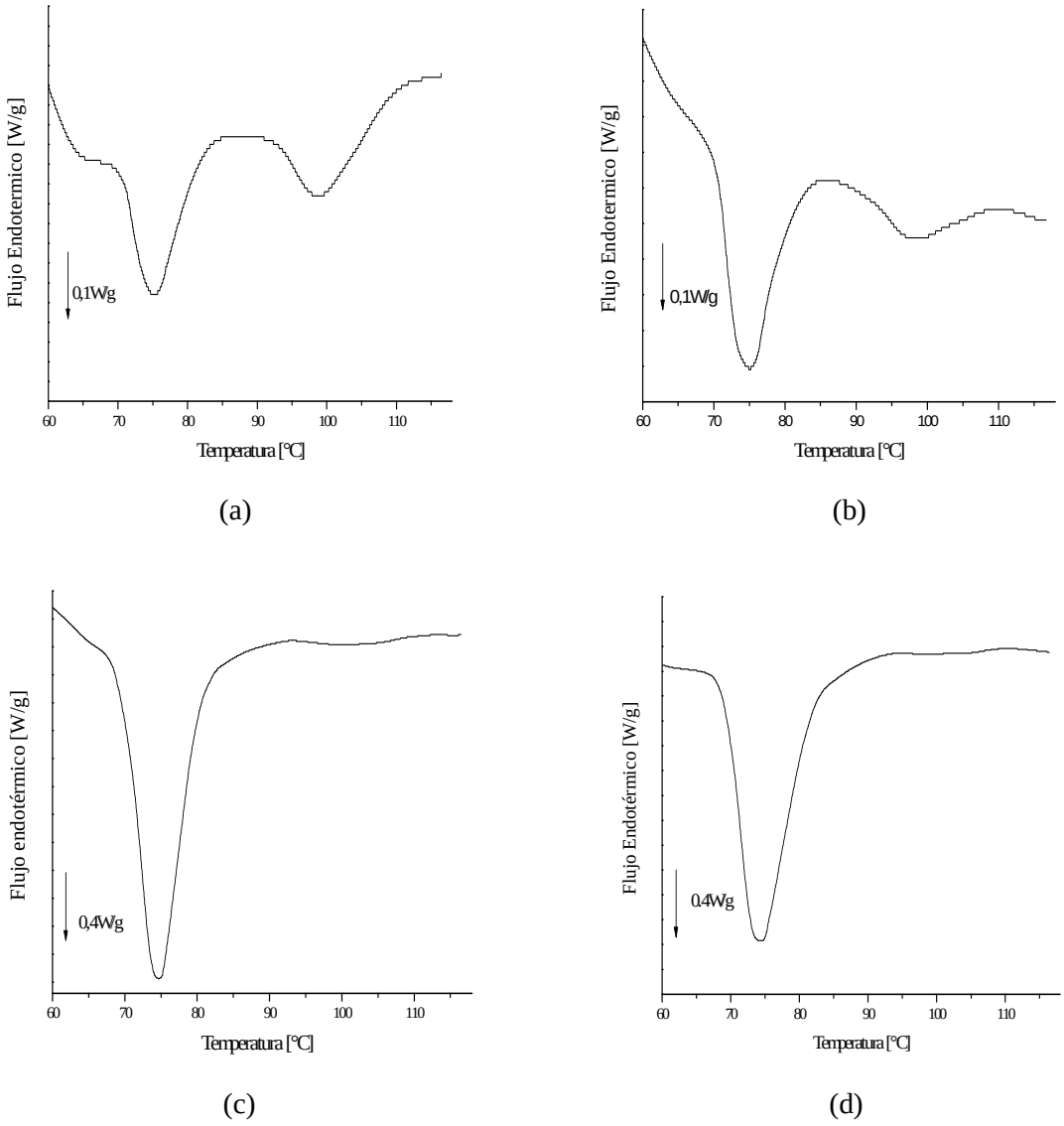


Figura 3. Termogramas obtenidos del DSC correspondientes a muestras con alto contenido de agua 70:30 (p:p) de a) harina de GE, b) harina de RCH, c) almidón de GE y d) almidón de RCH.

La **Tabla 1** muestra los valores de T_0, T_G, ΔH_G, Tp_1 y Tp_2 y ΔH_f de las harinas y almidones a diferentes contenidos de agua. Las temperaturas de inicio T_0 y de gelatinización T_G mostraron un incremento con la disminución del contenido de agua y diferencias en la T_G entre los almidones y las harinas en el rango de 74 a 75ºC para 70-30 y de 75 a 80ºC para 50-50, lo cual se explica por la competitividad por el agua que ejercen la fibra y las proteínas presentes en las harinas, ya que estos componentes absorben agua reduciendo su disponibilidad para la gelatinización del almidón y elevando la temperaturas de transición (Eliasson 1992, Baker y Rayas Duarte 1998).

Al igual que lo detallado para las temperaturas, se observó en las entalpías de gelatinización de los almidones, del orden de 14W/g, las que fueron significativamente mayores ($P \leq 0,05$) a la de las harinas, del orden de 2,5W/g, debido al alto contenido de proteínas y de otros componentes en las harinas (Radosavjjevic *et al.* 1998). Comportamiento similar, pero sin diferencias significativas, se advirtió en el almidón de la fracción RCH comparativamente con el almidón de GE, no evidenciándose en este caso la mayor pureza del almidón de la fracción RCH. Valores análogos de T_0, T_G, ΔH_G para especies de amaranto de bajo contenido de amilosa fueron informados por Kong *et al.* (2009).

Tabla 1. Temperaturas y entalpías de transición de harinas y almidones de *Amaranthus cruentus* en sistemas con distinto contenido de agua.

Contenido de Agua	Almidones		Harinas	
50:50				
	RCH	**GE**	**RCH**	**GE**
To [ºC]	69.635^{a}	70.335^{a}	72.17^{bc}	73.345^{bc}
T_G [ºC]	75.72^{a}	77.66^{bc}	77.89^{bc}	80.315^{cc}
ΔH_G [W/g]	12.85^{ab}	12.05^{ab}	3.2065^{bc}	2.0745^{cd}
Tp_1 [ºC]	94.55^{ab}	110.07^{b}	94.14^{ab}	96.24^{cd}
Tp_2 [ºC]	104.36^{ac}	113.89^{b}	100.59^{cb}	103.535^{ac}
ΔH_f [W/g]	2.273^{a}	2.926^{a}	0.6654^{ba}	1.3225^{ca}
70:30				
	RCH	**GE**	**RCH**	**GE**
To [ºC]	69.255^{a}	69.71^{a}	70.455^{ad}	70.645^{ad}
T_G [ºC]	74.435^{a}	74.655^{ac}	75.045^{ac}	75.225^{ac}
ΔH_G [W/g]	14.895^{ac}	13.825^{ac}	2.6305^{bc}	1.446^{cd}
Tp_1 [ºC]			90.97^{ac}	92.585^{ac}
Tp_2 [ºC]			97.98^{ad}	99.385^{ad}
ΔH_f [W/g]			0.7832^{ba}	1.1111^{ca}

Los valores corresponden a las medias de dos réplicas. Superíndices diferentes en la misma fila y en las columnas a parámetros idénticos indican diferencias significativas para un nivel de significancia $P \leq 0,05$ por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

CONCLUSIONES

El diámetro estimado de la semilla de *Amaranthus cruentus* estuvo en el rango de 1 a 2mm, mientras que el de los gránulos de almidón fue de 0,5 a 1,5µm. Las semillas mostraron forma esférica y los almidones forma poligonal, distribuidos en una estructura estrechamente empacada sin cuerpos proteicos.

El contenido de amilosa total y de amilosa aparente en el almidón fue de 3,66 y 3,33g/100g de almidón, respectivamente, estos resultados ubican a los almidones de amaranto de esta especie como del tipo céreo.

Los densitogramas de las harinas exhibieron un pico definido a 3,6 Å, mientras que los almidones mostraron un patrón tipo A propio de los almidones de cereales con picos a 3,8; 5,8 y un doble pico solapado a 4,9 y 5,2Å, estos resultados aportarían a la clasificación del amaranto como un pseudocereal. El grado de cristalinidad observado en las harinas de GE y RCH fue de 23,40% y 32,10%, mientras que para los almidones extraídos de las mismas fue de 38,55% y 59,01%, respectivamente. Las diferencias significativas entre las harinas podrían atribuirse a la posible interferencia de las proteínas y fibras que se encuentran en mayor cantidad en el GE comparativamente con la RCH. En idéntico sentido podría explicarse la mayor cristalinidad de los almidones comparativamente con la de las harinas. Estos resultados permitirían afirmar, por un lado, que el almidón es el que determina la cristalinidad de las harinas y, por otro, que los almidones obtenidos de la fracción RCH (0,256% sbs de proteínas y 0,024% sbs de fibra) presentan una mayor pureza comparativa a la de los almidones de GE (0,722% sbs proteínas y 0,054% sbs de fibra), evidenciada por su mayor grado de cristalinidad.

En los termogramas de las harinas para sistemas con distintos contenidos de agua (70:30 y 50:50) se observan claramente dos picos definidos, uno en correspondencia con el proceso de gelatinización y el otro probablemente asociado a los lípidos que forman complejos con la amilosa y otros componentes. En los almidones se observa el pico asociado a los lípidos mucho menos pronunciado, posiblemente debido a su bajo contenido de lípidos. Las entalpías de gelatinización de los almidones, del orden de 14W/g, fueron significativamente mayores que la de las harinas, del orden de 2,5W/g, debido al alto contenido de proteínas y de otros componentes en las harinas. Las temperaturas de gelatinización mostraron un incremento con la disminución del contenido de agua y diferencias entre los almidones y las harinas en el rango de 74 a 75ºC para 70-30 y de 75 a 80ºC para 50-50, lo cual se explica por la

competitividad por el agua que ejercen la fibra y las proteínas presentes en las harinas. Comportamiento similar se observó en el almidón de la fracción RCH comparativamente con el almidón de GE.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la excelente disposición de los profesionales y técnicos del CINDECA y del CIDCA, centros en los que se llevaron adelante los ensayos de Rayos X, Microscopía Electrónica y Calorimetría Diferencial de Barrido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of analysis of the AOAC, 16th Edition. Arlintong USA, 1995.

Baker LA, Rayas Duarte P. 1998. Retrogradation of amaranth starch at different storage temperatures and the effects of salt and sugars. Cereal Chemistry, 75 (3): 308-314.

Becker R, Wheeler EL, Lorenz K, Stafford AE, Grosjean OK, Bestchart AA, Saunders RM. 1981. A compositional study of amaranth grain. Journal of Food Science, 46: 1175-1180.

Betschart AA, Irving DW, Shepherd AD, Saunders RM. 1981. *Amaranthus Cruentus*: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components, and the effects of temperature on nutritional quality. Journal of Food Science, 46: 1181-1187.

Biliaderis CG. 1990. Thermal analysis of food carbohydrates. En Harwalkar VR, Ma CY. Thermal Analysis of Food. Ed. Elsevier Applied Science. Pag. 168-220.

