



INVESTIGACIONES Y
AVANCES EN
INGENIERÍA DE LOS
ALIMENTOS

Investigaciones y avances en ingeniería de los alimentos : trabajos completos del V CICYTAC 2014 / Cecilia Penci ... [et al.] ; compilado por Romina Cabrera ... [et al.] ; coordinación general de Victoria Rosati ; editado por Cecilia Penci ... [et al.]. - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico . Secretaría de Ciencia y Tecnología, 2015. Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-4020-00-0

I. Ingeniería Alimentaria. I. Penci, Cecilia II. Cabrera, Romina, comp. III. Rosati, Victoria , coord. IV. Penci, Cecilia, ed.
CDD 664

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



EDITORES

Cecilia Penci. (Universidad Nacional de Córdoba (UNC), ICYTAC, UNC-CONICET, Argentina)

Pablo P., Ribotta. (ISIDSA, ICYTAC, UNC-CONICET, Córdoba, Argentina)

Alfonsina Andreatta. (Universidad Tecnológica Nacional, San Francisco, Argentina)

Marcelo Rosmini. (Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba y Departamento de

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral).

PROLOGO

El término innovación refiere a aquel cambio que introduce alguna novedad o varias. Cuando alguien innova aplica nuevas ideas, productos, conceptos, servicios y prácticas a una determinada cuestión, actividad o negocio, con la intención de ser útiles para el incremento de la productividad. La innovación en la industria de alimentos está dirigida a acrecentar la eficiencia de los métodos de producción, ampliar y asegurar las fuentes de materias primas e ingredientes, mejorar las propiedades nutricionales de los alimentos procesados y hacerlos más apetecibles, extender el período en que los alimentos permanecen sin cambios perceptibles en sus propiedades, incrementar la variedad de alimentos y con ello las posibilidades de dietas equilibradas nutricionalmente, desarrollar nuevos ingredientes y nuevos materiales para envases, incrementar la sustentabilidad de los procesos de producción y de los materiales que se utilizan. La vinculación del sector productivo y los grupos de investigación que pueden aportar en estas áreas fue uno de los principales objetivos de la V edición de Congreso Internacional Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Con la intención de promover esta vinculación, resulta trascendente reunir en forma sistematizada parte de las ponencias que se presentaron en este evento científico. El presente volumen condensa los trabajos de los investigadores que aceptaron la invitación para publicar sus avances científicos en las áreas de ingeniería y tecnología de los alimentos. Esperamos que este libro constituya una referencia actual y sea útil para aquellas personas involucradas en el estudio y en la aplicación de conocimientos para atender las nuevas demandas en la producción de alimentos.

EGG WHITE NANOCARRIERS FOR FOLIC ACID: STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND PROFILE OF IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION PRODUCTS

Arzeni C., Pérez O. E., Pilosof A. M. R.

CONICET – Universidad de Buenos Aires
carzeni@di.fcen.uba.ar

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar los productos de la digestión de los *nanocarriers* y las consecuencias del complejamiento de la vitamina con las nanopartículas de EW. La topografía de las nanopartículas (US) y de los *nanocarriers* de AF (USF) se caracterizó por microscopía de fuerza atómica (AFM). Luego, se procedió a realizar la digestión gastrointestinal *in vitro* de las muestras. Las soluciones finales de las muestras digeridas fueron liofilizadas. Finalmente, se empleó cromatografía de alta resolución en fase reversa para determinar el patrón de digestión de las distintas muestras resuspendidas en agua bidestilada y filtradas. La topografía observada de los *nanocarriers* no arrojó diferencias notorias respecto a la de las nanopartículas de EW sin AF unido. El protocolo de digestión seguido fue adecuado para emular el grado de proteólisis gastrointestinal. El perfil de péptidos obtenidos de la digestión *in vitro* manifestó diferencias aparentes entre las muestras de *nanocarriers* de AF y las nanopartículas. El AF no se vería negativamente influenciado por la asociación con nanopartículas de EW. Los *nanocarriers* constituirían un

sistema adecuado para la preservación, transporte y delivery sitio dirigido de este bioactivo.