Breene WM. 1991. Food uses of grain amaranth. Cereal Food World, 36: 426-429.

Choi H, Kim W, Shin M. 2004. Properties of Korean amaranth starch compared to waxy miller and waxy sorghum starches. Starch, 56:460-477.

Eliasson AC. 1992. A calorimetric investigation of the influence of sucrose on the gelatinization of starch. Carbohydrate Polymers 18: 131.

Gernat C, Radosta S, Anger Y, Damaschun G. 1993. Crystalline parts of three different conformation detected in native and enzimatically degraded starches. Starch 45: 309.

Kong X, Bao X, Corke H. 2009. Physical properties of Amaranthus starch. Food Chemistry, 113: 371-376.

Hozova B, Buchtova B, Dodok L, Semanovic J. 1997. Microbiological, nutritional and sensory aspecto of stored amaranth biscuits and amaranth crackers. Nahrung Food, 41 (3): 155-158.

Irving DW, Betschart AA, Saunders RM. 1981. Morphological studies on Amaranthus cruentus. Journal of Food Science, 46: 1170-1174.

Iturriaga LB, López B, Añon MC. 2004. Thermal and physicochemical characterization of seven argentine rice flours and starches. Food Research International, 37: 439-447.

Juliano BO, Perez CM, Blakeney AB, Castillo T, Kogeree N, Laignelet B, Lapis ET, Murty VVS, Paule CM, Webb BD. 1981.International cooperative testing on the amylose content of milled rice. Starch, 33(5), 157-162-

Lehmann JW. 1996. Case history of grain amaranth as an alternative crop. Cereal Food Worlds, 41: 399-404.

Marcone MF. 2001. Starch properties of *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth): a threatened plant species with potential benefits for the breeding/amelioration of present *Amaranthus* cultivars. Food Chemistry, 73: 61-66.

Priestley RJ. 1975. Moisture requirements for gelatinization of rice. Starch, 12: 416.

Radosavljevic M, Jane J, Johnson LA. 1998. Isolation of amaranth starch by diluted alkaline-protease treatment. Cereal Chemistry, 75 (2): 212-216.

Tosi EA, Ré E, Lucero H, Masciarelli R. 2001. Dietary fiber obtained from amaranth (*Amaranth cruentus)* grain by differential milling. Food Chemistry, 73: 441-443.

Villarreal ME, Lescano NE, Iturriaga LB. 2008. Optimización de un método de extracción de almidón a partir de semillas de *Amaranthus cruentus.* Investigaciones en Facultades de Ingeniería del NOA. Tomo II, Cap VII: 6-10.

Willett JL. 2001. Packing characteristics of starch granules. Cereal Chemistry, 78 (1): 64-68.

Yañez GA, Walker CE. 1986. Effect of tempering parameters on extract and ash of prosomillet flours and partial characterization. Cereal Chemistry, 63: 164-167.

Aplicación de la Microextracción en Fase Sólida al Estudio de la Fracción Volátil de Quesos de Origen Italiano

Study of volatile organic compounds (VOCs) of italian cheeses by solid phase microextraction (SPME)

Wolf I, Addis M, Bergamini C, Zalazar C, y Piredda, G

Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET), (AOM3000) Santa Fe, Argentina
cvberg@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

La utilización de la microextracción en fase sólida (SPME) como herramienta de aislamiento de compuestos, ha permitido la caracterización de la fracción volátil de quesos de origen italiano (Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Gorgonzola, Pecorino Romano y Fiore Sardo). Se expuso una fibra DVB/Carboxen/PDMS 50/30µm en el headspace de las muestras y la desorción de los compuestos retenidos se realizó en el puerto de inyección de un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Los espectros de masas de los compuestos se obtuvieron por ionización por impacto electrónico (EI) a 70eV y la identificación se realizó por búsqueda bibliográfica en librería de espectros, empleo de ionización química con acetonitrilo (CI) y comparación con los tiempos de retención de estándares de referencia. El perfil de compuestos presentes y las proporciones relativas de los mismos, fueron comparados con lo informado por distintos autores en estas variedades de quesos, empleando distintas metodologías de aislamiento, habiéndose comprobado la capacidad de la fibra para extraer compuestos de las distintas clases químicas y particularmente, aquéllos que inciden en el flavour. En los quesos analizados se destacó la incidencia de la lipólisis en el perfil de compuestos volátiles, a través de la presencia mayoritaria de ácidos grasos libres y compuestos generados a partir de la degradación de los mismos (metilcetonas, alcoholes, ésteres, etc.). Los quesos Gorgonzola se caracterizaron por la presencia de cetonas, alcoholes e hidrocarburos como grupos de compuestos mayoritarios, destacándose las metilcetonas y los alcoholes secundarios y ramificados como los más abundantes. En los quesos grana y de oveja, los ácidos representaron el grupo de compuestos mayoritarios, encontrándose los ácidos butírico y caproico en mayor proporción. En Parmigiano Reggiano, Grana Padano y Fiore Sardo las cetonas fueron segundas en abundancia, destacándose desde un punto de vista cuantitativo la 2-pentanona y 2-heptanona, mientras en Pecorino Romano, los hidrocarburos constituyeron el segundo grupo en importancia, destacándose el etilbenceno y los xilenos. Se han observado importantes diferencias de tipo cualitativo y cuantitativo en los perfiles de compuestos volátiles en una misma variedad de queso y entre distintas variedades, que en un trabajo posterior se espera correlacionar con la composición físicoquímica, niveles de proteólisis y lipólisis y de las características de la metodología empleada para el aislamiento de los compuestos.

ABSTRACT

In the present work, solid-phase microextraction (SPME) was used to characterise the volatile fraction of Italian cheeses (Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Gorgonzola, Pecorino Romano and Fiore Sardo). This method is very employed to isolate and concentrate compounds from different food matrices. A fibre DVB/Carboxen/PDMS 50/30µm was exposed to the cheese headspace. Volatile compounds adsorbed on this fibre were immediately thermally-desorbed in the injection port of a gas chromatograph coupled with mass spectrometer (GC-MS). Mass spectrometry analysis was carried out using electron impact ionisation (EI) at 70eV. Peak identification was performed by comparison with mass spectra from both the library, chemical ionisation (CI) with acetonitrile and authentic standards analysed under the same conditions.

In all samples lipolysis makes an important contribution to the formation of cheese flavour as a consequence of free fatty acids and their degradation products such as methylketones, alcohols, esteres, etc.

The major compounds found in Gorgonzola cheeses were ketones, alcohols and hydrocarbons, especially methylketones and secondary and branched-chain alcohols. Free fatty acids (FFA) were the main representative compounds in Grana cheeses and ewes´milk cheeses, being butiric and hexanoic acids the most abundant. Ketones were the second group of volatile compounds, especially 2-pentanone and 2-heptanone, in Parmigiano Reggiano, Grana Padano and Fiore Sardo. In Pecorino Romano however, the second group were hydrocarbons like ethylbencene and xylenes.
In a future work, the relationship between gross composition, proteolysis, lipolysis and the specific characteristics of SPME with the volatile profiles obtained will be studied. This study will be performed as a consequence of the important differences found in the different cheeses analysed.

PALABRAS CLAVE: *quesos – microextracción en fase sólida (SPME) – flavor.*

KEYWORDS: *cheeses - solid-phase microextraction (SPME) – flavour.*

INTRODUCCIÓN

La microextracción en fase sólida (SPME) se ha convertido en los últimos años en la herramienta más novedosa para el aislamiento de compuestos de flavor en los quesos. Entre las ventajas de esta metodología, que la hace particularmente aplicable a distintas matrices alimentarias, se encuentra su simplicidad, bajo costo, sensibilidad y rapidez de ejecución (Kataoka *et al*. 2000).
La composición de la fracción volátil de distintas variedades de quesos italianos se ha estudiado desde hace muchos años empleando distintos métodos de aislamiento, que comprenden fundamentalmente a las técnicas de headspace o espacio de cabeza (Barbieri *et al*. 1994, Contarini y Toppino 1995, Larráyoz *et al*. 2001, Qian y Reineccius 2002b, 2003a, 2003b) y a diversas variantes de destilaciones y/o extracciones por solventes (Barbieri *et al*. 1994, Moio y Addeo 1998, Moio et al. 2000, Larráyoz *et al*. 2001, Qian y Reineccius 2002a, 2003b). Sin embargo, pocos trabajos han utilizado la SPME para el aislamiento de compuestos en quesos de origen italiano (Chin *et al*. 1996, Bellesia *et al*. 2003, Lee *et al*. 2003, Frank *et al*. 2004) y específicamente para el estudio comparativo de los perfiles de distintas variedades.
En virtud de esto, el objetivo del presente trabajo fue aplicar la SPME acoplada a un GC-MS para analizar, caracterizar y comparar los perfiles de compuestos volátiles de distintos quesos de origen italiano a través de la identificación de los compuestos presentes en el headspace y de la determinación de las proporciones relativas de los mismos.
Se seleccionaron para su análisis quesos representativos de distintas variedades (azules, tipo grana y de oveja), con agentes de maduración muy específicos y característicos.
El Gorgonzola, elaborado con leche entera de vaca, se caracteriza por la presencia de *Penicillium roqueforti* en toda la masa del queso. El hongo interviene activamente durante la maduración aportando potentes proteasas y lipasas que liberan aminoácidos y ácidos grasos libres (AGL), los cuales sufren posteriores degradaciones, generando compuestos característicos como metilcetonas, alcoholes, ésteres, etc. (McSweeney y Sousa 2000). Distintos tipos de Gorgonzola se encuentran en el mercado pero los más reconocidos son el natural (o tradicional) y el cremoso (o dulce) (Moio *et al*. 2000).
Los quesos Parmigiano Reggiano y Grana Padano, representantes del grupo de los grana, se elaboran con leche de vaca cruda parcialmente descremada, siguiendo estrictos procedimientos normalizados. La utilización de suero fermento natural aporta una composición microbiana compleja, fundamentalmente bacterias lácticas termófilas del género *Lactobacillus*, principales agentes proteolíticos durante la maduración junto con bacterias nativas de la leche. Tanto la proteólisis como una lipólisis acentuada (por el extenso tiempo de maduración) definen las características finales y distintivas de esta variedad de queso (Battistotti y Corradini 1993).
Los quesos Pecorino Romano y Fiore Sardo se elaboran exclusivamente con leche entera de oveja y coagulante en pasta de cordero, el cual aporta dos grupos importantes de enzimas lipolíticas: lipasa pre-gástrica (PGL) y lipasa gástrica (GL). La acción hidrolítica de estas enzimas, influencian el flavor de los quesos a través de la liberación de ácidos grasos que son directamente responsables del sabor picante (Piredda y Addis 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras analizadas se adquirieron en el mercado italiano y correspondieron a dos quesos azules Gorgonzola de distintas marcas comerciales de la variedad "*natural*", dos quesos grana (Grana Padano y Parmigiano Reggiano) y dos quesos de oveja (Pecorino Romano y Fiore Sardo).

En primer lugar se le extrajo a las muestras una delgada capa de 1cm de espesor de corteza, luego se cortaron en cubos los que fueron finamente molidos y homogeneizados usando un procesador de alimento de 600W de potencia.

En viales de vidrio de 10 mL se pesaron 3g de las muestras, los cuales se cerraron en forma hermética con un precinto de aluminio y septum de Viton® y permanecieron a 4°C durante 12 hs. Para el muestreo de los volátiles se empleó un dispositivo automuestreador (Varian 8200 CX, Walnut Creek, CA), provisto de una fibra DVB/Carboxen/ PDMS 50/30µm (Supelco, Bellefonte, PA). Los viales se colocaron en un baño de agua por 15 min a 40°C y luego se expuso la fibra en el headspace de la muestra por 15 min a la misma temperatura. Estas condiciones se seleccionaron luego de evaluarse distintos tiempos de exposición de la fibra en el headspace de los viales (5, 15 y 30 min), habiéndose observado con un tiempo de 15 min una adecuada sensibilidad en la detección de los compuestos.

La desorción de los compuestos se realizó en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (Varian 3800 CX, Walnut Creek, CA) equipado con inyector split/splitless y una columna CP-WAX 52 CB (60m x 0.32mm i.d x 0.5µm de espesor de film). Como carrier se utilizó He de alta pureza (flujo constante de 1 mL/min). El programa de temperatura de la columna fue el siguiente: 45°C (4 min) 5°C/min hasta 150°C (3 min) 10°C (min) hasta 250°C (5 min). La temperatura del inyector se mantuvo a 250°C y la desorción de los compuestos de la fibra se realizó durante 5 min en modo splitless.

Como detector se empleó un espectrómetro de masas con trampa iónica (Varian Saturn 2000, Walnut Creek, CA). Los análisis se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: voltaje de ionización, 70eV; temperatura de la fuente, 250°C; rango scaneado 20 a 300m/z; velocidad de escaneado, 3scans/s. La identificación de los compuestos se realizó mediante búsqueda bibliográfica en librería de espectros (Wiley-6 y Nist-98), empleando para la confirmación de los compuestos tentativamente identificados la ionización química (CI) con acetonitrilo para obtener información del peso molecular y el uso de estándares de referencia para determinar tiempos de retención y confirmar la identificación. Los picos correspondientes a los compuestos identificados se integraron, expresándose las áreas como unidades arbitrarias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos aislados e identificados por SPME-GC-MS se agruparon por familia química. En la **Tabla 1** se indican los porcentajes de área para cada grupo químico calculados respecto al área total de compuestos identificados, y los porcentajes de los principales subgrupos de componentes calculados respecto al área total del grupo al cual pertenecen. Por otra parte, en la **Tabla 2** se informa la cantidad de compuestos de cada grupo químico identificados en los distintos quesos analizados y los valores de las áreas totales de compuestos.

El análisis de los perfiles de volátiles de los quesos grana y de oveja, indicó que los ácidos fueron el grupo de compuestos mayoritarios. En el caso de los quesos de oveja, la preponderancia de los ácidos se explica por la particular acción de las enzimas lipolíticas del coagulante en pasta que producen una liberación preferencial de los AGL de corta cadena (Piredda y Addis, 1998).

Pamigiano Reggiano se caracterizó además por la presencia de cetonas y ésteres mientras que Grana Padano tuvo un aporte más equilibrado de los distintos grupos químicos (**Tabla 1**). Desde un punto de vista cuantitativo se observó que el área total de los compuestos identificados fue 2,7 veces superior en el Parmigiano Reggiano respecto del Grana Padano (**Tabla 2**). Este resultado concuerda con el hecho que el Parmigiano Reggiano tiene un tiempo de maduración más prolongando lo que permite la producción de una mayor cantidad de compuestos de flavor.

En los quesos de oveja se observaron importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en los perfiles, siendo el área total de compuestos identificados en el Fiore Sardo 3 veces superior al del Pecorino Romano (**Tabla 2**). Fiore Sardo se caracterizó por la incidencia de las cetonas y ésteres, mientras que en el Pecorino Romano otro grupo de compuestos de importancia fueron los hidrocarburos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Porcentajes de áreas para cada grupo químico calculados respecto al área total de compuestos identificados por SPME-GC-MS y porcentajes de los principales subgrupos de compuestos calculados respecto al área total del grupo al cual pertenecen.

	Pamigiano Reggiano	Grana Padano	Gorgonzola A	Gorgonzola M	Pecorino Romano	Fiore Sardo
Alcoholes	**2,71**	**11,71**	**20,90**	**33,02**	**0,80**	**1,52**
Primarios de cadena lineal	35,72	22,96	6,59	4,18	63,08	17,49
Secundarios de cadena lineal	54,95	61,95	76,19	15,81	5,14	61,26
Primarios de cadena ramificada	1,92	11,66	15,01	74,85	11,88	16,61
Cetonas	**12,61**	**16,32**	**44,27**	**17,53**	**3,85**	**6,38**
De nro par de C	1,80	3,31	3,71	2,80	6,49	3,14
De nro impar de C	97,38	94,05	91,84	94,39	51,52	94,36
Hidrocarburos	**1,77**	**8,83**	**16,79**	**27,46**	**13,06**	**0,19**
Lineales	39,59	71,91	0,83	8,72	5,87	30,39
Aromáticos	60,41	28,09	99,71	91,28	94,13	69,61
Aldehídos	**1,76**	**9,73**	**3,56**	**7,93**	**1,09**	**0,03**
Lineales	12,67	0,91	2,01	0,62	72,39	100
De cadena ramificada	73,57	67,46	93,70	96,60	23,93	-
Ésteres	**11,09**	**5,20**	**6,07**	**3,29**	**0,61**	**4,80**
Del ácido acético	8,16	8,98	4,98	13,89	12,71	7,57
Del ácido butanoico	60,57	47,67	64,92	66,73	61,86	41,17
Del ácido hexanoico	26,58	38,84	18,68	8,39	19,49	35,99
Ácidos	**69,51**	**46,92**	**7,56**	**9,56**	**79,96**	**86,79**
De cadena lineal y nro par de C	98,77	95,73	92,18	77,24	99,04	98,44
De cadena lineal y nro impar de C	0,68	0,92	1,55	1,21	0,80	0,70
De cadena ramificada	0,47	3,35	5,96	21,56	0,16	0,86
Ac. butanoico + Ac. hexanoico	89,84	77,57	69,05	62,67	92,99	88,47
Otros compuestos	**0,55**	**1,29**	**0,85**	**1,21**	**0,63**	**0,30**

Tabla 2. Número de compuestos de cada grupo químico identificados en las distintas muestras analizadas y áreas totales de compuestos (en unidades arbitrarias).

	Pamigiano Reggiano	Grana Padano	Gorgonzola A	Gorgonzola M	Pecorino Romano	Fiore Sardo
Alcoholes	11	13	13	10	8	12
Cetonas	11	10	13	11	7	11
Hidrocarburos	6	6	8	8	9	8
Aldehídos	5	5	4	4	5	1
Ésteres	6	4	10	7	6	16
Ácidos	12	10	12	9	11	11
Otros compuestos	7	6	4	2	5	5
Áreas Totales	**105.452**	**38.304**	**81.687**	**30.390**	**77.573**	**231.994**

Los quesos Gorgonzola presentaron un espectro de compuestos muy diferentes, fundamentalmente desde el punto de vista cuantitativo, siendo el área total del Gorgonzola A 2,7 veces superior al del

Gorgonzola M (**Tabla 2**). Los compuestos del grupo de las cetonas, alcoholes, hidrocarburos, y en menor medida ésteres y ácidos caracterizaron el perfil de estos quesos (**Tabla 1**). En quesos azules de otros orígenes también se han observado notorias diferencias cuantitativas en los perfiles de compuestos, lo que se encontraría asociado a las diferentes cepas de *Penicillum roqueforti* utilizadas y a la extensión en la cual se verifica el proceso de lipólisis, principal evento bioquímico de este tipo de quesos.

A continuación se realiza una descripción del perfil de compuestos para cada uno de los tipos de quesos analizados y se comparan los resultados con datos de bibliografía para las mismas variedades.

Quesos Azules

Se identificó un total de 64 compuestos entre las dos muestras analizadas (13 alcoholes, 13 cetonas, 4 aldehídos, 10 ésteres, 12 ácidos, 8 hidrocarburos y 4 compuestos de otros grupos químicos).

Alcoholes. Los alcoholes constituyeron un grupo mayoritario. En el Gorgonzola M representaron el 33% del área total de compuestos, siendo mayoritarios los alcoholes ramificados, principalmente 3-metil 1-butanol, mientras en el Gorgonzola A este grupo alcanzó el 21% del área total de compuestos, siendo mayoritarios los alcoholes secundarios de cadena lineal, principalmente el 2-pentanol y 2-heptanol.

Cetonas. Al igual que los alcoholes predominaron en el perfil de compuestos volátiles, alcanzando una cifra del 44% en el Gorgonzola A y del 18% en el Gorgonzola M. En ambos quesos prácticamente todas las metilcetonas desde C_3 a C_{11} se encontraron presentes, siendo las metilcetonas de número impar de átomos de carbono las mayoritarias (>90% del área de las cetonas) y particularmente la 2-heptanona, 2-pentanona+diacetilo (picos no resueltos) y 2-nonanona.

Aldehídos. Constituyeron una fracción minoritaria, representado un 8% en el Gorgonzola M y un 4% en el Gorgonzola A del área total de compuestos. Los aldehídos ramificados 2-metilbutanal y 3-metilbutanal fueron los mayoritarios de esta fracción.

Ésteres. Cuantitativamente resultó un grupo minoritario (3% en el Gorgonzola M y 6% en el Gorgonzola A del área total de compuestos), aunque se identificaron una amplia diversidad de estos compuestos. Los ésteres del ácido butanoico resultaron mayoritarios, alcanzando en ambas muestras aproximadamente el 66% del área de los ésteres, destacándose el butanoato de etilo y butanoato de isoamilo.

Àcidos. Los ácidos se encontraron presentes en bajas proporciones en el headspace de los quesos azules (en torno al 10% en ambas muestras). Todos los ácidos de cadena lineal desde C_2 a C_{10} se identificaron en el perfil del Gorgonzola A, mientras en el Gorgonzola M no se detectaron los ácidos propanoico y heptanoico. Los ácidos butanoico y hexanoico, de importancia por el aporte que realizan al flavor de esta variedad, representaron el 69% en el Gorgonzola A y el 63% en el Gorgonzola M del área total de ácidos. En el Gorgonzola M los ácidos ramificados constituyeron otra fracción de importancia, destacándose la presencia del ácido 3-metilbutanoico o isovalérico.

Hidrocarburos. Este grupo de compuestos resultó cuantitativamente de importancia, alcanzando un 27% en el Gorgonzola M y un 17% en el Gorgonzola A del área total de volátiles identificados. Se detectaron hidrocarburos saturados lineales como el hexano y heptano, pero fundamentalmente hidrocarburos aromáticos tales como etilbenceno, estireno y xilenos.