Palabras Clave: nanopartículas, clara de huevo, ácido fólico, digestión, péptidos

Abstract: The objective of this work was to evaluate the *nanocarriers* digestion products and the consequences of the formation of complexes between the vitamin and EW nanoparticles. The topography of the nanoparticles (US) and the *nanocarriers* of FA (USF) were characterized by atomic force microscopy (AFM). Then, an *in vitro* gastrointestinal digestion of the samples was performed. The final solutions of the digested samples were freeze-dried. Finally, the pattern of digestion of the samples, resuspended in double distilled water and filtered, was determined by high performance liquid chromatography. The topography of the *nanocarriers* did not show any differences in comparison to the EW nanoparticles without FA. The digestion protocol was adequate to emulate the degree of gastrointestinal proteolysis. The obtained peptides profile showed apparent differences between FA *nanocarriers* and nanoparticles samples. FA would not be negatively influenced by its association with EW nanoparticles. These *nanocarriers* would constitute an adequate system for the preservation, transport and target delivery of this bioactive.

Keywords: nanoparticles, egg white, folic acid, digestion, peptides

INTRODUCTION

The design of food grade nanocarriers for the delivery of bioactives must be done so that they are able to deliver bioactive components to specific sites within the consumer's body. Food proteins can be used to prepare a wide range of matrices and multicomponent matrices in the form of hydrogel, micro- or nanoparticles, all of which can be tailored for specific applications in the development of innovative functional food products. The ability to control the particle size of proteinaceous materials is of primary importance not only for determining food product properties such as taste, aroma, texture, and appearance, but also for determining the release rates of the carried bioactive compounds and ultimately how much is absorbed into the body and hence the overall efficacy of the compounds (Chen *et al.* 2006). High intensity ultrasound (HIUS) technology has been proved to be effective in controlling particle size of different biopolymers (Ashokkumar *et al.* 2009; Chen *et al.* 1997; Gordon y Pilosof 2010; Tang *et al.* 2009). By controlling the conditions used for the sonication treatment, i.e. temperature and time of processing, as well as pH conditions, it is possible to control particle size of egg white (EW). On the other hand, folic acid (FA), an important B-group vitamin, participates in many metabolic pathways such as DNA and RNA biosynthesis and amino acid interconversions. It is involved in essential functions of cell metabolism such as DNA replication, repair and methylation and synthesis of nucleotides, amino acids, and some vitamins. Mammalian cells cannot synthesize folate; therefore, an exogenous supply of this vitamin is necessary to

prevent nutritional deficiency (Iyer y Tomar 2009). However, FA is unstable to heating and light exposure, especially at acid pH. Therefore, the formation of complexes with proteins might enhance its stability during food manufacturing processes where the vitamin is incorporated or during its passage through the gastrointestinal tract (de Jong *et al.* 2005; Liang *et al.* 2013; Swiatlo *et al.* 1990; Verwei *et al.* 2003). In this regard, the careful analysis of the interaction between FA and proteins before and after digestion and the pattern of digestion of the complexes could be a great aid in understanding potential differences in bioaccessibility and bioavailability of FA ingested in the form of a protein-vitamin complex. For that purpose, the characterization of the peptides profile and the verification of FA integrity after digestion are necessary.

The objective of this work was to evaluate the nanocarriers digestion products and the consequences of the formation of complexes between the vitamin and EW nanoparticles.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of EW and FA solutions

EW powder gently provided by Ovoprot International S.A. (Buenos Aires, Argentina) was used as starting material. Solutions at 5% w/w were prepared with double distilled water. Solutions were centrifuged for 1 h at 12,857 x g and 20 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Germany). The supernatant was used for the determinations and the pH was adjusted to 3 with 1N HCl.

FA powder (DSM Nutritional Products Argentina S.A., purity: 99.5%, dry basis) was kindly provided by Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). FA solutions at 1% w/w were prepared daily for the experiments. The pH was adjusted to 7

with 1N NaOH (for mixtures) or to 3 with 1N HCl (control). The solutions were covered with aluminum foil to prevent from light exposure.

Design of EW nanoparticles

EW solutions were sonicated for 20 min using an ultrasonic processor Vibra Cell Sonics, model VCX 750 (Newtown, Connecticut, USA) at a frequency of 20 kHz and an amplitude of 20% (maximum amplitude 40%, 228 μm). A cooling bath at 0.5 °C was used to remove the heat released during the sonication process. The acoustic power dissipated in the liquid was 4.27 ± 0.71 W, determined by a calorimetric method according to a previous work (Arzeni *et al.* 2012).