Otros compuestos. Dentro de este grupo se identificaron principalmente el metanotiol, *p*-etilanisol y de importancia desde un punto de vista cuantitativo resultó el *p*-metilanisol.

Muchos de los compuestos identificados en el presente estudio fueron informados en quesos Gorgonzola utilizando otras metodologías de aislamiento (Moio *et al*. 2000, Contarini y Toppino (1995). Particulamente Moio *et al*. (2000) encontraron en las fracciones neutras y ácidas de destilados de quesos Gorgonzola proporciones similares de cetonas, alcoholes, ésteres y aldehídos que la muestra de Gorgonzola A y los compuestos mayoritarios que se identificaron en dicho trabajo coincidieron con los que presentaron las mayores áreas en las dos muestras analizadas.

En quesos azules se han señalando al 2-heptanol (Moio *et al*. 2000, Curioni y Bosset 2002), 2-nonanol (Moio *et al*. 2000), 1-octen 3-ol (Moio *et al*. 2000, Curioni y Bosset 2002), 2-feniletanol (Frank *et al*. 2004), diacetilo (Qian *et al*. 2002), 2-heptanona (Moio *et al*. 2000, Qian *et al*. 2002, Frank *et al*. 2004), 2-nonanona (Moio *et al*. 2000, Qian *et al*. 2002, Frank et al. 2004), 3-metilbutanal (Qian *et al*. 2002, Curioni & Bosset 2002), bencenacetaldehído (Curioni y Bosset 2002), hexanoato de etilo (Moio *et al*. 2000, Qian *et al*. 2002), butanoato de etilo (Moio *et al*. 2000, Qian *et al*. 2002) y 4-metilanisol (Moio *et al*. 2000), como los principales compuestos claves en el aroma.

Quesos tipo grana

Se identificó un total de 62 compuestos entre las dos muestras analizadas (13 alcoholes, 11 cetonas, 7 aldehídos, 6 ésteres, 12 ácidos, 6 hidrocarburos y 7 compuestos de otros grupos químicos).

Alcoholes. En el Grana Padano constituyeron el tercer grupo de compuestos en importancia, con un 12% del área total de compuestos identificados, mientras en el Parmigiano Reggiano fueron minoritarios con sólo un 3%. En ambos quesos los alcoholes secundarios de cadena lineal resultaron los mayoritarios, destacándose desde un punto de vista cuantitativo el 2-butanol y 2-pentanol. Dentro de los alcoholes primarios de cadena lineal el etanol presentó los mayores valores de áreas.

Cetonas. Constituyeron el segundo grupo de compuestos cuantitativamente de importancia con el 13% del área total de compuestos identificados en el Parmigiano Reggiano y el 16% en el Grana Padano. Con excepción de la 2-decanona, todas las metilcetonas desde C_3 a C_{11} estuvieron presentes, siendo la 2-pentanona+diacetilo y la 2-heptanona las que presentaron las mayores áreas. En otros trabajos se han señalado a la pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona como las cetonas mayoritarias en los quesos grana (Barbieri *et al*. 1994, Curioni y Bosset 2002, Bellesia *et al*. 2003).

Aldehídos. Diferentes proporciones de este grupo se observaron en los perfiles de las dos muestras analizadas (10% en el Grana Padano y <2% en el Parmigiano Reggiano). Algunas diferencias se encontraron en cuanto a la clase de aldehídos identificados en estos quesos. El 2-butenal y hexanal se encontraron sólo en el Parmigiano Reggiano mientras el 2-hexenal y bencenacetaldehído se detectaron sólo en el Grana Padano. En ambos quesos, sin embargo, el 2-metilbutanal y 3-metilbutanal fueron los aldehídos mayoritarios.

Ésteres. Representaron el 11% del área total de compuestos en el Parmigiano Reggiano y el 5% en el Grana Padano. En ambos se destacaron los ésteres de los ácidos butanoico y hexanoico y particularmente el butanoato de etilo y hexanoato de etilo que presentaron las mayores áreas. Moio y Addeo (1998) también informaron la presencia mayoritaria de estos dos ésteres en muestras de queso Grana Padano.

Ácidos. Fueron el grupo de compuestos cuantitativamente más importante en los quesos grana con el 70% en el Parmigiano Reggiano y el 47% en el Grana Padano del área total de compuestos y prácticamente todos los ácidos de cadena lineal desde C_2 a C_{10} se encontraron presentes, siendo mayoritarios los ácidos butanoico y hexanoico (90% y 78% del total de ácidos en el Parmigiano Reggiano y el Grana Padano, respectivamente). La presencia mayoritaria de estos dos compuestos en los perfiles de la fracción ácida de los quesos grana ha sido señalada por distintos autores (Barbieri *et al*. 1994, Bellesia *et al*. 2003).

Hidrocarburos. Constituyeron una fracción de importancia en el Grana Padano (9% del área total de compuestos identificados) y minoritaria en el Parmigiano Reggiano (<2%), destacándose los hidrocarburos saturados lineales: hexano y heptano y los hidrocarburos aromáticos: *o*-xileno, *m*-xileno y *p*-xileno.

Otros compuestos. Dentro de este grupo se identificaron algunos terpenos (limoneno, 2-β-pineno, pirazinas (2,6-dimetilpirazina, 2,6-dietilpirazina) y compuestos tales como el 2-furanmetanol y 2-metoxifenol.

Todos los compuestos identificados en el presente estudio se encuentran informados en otros trabajos realizados en quesos de esta variedad (Barbieri *et al*. 1994, Moio y Addeo 1998, Qian y Reineccius 2002a, 2002b, 2003a, 2003b, Lee *et al*. 2003, Bellesia *et al*. 2003, Frank *et al*. 2004).

De acuerdo a datos de bibliografía, diferente es la contribución de los distintos grupos de compuestos al flavor global de los quesos grana. Las cetonas y los alcoholes no tendrían un rol clave aunque una contribución menor se ha señalado para el 2-heptanol (Moio y Addeo, 1998, Qian & Reineccius 2003a), 1-octen 3-ol (Moio y Addeo, 1998), 2-feniletanol (Frank et al. 2004), diacetilo (Qian y Reineccius 2002b, 2003a, 2003b), 2-heptanona y 2-nonanona (Qian y Reineccius 2002a). Distintos aldehídos contribuirían de modo importante en el aroma de estos quesos, entre los cuales puede mencionarse el acetaldehído (Qian y Reineccius 2002b, 2003b), 2-metilbutanal y 3-metilbutanal (Qian y Reineccius 2002a, 2002b, 2003a, 2003b). Dentro del grupo de los ácidos, principalmente los ácidos butanoico y hexanoico (Moio y Addeo 1998, Qian y Reineccius 2002a, 2003a, 2003b) se consideran de importancia en el flavor. En el caso particular de los ésteres, varios de ellos se encuentran asociados con las características notas frutales y fundamentalmente el butanoato de etilo y hexanoato de etilo (Moio y Addeo 1998, Qian y Reineccius 2002a, 2002b, 2003a, 2003b). Otros compuestos del grupo de

las pirazinas (Qian y Reineccius 2002a, 2002b, 2003b) y el furanmetanol (Qian y Reineccius 2002a, 2003b) también aportan notas aromáticas de incidencia en el flavor de estos quesos.

Quesos de oveja

Se identificaron 77 compuestos entre los dos quesos analizados (15 alcoholes, 11 cetonas, 6 aldehídos, 17 ésteres, 11 ácidos, 9 hidrocarburos y 8 compuestos de otros grupos químicos).

Alcoholes. Constituyeron un grupo minoritario en los dos quesos (entre el 1 y el 2% del área total de compuestos). Los alcoholes primarios de cadena lineal fueron los mayoritarios en el Pecorino Romano, principalmente etanol, y los alcoholes secundarios de cadena lineal en el Fiore Sardo, con mayores valores de áreas para el 2-propanol, 2-pentanol y 2-heptanol.

Cetonas. Constituyeron el segundo grupo de componentes mayoritarios en el Fiore Sardo con un 6% y el tercero en el Pecorino Romano con un 4% del área total de compuestos. La 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) fue la cetona mayoritaria en el Pecorino Romano y la 2-pentanona+diacetilo junto con la 2-heptanona en el Fiore Sardo.

Aldehídos. Constituyeron una fracción minoritaria del perfil de compuestos totales (<2%). En el Fiore Sardo sólo se identificó nonanal mientras en el Pecorino Romano los aldehídos cuantitativamente importantes fueron el 2- y 3-metilbutanal y el pentanal.

Ésteres. Aunque fueron una fracción minoritaria (<1% en el Pecorino Romano y 5% en el Fiore Sardo), en el Fiore Sardo se encontró una mayor diversidad de ésteres respecto al Pecorino Romano. Los ésteres de los ácidos butanoico y hexanoico resultaron mayoritarios, particularmente el butanoato de etilo y hexanoato de etilo. La presencia mayoritaria del butanoato de etilo en el Fiore Sardo fue señalada por Larráyoz *et al*. (2001).

Ácidos. Los perfiles de compuestos volátiles de los dos quesos de oveja se caracterizaron por presentar a los ácidos como el grupo mayoritario, superando el 80% del área total de compuestos. Todos los ácidos de cadena lineal desde C_2 a C_{10} estuvieron presentes en el perfil del Pecorino Romano y del Fiore Sardo siendo mayoritarios el butanoico y hexanoico. La incidencia de los ácidos en el perfil de compuestos de los quesos de oveja elaborados con el uso de coagulante en pasta y particularmente de los ácidos butanoico y hexanoico ha sido señalada por distintos autores (Chin *et al*. 1996, Larráyoz *et al*. 2001, Frank *et al*. 2004).

Hidrocarburos. En el Pecorino Romano esta fracción alcanzó el 13%, constituyendo el segundo grupo de compuestos en importancia, encontrándose mayoritariamente los hidrocarburos aromáticos etilbenceno y xilenos. En el queso Fiore Sardo fueron un grupo minoritario (<1%).

Otros compuestos. Algunos compuestos tales como el 2-etilfurano, acetilfurano, 2-furanmetanol, 2-metoxifenol fueron principalmente identificados en el Fiore Sardo y algunos terpenos se encontraron presentes sólo en el Pecorino Romano.

La información disponible respecto a la fracción volátil de los quesos Pecorino Romano y Fiore Sardo es escasa y poco se sabe de la contribución de los distintos grupos de compuestos al flavor global de estos quesos. Algunos de los compuestos identificados en el presente estudio ya fueron informados en otros trabajos (Chin *et al*. 1996, Larráyoz *et al*. 2001, Frank *et al*. 2004).

CONCLUSIONES

La SPME es una herramienta muy útil para el estudio de los compuestos volátiles generados durante la maduración de los quesos. En el presente trabajo se han aportado una serie de datos de tipo cualitativo y semicuantitativo respecto al perfil de volátiles de quesos italianos que fueron concordantes con los resultados publicados por otros autores utilizando distintas metodologías de aislamiento de los compuestos. Si bien una única metodología de extracción no permite realizar una caracterización completa de los compuestos de aroma asociados a una determinada variedad de queso, la SPME con las ventajas de ser una técnica sencilla, rápida y confiable, permitió aislar compuestos pertenecientes a diversos grupos químicos y reflejar las diferencias que existen en los perfiles de compuestos dentro de una variedad y entre distintas variedades de quesos, lo cual la convierte en una herramienta valiosa para el estudio de los mismos. Por otra parte, se ha ampliado el conocimiento de compuestos volátiles en quesos de oveja de los cuales hay muy poca información. En un futuro trabajo se espera correlacionar los resultados de análisis físico-químico, niveles de proteólisis y lipólisis con los perfiles de compuestos volátiles obtenidos para estas variedades de quesos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbieri G, Bolzoni L, Careri M, Mangia A, Parolari G, Spagnoli S, Virgili R. 1994. Study of the Volatile Fraction of Parmesan Cheese. J. Agric. Food Chem., 42: 1170-1176.

Battistotti B y Corradini C. 1993. Italian Cheese. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Vol 2. (Ed. Fox PF). USA: Chapman & Hall. Pág 221 a 243.

Bellesia F, Pinetti A, Pagnoni U, Rinaldi R, Zucchi C, Caglioti L, Palyi G. 2003. Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hard cheese. Food Chemistry, 83**:** 55-61.

Chin H, Bernhard R, Rosenberg M. 1996. Solid Phase Microextraction for Cheese Volatile Compound Analysis. Journal of Food Science, 61: 1118-1122.

Contarini G. y Toppino P. 1995. Lipolysis in Gorgonzola Cheese during Ripening. International Dairy Journal, 5: 141-155.

Curioni P y Bosset J. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry (Review). International Dairy Journal, 12: 959-984.

Frank D, Owen C, Patterson J. 2004. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, 37: 139-154.

Kataoka H, Lord H, Pawliszyn J. 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. Journal of Chromatography A, 880: 35-62.

Larráyoz P, Addis M, Gauch R, Bosset J. 2001. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes′ milk cheeses. International Dairy Journal, 11**:** 911-926.

Lee J-H, Diono R, Kim G-Y, Min D. 2003. Optimization of Solid Phase Microextraction Analysis for the Headspace Volatile Compounds of Parmesan Cheese. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 1136-1140.

McSweeney P y Sousa M. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. Lait, 80: 293-324.

Moio L y Addeo F. (1998). Grana Padano cheese aroma. Journal of Dairy Reasearch, 65: 317-333.

Moio L, Piombino P, Addeo F. 2000. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. Journal of Dairy Research, 67: 273-285.

Piredda G y Addis M. 1998. Influenza dell′ alimentazione sulle attivitá enzimatiche del caglio in pasta d′ agnello. Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia, 49: 129-138.

Qian M, Nelson C, Bloomer S. 2002. Evaluation of fat-derived aroma compounds in blue cheese by dynamic headspace GC/Olfactometry-MS. Journal of the American Oil Chemists`Society, 79: 663-667.

Qian M y Reineccius G. 2002a. Identification of Aroma Compounds in Parmigiano-Reggiano Cheese by Gas Chromatography/Olfactometry. Journal of Dairy Science, 85: 1362-1369.

Qian M y Reineccius G. 2002b. Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. Flavour and Fragance Journal, 18: 252-259.

Qian M y Reineccius G. 2003a. Quantification of Aroma Compounds in Parmigiano Reggiano Cheese by a Dynamic Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry Technique and Calculation of Odor Activity Value. Journal of Dairy Science, 86: 770-776.

Qian M y Reineccius G. 2003b. Static Headspace and aroma extract dilution analysis of Parmigiano Reggiano Cheese. Journal of Food Science, 68: 794-798.

Composición fenólica de mieles de eucaliptos, trébol y alfalfa

Phenolic composition of eucalyptus, clover and alfalfa honey

Ciappini MC, Stoppani F

Universidad Tecnológica Nacional Fac. Regional Rosario. Zeballos 1341 - S2000BUN Rosario, Argentina e-mail: mcciappini@frro.utn.edu.ar

RESUMEN

Recientemente, se ha renovado el interés por el estudio de la composición de mieles y propóleos. Actualmente, el mercado mundial de productos apícolas está atento a las mieles cuya capacidad antioxidante y antibacteriana son conocidas, como lo demuestra la inclusión de estas características en mieles australianas, neocelandesas e italianas. El interés por los antioxidantes se basa en la capacidad de estos en prevenir enfermedades de variada naturaleza; teniendo gran importancia los alimentos que puedan aportar estos antioxidantes, para incorporarlos a la dieta. Los nutricionistas reconocen que el sabor más agradable de la miel la hace más apetecible para muchos consumidores, que incorporan escasas cantidades de vegetales ricos en antioxidantes en su dieta, pero reconocen que pocos estudios han examinado los perfiles de antioxidantes en mieles de distinto origen floral. Asimismo, la composición fenólica está relacionada con el origen floral de la miel y podría ser usada como elemento de tipificación. En consecuencia, es un objetivo trascendente determinar la presencia de compuestos con capacidad antioxidante y/o antibacteriana en las mieles, con el fin de aportar nuevos elementos para promover su consumo y comercialización, a partir de estas propiedades, así como también caracterizar este producto de una manera más completa que con los análisis fisicoquímicos tradicionales. Con este propósito, se analizaron 19 muestras de mieles de *Eucalyptus* spp., *Trifolium* spp. y *Medicago sativa*. Tras la extracción en fase sólida y posterior concentración de los compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la miel, se determinaron por HPLC los siguientes compuestos: ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*- y *o*- cumárico, ácido ferúlico, quercetina, pinobanskina, kaempferol, apigenina, isoramnetina, pinocembrina, crisina y galangina. Se encontraron mayores concentraciones de quercetina, ácido cafeico y kaempferol (entre 1.5 y 0.7 mg/100 g de miel en promedio), siendo pinobanskina, crisina y galangina los minoritarios y estando presentes sólo en algunas de las muestras (entre 0.003 y 0.04 mg/100 g miel, en promedio). El análisis de varianza permitió diferenciar los perfiles de compuestos fenólicos de las mieles de *Trifolium* spp. y *Medicago sativa* con respecto a las mieles de *Eucalyptus* spp. (p=0.05), pero no entre sí. El análisis multivariado por Componentes Principales explicó el 72% de la varianza total, quedando el CP1 determinado fundamentalmente por la concentración de apigenina, pinocembrina, kaempferol y ácido ferúlico y el CP2, por p-cumárico y quercetina.

ABSTRACT

Honey and propolis are rich in phenolic compounds, which act as natural antioxidants and a becaming increasingly popular because their potential role in contributing to human health. The compounds can also be used as indicators in studies into the floral and geographical origin of honeys. The aim of the present work was identify antioxidant/antibacterian coumpounds in honey to improve the knowledge of this product. *Eucalyptus* spp., *Trifolium* spp. *y Medicago sativa* honeys were analized. After an extraction in solid phase and concentration, the presence of caffeic acid, siringic acid, *p*- y *o*-coumaric acid, ferulic acid, quercetin, pinobanskin, kaempferol, apigenin, isoramnetin, pinocembrin, crisin and galangin were evaluated in all samples by HPLC. The results indicated that quercetin, caffeic acid and kaempferol were present in highest concentration (between 1.5 and 0.7 mg/100 g of honey), while pinobanskin, crisin y galangin showed the lowest concentration (between 0.003 y 0.04 mg/100 g of honey). The flavonoid profile of *Eucalyptus* honey showed significative differences (p=0.05) from *Trifolium* and *Mendicago sativa* profiles. Principal Component Analysis explains 72% of total variance; apigenin, pinocembrin, kaempferol and ferulic acid were located on the first component and p-coumaric and quercetin on the second.

PALABRAS CLAVE: *mieles, compuestos fenólicos, flavonoides.*

KEYWORDS: *honey, phenolic compounds, flavonoids.*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son aquellos que tienen en común la característica química de presentar un anillo benceno hidroxilado (grupo fenol) en sus estructuras moleculares, las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. En general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido siquímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, como por ejemplo, los flavonoides). Cuando se encuentra más de un grupo fenol por molécula, se los denomina polifenoles.

Las principales fuentes de polifenoles son bayas, té, cerveza, uvas/vino, aceite de oliva, chocolate, nueces, maníes, granadas, yerba mate, otras frutas y vegetales. Los más elevados niveles de polifenoles se encuentran generalmente en la cáscara de las frutas. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen grandes diferencias en la efectividad como antioxidantes, entre los distintos grupos de compuestos (William *et al.* 2004). Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes mediante dos mecanismos principales (Gheldof *et al* 2003): como captadores de radicales libres o como quelantes de metales.

La miel se define como la sustancia dulce producida por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores, de las secreciones de partes vivas de las plantas o de las excreciones de los insectos succionadores, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas, almacenan y maduran en la colmenas. Es un producto biológico muy complejo, que varía notablemente en su composición, como consecuencia de la flora de origen de la zona y de las condiciones climáticas. La diferencia entre una miel y otra, depende sobre todo de la calidad y cantidad de plantas que florecen y producen el néctar en el mismo período y que son visitadas por las abejas. En muchos casos, hay una fuente principal que predomina netamente sobre las demás y confiere a la miel sus peculiares características, constituyendo las mieles monoflorales.

Ha sido usada desde la antigüedad como ingrediente alimenticio y medicamento para quemaduras, úlceras y heridas, fundamentalmente porque posee un efecto calmante durante su aplicación inicial en heridas abiertas (Gutierrez *et al.* 2008). Debido a sus propiedades físicas, la miel se constituye en una barrera protectora y, debido a su osmolaridad, crea un ambiente propicio para la curación, que a su vez previene la colonización de bacterias (Schram *et al*. 2003). A partir de este hecho, se han realizado numerosos estudios tendientes a explicar las propiedades antibacterianas de la miel y su acción. La actividad antibacteriana de la miel ha sido analizada, especialmente en relación con los efectos del bajo contenido de humedad, acidez y actividad enzimática. Hay un acuerdo general respecto a que la actividad antibacteriana de la miel se debe a la producción de peróxido de hidrógeno (Molan 1995). Sin embargo, aún cuando el peróxido de hidrógeno se destruya, en la mayoría de las mieles se observa actividad antibacteriana residual. Parte de esta actividad se debe a la presencia de pinocembrina (Siess *et al.* 1996) y posiblemente a otros compuestos fenólicos, con propiedades antibacterianas (Russell *et al*. 1990, Weston *et al*. 1999, 2000). Se ha demostrado que la actividad antibacteriana no-peroxídica de la miel de manuka de Nueva Zelanda es efectiva para inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, la bacteria responsable de causar gastritis y úlceras duodenales (Somal *et* al. 1994), mientras que la actividad antibacteriana del peróxido de hidrógeno carece de este efecto (Molan 1996, Molan *et al* 1998). Molan (1995) aisló compuestos derivados de ácidos aromáticos, como el siríngico y el fenilacético, en la miel de manuka, que podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana de esta miel.

Las mieles italianas también fueron estudiadas con respecto a su composición fenólica; se ensayó el efecto de los flavonoides presentes en la miel como agentes protectores contra el daño oxidativo de los glóbulos rojos, con resultados positivos (Blasa *et al*. 2007). Esta es una de las razones por las cuales se ha incrementado el consumo de esta miel.

A pesar de que los estudios acerca de la composición de la miel se han iniciado más de cien años atrás (Gojmerac *et al.* 1980, Winston 1987), el interés en los compuestos fenólicos presentes en las mieles se ha reforzado recientemente, con el propósito de explicar la acción antibacteriana mencionada, así como también alguna acción antioxidante. La actividad antimicrobiana, la ecología y diversidad de especies asociadas, capaces de producir interacciones metabólicas, contribuyen a la caracterización de

la miel y permiten asociarla a diferentes usos y aplicaciones. El interés por los antioxidantes se basa en la capacidad de estos en prevenir enfermedades de variada naturaleza; teniendo gran importancia los alimentos que puedan aportar estos antioxidantes, para incorporarlos a la dieta.
Incrementando el interés en este análisis, la determinación de los compuestos fenólicos presentes en la miel, se relaciona también con su rol potencial como marcadores bioquímicos para autenticar su origen geográfico (Tomás-Barberán *et al*. 1993, Lihu *et al.* 2003), botánico (Gomez Caravaca *et al.* 2006, Martos *et al.* 2005, Tomás- Barberán *et al*. 1989, 2001) o ambos (Mato *et al*. 2004).
Se han identificado 33 flavonoides en las mieles (entre ellos apigenina, crisina, eridictiol, galangina, hesperetina, isoramnetina, kaempferol, luteolina, miricetina, naringenina, pinobanskina, quercetina, ramnetina, tectocrisina, tricetina), 11 de los cuales tambien fueron encontrados en el néctar de las flores, 9 en el polen y 25 en el propóleo (Muñoz *et al.* 2007).
No se registran antecedentes acerca de la composición fenólica de mieles de la Argentina, aún cuando se trata del segundo exportador mundial de este producto. En consecuencia, es un objetivo trascendente determinar la presencia de compuestos con capacidad antioxidante en las mieles de este origen, con el fin de aportar nuevos elementos para promover su consumo y comercialización, a partir de estas propiedades. Para corroborar además la correlación entre origen botánico y perfil de compuestos fenólicos, el estudio se realizó en mieles monoflorales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron provistas por el Programa Apícola Provincial, dependiente del Ministerio de la Producción del Gobierno de la provincia de Santa Fe y la recolección de las mismas se hizo de acuerdo a la norma IRAM 15929 (1994). Se recolectaron 38 muestras.
Los análisis palinológicos fueron realizados en la Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, a cargo de la Dra. Susana Gattuso.
Para la caracterización palinológica de las mieles se efectuó un análisis cualitativo según la técnica de Loveaux et al. (1978), normalizada por la International Commission for Bee Botany (ICBB). Se determinaron los tipos morfológicos de los granos de polen con el mayor grado de aproximación taxonómica posible, confrontando los mismos con los atlas palinológicos usuales (Markgraf y D'antoni 1978, Erdtman 1966) y con una colección de referencia proveniente de plantas recolectadas en las áreas de estudio durante la temporada apícola, perteneciente a Cátedra de Botánica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. Se obtuvo la abundancia relativa de cada tipo, identificando un número no inferior a 500 granos por muestra (Von Der Ohe et al. 2004). Las frecuencias inferiores al 1% no se consideraron por estar en el límite de resolución del método (Loveaux et al. 1978). La calificación de mieles monoflorales se hizo de acuerdo a la Res. SAGPyA Nº 274/95, según la cual, se consideran monoflorales y se les atribuye un origen botánico determinado, cuando el polen de ese origen presente en una miel, supera el 45%, a excepción del eucalipto, donde se requiere que el porcentaje de polen de esta especie sea mayor o igual al 70% y de las mieles de alfalfa y de citrus, que requieren sólo un 20% de polen de este origen.
Entre los ensayos fisicoquímicos, se determinaron humedad (AOAC Official Meth. 969.38), acidez (AOAC Official Meth. 962.19), color (Norma IRAM 15941–2 1997) utilizando um colorímetro Pfund; fenoles totales o índice de Folin Ciocalteau (Singleton et al. 1999), efectuando las mediciones en un espectrofotómetro Varian Cary 50 a 725 nm, que correspondió a la máxima absorbancia, y expresando los resultados como ácido gálico equivalente (AG). Además, se identificaron y cuantificaron compuestos fenólicos mediante cromatografía líquida (Vivar Quintana et al. 1999). Las muesras de miel se trataron con una resina polimérica no iónica XAD-2 (Ferreres et al. 1994), para eliminar los azúcares. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu Pro Star 10, empleando como eluentes ácido fórmico al 10% (solvente A) y metanol (solvente B). La elución se llevó a cabo con un flujo de 0.7 ml/min, comenzando con 5% del solvente B, que se incrementó al 30% en 25 minutos; luego se mantuvo isocrático durante 15 minutos, para volver a incrementarse hasta 80% de B al cabo de los 30 minutos siguientes. La detección de picos se realizó a 290 y 340 nm con un detector UV visible. Para la identificación de picos en los cromatogramas fueron utilizadas sustancias de referencia calidad SIGMA Chemical Company (St. Louis, MO). El resto de los reactivos fueron de calidad Merck, Darmstad, Germany.

Se calcularon los parámetros estadísticos para cada conjunto de datos, el diagrama de dispersión y los coeficientes de correlación lineal mediante el utilitario XStat Plus. La significación estadística de las diferencias de los valores medios fue evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA) y con el método de Kruskal-Wallis. Se consideraron las diferencias significativas para $p<0.05$. De los métodos de estadística multivariada, se utilizó el método de Componentes Principales, que permite el análisis de las relaciones entre variables y similitudes entre individuos (Niño y Simonetti 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se encontraron 59 tipos morfológicos de polen. Las familias más representadas fueron: Leguminoseae, Myrtaceae y Brassicaceae. El 60.5% de las muestras analizadas fue caracterizada como monofloral, predominando las mieles de *Trifolium* spp., (trébol 39.1%), *Mendicago sativa* (alfalfa 21.7%) y *Eucalyptus* spp. (eucalipto 21.7%). Además se encontró una muestra de miel de *Prosopis* sp. (algarrobo), una de *Geoffroea decorticans* (chañar) y dos mieles de *Salix* sp. (sauce). Para este trabajo, se seleccionaron las mieles monoflorales de trébol, alfalfa y eucalipto, por estar poco representado el resto de los orígenes florales. Se obtuvieron así 19 muestras, cuyos análisis polínicos se muestran en la **Tabla 1**.

Los valores de acidez, color y humedad se muestran en la **Tabla 2**. La acidez, que indica el grado de frescura y conservación, se mantuvo dentro de las especificaciones de calidad para todas las muestras. El promedio fue igual a 23,52 meq/kg con una desviación estándar de 6,25. Los tenores de humedad también se encontraron dentro de especificación, siendo el promedio igual a 18,0 g/100 g con una desviación estándar de 0,9. Tanto la humedad como la acidez se analizaron también por origen floral, no se encontraron diferencias significativas entre los mismos, al compararlos mediante un test de Kruskal Wallis, lo que indicaría que estos parámetros físico-químicos son indicadores de calidad, pero no de origen botánico.

Tabla 2. Origen floral, acidez, humedad y color de mieles de trébol, alfalfa y eucalipto.

N° Muestra	origen floral	acidez	Humedad	Color
		meq/kg	*g/100 g*	*mm Pfund*
14	*Eucaliptus*	*8.58*	*17.0*	*33.0*
18	*Eucaliptus*	22,62	18,8	69.1
34	*Eucaliptus*	*15.24*	18,5	45.1
40	Eucaliptus	20.83	18.5	76.6
93	Eucaliptus	34.76	18.0	95.2
12	*Trifolium*	*28.90*	*18.5*	*52.0*
16	*Trifolium*	*19.09*	*18.0*	*33.5*
60	*Trifolium*	*12.85*	*16.0*	*54.0*
63	*Trifolium*	*27.20*	*18.5*	*47.1*
64	*Trifolium*	*25.74*	*18.0*	*40.3*
66	*Trifolium*	*25.62*	*17.5*	*45.1*
76	*Trifolium*	*26.91*	*18.0*	*53.1*
78	*Trifolium*	*26.62*	*18.2*	*43.3*
91	*Trifolium*	*21.46*	*16.0*	*79.4*
79	*Mendicago sativa*	*21.10*	*19.0*	*35.3*
80	*Mendicago sativa*	*27.57*	*18,5*	*53.3*
82	*Mendicago sativa*	*28.26*	*18.0*	*53.0*
83	*Mendicago sativa*	*26.08*	*18.5*	*40.3*
84	*Mendicago sativa*	*27,57*	*19.0*	*52.3*

En la **Figura 1** se observan los datos de color para las mieles analizadas, discriminadas por origen floral. Para las mieles de eucalipto la distribución del color es simétrica pero dispersa; mientras que para trébol y alfalfa la distribución del color no es simétrica pero presenta menor dispersión. También se observa para las mieles de trébol un punto anómalo, que se puede atribuir a algún error por parte del experimentador. Tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas entre el color de las mieles de los tres orígenes florales analizados.

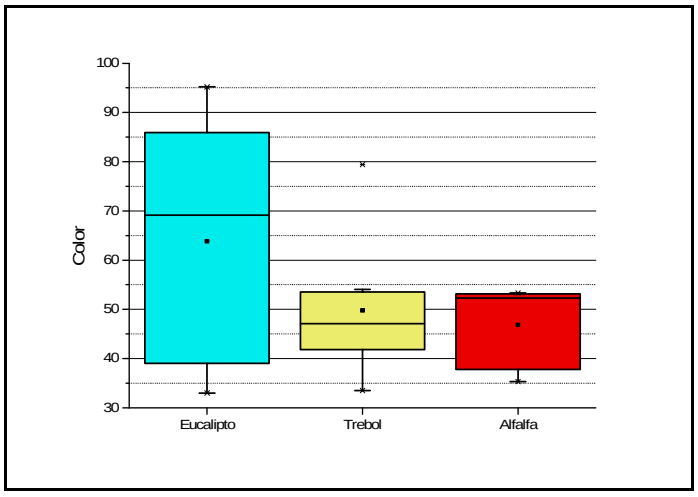


Figura 1. Promedio y dispersión de los valores de color de mieles monoflorales de trébol, alfalfa y eucalipto.

El contenido de fenoles totales o índice de Folin Ciocalteau estuvo entre 47.91 mg y 183.30 mg AG /100 g de miel, con un promedio de 97,78 mg/100 g ± 41,30. Este intervalo es superior al informado en la bibliografía. Por ejemplo, Meda *et al*. (2005) encontraron que el contenido total de compuestos fenólicos variaba entre 32.59 y 114.75 mg AG/ 100 g de miel, con un promedio de 74.38 mg AG/ 100 g ± 20.54 para mieles multiflorales y mieles de mielada, correspondiendo a estas últimas los valores más altos. Por su parte, Álvarez Suárez *et al*. (2009) detectaron niveles de ácido gálico equivalente entre 21,36 mg y 49,63 mg AG/100 g para mieles uniflorales de Cuba, mientras que Sosa Martínez *et al.* (2009) informan valores entre 6,1 mg y 44,0 mg AG/100 g de miel, para mieles multiflorales del mismo origen geográfico.

El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides se informa en la **Tabla 3**. Con el propósito de analizar la información obtenida al cuantificar los compuestos fenólicos y flavonoides para las diferentes muestras de miel, se aplicó el Análisis por Componentes Principales. El primer factor sintetizó muy bien a las variables apigenina, pinocembrina, kaempferol y ácido ferúlico. El segundo factor dió cuenta principalmente de la variabilidad debida al ácido p-cumárico y a la quercetina. El tercer factor explicaría ácido cafeico y o-cumárico y el cuarto factor, crisina.

Una primera lectura de la **Figura 2** correspondiente a la distribución de las mieles en el primer plano factorial, permite ver que las mieles de eucalipto se orientan a la derecha del origen (a excepción de la muestra 40); mientras que las mieles de alfalfa y trébol lo hacen en el semiplano opuesto. A su vez y respecto a la segunda componente, las mieles de trébol y alfalfa parecen ordenarse en dos recintos, mientras que las correspondientes a trébol se diferencian ampliamente en el sentido de este factor.

Si se observa exhaustivamente el análisis polínico de las muestras de miel de eucalipto, se comprueba que las muestras 18 y 93 poseen porcentajes de polen de esa especie superiores al 80%, estando este acompañado por *Trifolium* spp., *Melilotus* sp. y *Carduus* spp. como pólenes minoritarios (entre 3 y 15%). Con respecto a la primera componente principal, estas son las dos muestras que tienen las mayores contribuciones. Las muestras 34 y 14 apenas superan el 70% de contenido de polen de *Eucalyptus* spp.; en estas, el *Trifolium* spp. está presente como polen secundario (entre 15 y 45%), lo que explicaría su proximidad a muestras de trébol. Finalmente, la muestra 40 posee 71% de polen de *Eucalyptus* spp., apareciendo *Salix* spp, Mirtaceae, *Trifolium* spp. y *Carduus* spp. como pólenes minoritarios. Ceksteryte *et al.* (2006) encontraron hiperósidos (76.1 a 178.8 µg/100 g) y quercetina (88.2 a 96.7 µg/100 g) en mieles de sauce. En consecuencia, si bien en todas las muestras el porcentaje de polen de *Eucalyptus* spp. permite clasificarlas como monoflorales de eucalipto de acuerdo a la Resolución SAGPyA 294/95, el néctar aportado por las otras fuentes botánicas visitadas por las abejas, influye en el perfil de compuestos fenólicos presentes. Baldi (1998) tras estudiar las características fisicoquímicas de las mieles de eucalipto, propuso que el contenido de polen de *Eucalyptus* spp debería alcanzar el 80%, para asignar ese origen botánico a una miel.

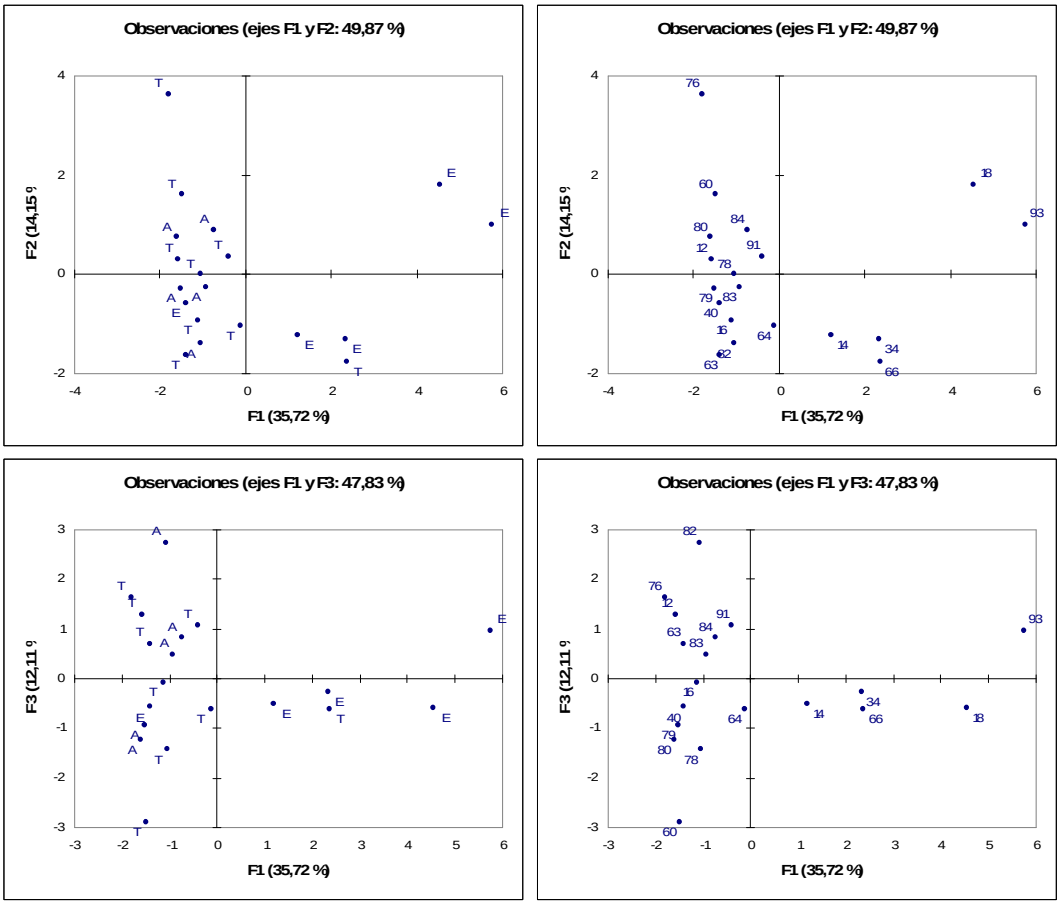


Figura 2. Componentes Principales – A = alfalfa, T = trébol, E= eucalipto; los número corresponden a la identificación de las muestras según la Tabla 1.

Las mieles de alfalfa, con menores contenidos de apigenina, pinocembrina y kaempferol que las de eucalipto, parecen aglutinarse entorno al contenido de quercetina y ácidos o- y p-cumárico. Si se observa el perfil polínico de estas muestras, se aprecia que en general los pólenes secundarios y minoritarios acompañantes de las mieles de alfalfa, son tréboles (*Melilotus* spp., *Trifolium spp.*), lo cual explica la coincidencia en el recinto ocupado, junto a las mieles de trébol. La muestra 79 tiene una interesante riqueza polínica: *Mendicago sativa* está acompañado por *Brassicaceae, Verbesina encelioides, Eucalyptus* spp., *Poaceae, Eryngium, Helianthus annuus, Melilotus, Trifolium, Gomphrena* spp. y *Baccharis salicifolia*. Las muestras 82, 83 y 84 tienen *Eucalyptus* spp. como polen secundario, hecho que parece reorientar las muestras en el sentido del eje horizontal (F1). Particular interés despierta la muestra 82, que se reorienta entorno al vector correspondiente a la concentración de pinobanskina, alejándose de los vectores correspondientes a los ácidos cafeico, p-cumárico y a la quercitina. El porcentaje de polen de *Mendicago sativa* presente en esta muestra es igual a 85,79%, muy superior al que se encuentra en las otras muestras, comprendidas en un intervalo que va desde 41,66% a 65.76%. Como ya se mencionó, las mieles de trébol comparten el recinto con las mieles de alfalfa, comportamiento esperable en virtud de que uno se encuentra como polen acompañante del otro. Muestran comportamientos ligeramente diferentes las muestras 76 y 66. En esta última, el porcentaje de polen de *Melilotus* spp. (trébol de olor) es igual a 46.71%, acompañado por *Trifolium* spp. (tréboles), presente en un 22,36%. La muestra 76, en cambio, contiene sólo 2.46% de *Melilotus* spp. (trébol de olor) y 68.51% de *Trifolium* spp. (tréboles), lo cual las sitúa en los extremos del recinto. Es la muestra con mayor contribución respecto a la segunda componente principal. La muestra 64, que se orienta hacia la 66, contiene 39.39% de *Melilotus* spp. (trébol de olor) y 29.29% de Trifolium spp. (tréboles), presentando las restantes muestras, porcentajes intermedios.

La **Figura 2** muestra las mieles analizadas, donde las mieles de eucalipto se separan de las de trébol y alfalfa. Esto refleja que pueden ser detectadas diferencias específicas en el perfil de flavonoides en mieles de diferente origen botánico, con lo que podrían ser indicadores de dicho origen. Las mieles de

eucaliptos mostraron contenidos superiores de apigenina, kaempferol y pinocembrina y menores de ácido ferúlico, respecto a las mieles de alfalfa y de trébol.
Se obtuvo una correlación lineal (r^2= 0.82) entre el color de las mieles y el contenido de fenoles totales, siendo las mieles más oscuras las de mayor contenido fenólico, en concordancia con lo encontrado por Gheldof *et al.* (2003).

Tabla 1. Porcentaje de polen presente en cada muestra de miel

	MUESTRAS																		
	12	**14**	**16**	**18**	**34**	**40**	**60**	**63**	**64**	**66**	**76**	**78**	**79**	**80**	**82**	**83**	**84**	**91**	**93**
Trifolium spp.	57,65	17,24	43,47	8,51	13,24	6,53	37,24	20,93	29,29	22,36		27,81	7,89	6,52	2,95	6,54		61,33	11,20
Medicago sativa spp.	25,51		32,91				27,58	12,58	8,58	13,15	19,00	21,80	46,71	65,76	85,79	41,66	52,04	9,33	
Portulacca oleracea	7,14			3,54															
Eucalyptus spp.	3,57	77,24	0,62	82,97	74,17	71,24	26,20					5,26	5,26			18,45	28,08	29,33	79,31
Brassicaceae	1,53	0,68					1,37	2,05	1,01			5,26	10,52			7,73	6,21		
Apium spp.	1,02	2,75	1,86																
Poaceae	1,02		2,48					5,04	4,04	4,60		5,26	2,63			1,78			
Cichorium intybus	0,51		6,21																
Helianthus annuus	0,51		12,42				1,37	17,15	15,15			4,21	1,97			1,78			
Malvaceae		0,68					1,37									1,19			
Melilotus spp				2,83				36,30	39,39	46,71	2,46	18,79	9,86	20,10	2,95	7,73	6,16		5,17
Carduus spp				1,41		4,57		0,90	0,50	0,65					1,18	1,19	3,42		4,31
Trifolium pratensis					7,94						68,51								
Helianthaeae					2,64														
Mirtaceae						6,53										5,35	1,36		
Salix spp.						7,18													
Chenopodiaceae							2,06			2,63									
Ammi visnaga							1,37												
Eryngium spp								5,04		1,97	2,46	6,76	1,97		5,91	1,78			
Cycorea									15,15	2,63	3,08			1,63					
Baccharis salicifolia									2,02				1,31						
Asteraceae										1,97									
Gomphrena spp											4,32	4,21	1,31	3,80	1,18	1,19			
Verbesina encelioides													10,52			3,57	1,36		
Vicia spp														2,17					
Solidago chilensis																	1,36		

Tabla 3. Compuestos fenólicos determinados por HPLC presentes en lãs mieles monoflorales de eucalipto, trébol y alfalfa.

Muestra	Galangina	Miricetina	Crisina	Pinocembrina	Isoramnetina	Apigenina	Kaempferol	Pinobanskina	Quercetina	o-cumárico	Ferulico	p-cumarico	Siringico	Cafeico
14	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,140	0,128	0,094	0,210	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
18	< 0,001	< 0,001	0,041	1,094	< 0,001	0,361	0,821	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
34	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,456	0,206	0,490	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
40	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,140	0,147	< 0,001	< 0,001	0,395	0,368	< 0,001	0,366	0,899
93	0,050	< 0,001	< 0,001	1,010	0,504	0,315	0,931	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
12	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,025	< 0,001	0,063	< 0,001	5,894	0,387	0,177	0,099	< 0,001	< 0,001
16	< 0,001	< 0,001	0,005	0,030	0,037	< 0,001	0,100	0,107	< 0,001	0,292	0,202	0,055	< 0,001	1,958
60	< 0,001	< 0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	0,197	0,151	< 0,001	3,080	< 0,001	0,336	0,295	< 0,001	4,599
63	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,032	0,069	0,145	< 0,001	0,336	0,245	< 0,001	0,203	0,627
64	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,010	0,012	< 0,001	0,705	0,022	0,061	0,055	< 0,001	0,298
66	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,061	0,495	0,336	0,070	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
76	0,012	< 0,001	0,008	< 0,001	< 0,001	0,015	0,322	< 0,001	6,987	0,279	0,224	0,985	< 0,001	0,880
78	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,051	0,069	< 0,001	< 0,001	0,095	0,298	0,267	< 0,001	1,625
91	0,005	< 0,001	0,021	0,161	0,313	0,051	0,066	< 0,001	3,127	0,326	0,203	0,116	0,411	0,184
79	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	0,041	0,059	< 0,001	1,693	0,083	0,238	0,106	0,606	1,197
80	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,040	0,067	< 0,001	3,462	0,080	0,299	0,230	0,105	2,164
82	< 0,001	< 0,001	0,002	0,080	0,168	0,052	0,065	0,229	2,515	0,368	< 0,001	0,301	0,291	0,292
83	0,003	< 0,001	0,004	0,044	0,146	0,029	0,021	< 0,001	2,610	0,263	0,223	0,104	0,215	0,104
84	< 0,001	< 0,001	0,002	0,058	0,150	0,042	0,610	< 0,001	3,870	0,298	0,236	0,218	0,355	0,468

CONCLUSIONES

Los parámetros de acidez, humedad y color no presentaron diferencias significativas en función del origen floral de las muestras. En consecuencia, no es posible relacionar estos valores con determinaciones de genuinidad por origen botánico.

La determinación de compuestos fenólicos y flavonoides por HPLC, permitió verificar que los niveles de concentración de estos compuestos se modifican de acuerdo al origen floral de las mieles, pudiendo considerarse al perfil de estos compuestos como un indicador de origen botánico. Sin embargo, la discriminación efectiva de estas mieles por origen floral a partir del perfil de compuestos fenólicos y flavonoides, se produce para porcentajes de polen presentes superiores a los establecidos para otorgarles el carácter monofloral, de acuerdo a la legislación mencionada. Los pólenes secundarios y minoritarios ejercen influencia en los compuestos fenólicos y flavonoides presentes, así como en sus concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez Suarez JM, Tulipani S, Romandini S, Bompadre S, Vidal A, Battino S. 2009. Determinación de polifenoles y flavonoides totales en mieles uniflorales de Cuba y de su capacidad antioxidante total, Actas del 3° Congreso Cubano de Apicultura, La Habana, Cuba, 9 al 13 de marzo.

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 969.38 Moisture in Honey, Ch. 44, p. 20.

AOAC Official Methods of Analysis. 1995. 16 th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MD, Method 962.19 Acidity in Honey, Ch. 44, p. 40.

Baldi B. 1998. Estudio Bromatológico de Mieles Argentinas en relación a su origen botánico, Tesis Doctoral, Fac Ciencias Exactas, Univ. Nacional de La Plata.

Blasa M, Candiaracci M, Accorsi A, Piacentini M, Piatti E. 2007. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. Food Chemistry 104: 1635-1640.

Ceksteryte V, Kazlauskas S, Racys J. 2006. Composition of flavonoids in Lithuanian honey and beebread, Biologija 2: 38-33.

Erdtman, G. 1996. Pollen Morphology and Plant Taxonomy Angiosperms. New York: Hafner Publ Co.

Ferreres F, Blázquez MI, Gil FA, Tomas Barberán J. 1994. Analysis of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr. A 669: 268-274.

García Viguera FA, Tomas Barberán F. 1998. Study of Canadian Propolis by GC-MS and HPLC J Sci Food Agric. 77: 506-510.

Gheldof N, Wang X, Engeseth N. 2003. Buckweat honey increases serum antioxidant capacity in humans J. Agric Food Chem. 51: 1500-1505.

Gojmerac, WL. 1980. Bees, beekeeping, honey and pollination, Connecticut: AVI Publishing Company, INC.

Gomez Caravaca A, Gomez Romero M, Marraez Roman D, Segura Carretero A, Fernandez Gutierrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derives from bees, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: 1220-1234.

Gutiérrez MG, Rodríguez Malaver A, Vit P. 2008. Miel de abejas: una fuente de antioxidantes, Fuerza farmacéutica Año 12 Vol 1: 39-44

Lihu Yao, Niveditas Datta, Tomas Barberan F, Ferreres F, Martos I, Singanusong R. 2003. Flavonoids, Phenolic acids and abscisic acids in Australian and New Zeland *Leptospermum* honeys, Food Chemistry 81: 159-168.

Louveaux, J, MaurizioA, Vorwohl G. 1978. Methods of Melissopalynology, Bee World, 59: 139-157.

Markgraf V, D'antoni HL. 1978. Pollen Flora of Argentina. Tucson: The University of Arizona Press.

Martos I, Ferreres F, Tomás-Barberán FA. 2000a. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 1498 - 1502.

Martos I, Ferreres F, Yao LH, D'Arcy BR, Caffin N, Tomás-Barberán FA. 2000b. Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(10): 4744-4748.

Mato I, Suarez Luque S, Huidobro J, Simal Lozano. 2004. Fumaric acid as a posible discriminant parameter of geographical origin of honey samples. Deustche Lebensmittel Rundschau 100(12): 502-506.

Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and praline contents in honey Food Chem 91: 571-577.

Molan PC. 1995. The antibacterial properties of honey Chemistry in New Zealand, July, 10-14.

Molan, PC. 1996. Authenticity in honey, in PR Ashurst & MJ Dennis (ed.), Food authentication, London: Blackie Academic and Professional.

Molan PC, Russell KM. 1998. Non peroxide antibacterial activity in some New Zeland honeys. Journal of Apicultural Research 27: 62-67.

Muñoz O, Copaja S, Speisky H, Peña R, Montenegro G. 2007. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante, Quim. Nova 30 (4): 848-851.

Niño MF, Simonetti E. 2005. El análisis de datos desde una perspectiva integradora, Colección Cuadernos de Cátedra, Posadas: Editorial Universitaria de Misiones.

Norma IRAM 15929: 1994. Miel - Muestreo. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Norma IRAM 15941-2: 1997. Miel - Determinación del color Pfund. Buenos Aires: Instituto Argentino de Normalización.

Russell KM, Molan PC, Wilkins AL, Holland PT. 1990. Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. J. Agric. Food Chem. 38(1): 10-13.

Schram D, Karim M, Schrader H, Holt R, Cardetti M, Keen C. 2003. Honey whit high levels of antioxidant can provide protection to healthy human subject. J. Agric. Food Chem. 51: 1732-1735.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la República Argentina. Resolución 274/95. Tipificación por origen botánico (Modificación Res. SAGPyA Nº 1051/94), http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola (12/12/08).

Siess MH, Le Bon AM, Canivenec-Lavier MC, Amoit MJ, Sabatier S, Aubert SY, Suschetet M. 1996. Flavonoid of honey and propolis: characterisation and effects on hepatic drug metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. J. Agric. Food Chem. 40(8): 2297-2301.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. 1999. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Somal NA, Coley KE, Molan PC, Hancock BM. 1994. Suceptibility of Helicobacter pylori to the antibacterial activity of manuka honey. Journal of the Royal Society of Medicine 87: 9-12.

Sosa Martínez R, Tenori Borroto E, Marrero Chang O, Aguila Gimenez E, Camacho Bordon S, Morales Montero A. 2009. Determinación de compuetsos fenólicos, metales y su efecto sobre el potencial antioxidante y tóxico en mieles procedentes de Apis mellifera, Actas del 3° Congreso Cubano de Apicultura, La Habana, Cuba, 9 al 13 de marzo.

Tomás-Barberán FA, Tomás-Lorente F, Ferreres F, Garcia-Viguera C. 1989. Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee pollen. J. Sci. Food Agric. 47: 337-340.

Tomás Barberán FA, Ferreres F, Blazquez MA, García Viguera C, Tomas Lorente, F. 1993. High performance liquid chromatography of honey flavonoids, J. Chromatography 634: 41-46.

Tomas Barberan FA, Martos I, Ferreres F, Radovic BS, Anklam E. 2001. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81: 485-96.

Vivar Quintana A, Baldi Coronel B, Sanchez Sanchez J, Santos Buelga C. 1999. Composición fenólica en mieles monoflorales de distinto origen. Alimentaria 276: 93-99.

Von Der Ohe W, Persano Oddo L, Piana ML, Morlot M, Martin P. 2004. Harmonized Methods of melissopalynology, Apidologie 35: S18-S25.

Weston RJ, Mitchell KR, Allen KL. 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. Food Chemistry, 64(3): 295-301.

Weston RJ, Brocklebank LK, Lu Y. 2000. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. Food Chemistry, 70(4): 427-435.

Williams R, Spencer, Rice Evans C. 2004, Flavonoids antioxidants or signalling molecules? Free Rad. Biol. Med. 36: 838-849.

Winston M.L. 1987. The Biology of the Honey Bee. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.