Generation of EW nanocarriers for FA

An aliquot of 100 μl of FA solution was added to 4 ml of EW nanoparticles with continuous stirring for 5 min. The ratio of FA:EW nanoparticles was 1:200. The mixtures were covered with aluminum foil and prepared daily for each experiment.

Atomic force microscopy (AFM)

An aliquot of 5 μl of sample, diluted at $1/10^6$ in double distilled water, was adsorbed to a freshly cleaved mica surface (glued to steel disks), allowed to incubate at ambient temperature, then gently washed with Milli-Q water, and dried under a gentle stream of filtered dry nitrogen. AFM imaging was performed in tapping mode on a Veeco-Digital Instruments microscope, model Multimode (MMAFM) NanoScope IIIa-Quadrex. Images were processed with

NanoScope software (Horcas *et al.* 2007) by applying flattening to remove background slope. The dimensions of the nanoparticles structures were quantified, using section analysis in terms of the vertical height and horizontal diameter. The vertical height corresponds to the maximum vertical distance measured from the top of the protein surface to the neighboring mica. The horizontal diameter corresponds to the measured diameter of the protein structure at half the vertical height. This measurement has been used to describe the lateral dimension of the protein structure, rather than the horizontal diameter at zero vertical height, to minimize the influence of tip induced broadening (Najbar *et al.* 2003; Villarrubia 1997).

***In vitro* gastrointestinal digestion protocol**

This was performed according to Moreno *et al.* (2005) with some modifications. An aliquot of 5 ml of samples was dissolved in 4 ml of a simulated gastric fluid (SGF, 0.15M NaCl, pH 2.5). The pH was adjusted to 2.5 with 1M HCl, if necessary. A solution of pepsin (P7000, 182 U/mg of protein) dissolved in 1 ml of SGF was added. The mixture was incubated at 37 °C for 2 h with continuous stirring. At the end of this stage, pH was adjusted to 7.0 with 1M NaHCO₃ to inactivate pepsin (maximum volume = 1 ml). If less volume was required, double distilled water was added until 1 ml was reached. Then, 3 ml of a simulated intestinal fluid (SIF, 39 mM K₂HPO₄, 150 mM NaCl y 30 mM CaCl₂, pH 7.0) was added. Next, 80 mg of bile salts (B3883) dissolved in 1 ml of SIF, trypsin (T8003, 34.5 U/mg of protein) and α -chymotrypsin (C4129, 0.44 U/mg of protein), each one dissolved in 0.5 ml double distilled water were incorporated. Samples were incubated at 37 °C for 2 h.

At the end of this stage, trypsin and α -chymotrypsin were inactivated in a water bath at 80 °C during 5 min. The digested solutions were then freeze-dried.

Reverse phase – High performance liquid chromatography (RP-HPLC)

FA, EW, nanocarriers and their corresponding hydrolysates were re-hydrated in double distilled water, filtered by a 0.45 μm membrane and analyzed in a Waters 1525 HPLC system (Waters, Milford, MA, USA) using a BioSuite™ pC18 500, 7 μm column (150 \times 4.6 mm, Waters, Milford, MA, USA), with a flow rate of 1 ml/min, an injection volume of 20 μl and the following mobile phase: solvent A, 0.37 ml/l TFA in double distilled water; solvent B, 0.27 ml/l TFA in HPLC grade ACN. A linear gradient of solvent B in A, from 0 to 65% in 50 min was used. Absorbance was recorded at 220 and 280 nm with a 2998 Photodiode Array detector (Waters, Milford, MA, USA). The software Breeze Waters was used.

RESULTS AND DISCUSSION

First, AFM was used with the purpose of characterizing the structure of the designed nanocarriers. EW nanoparticles (US) were found to be rounded and regular in shape and had approximately 14 nm of diameter (Figure 1.A), as well as the nanocarriers of FA (USF) (Figure 1.B). It is worth noting that, for AFM technique, the samples were measured in air after washing and drying them. Thus, not all the particles present in the solution might remain adsorbed to the mica surface, as upon washing a large fraction of protein is removed from the surface (Younes-Metzler *et al.* 2011).

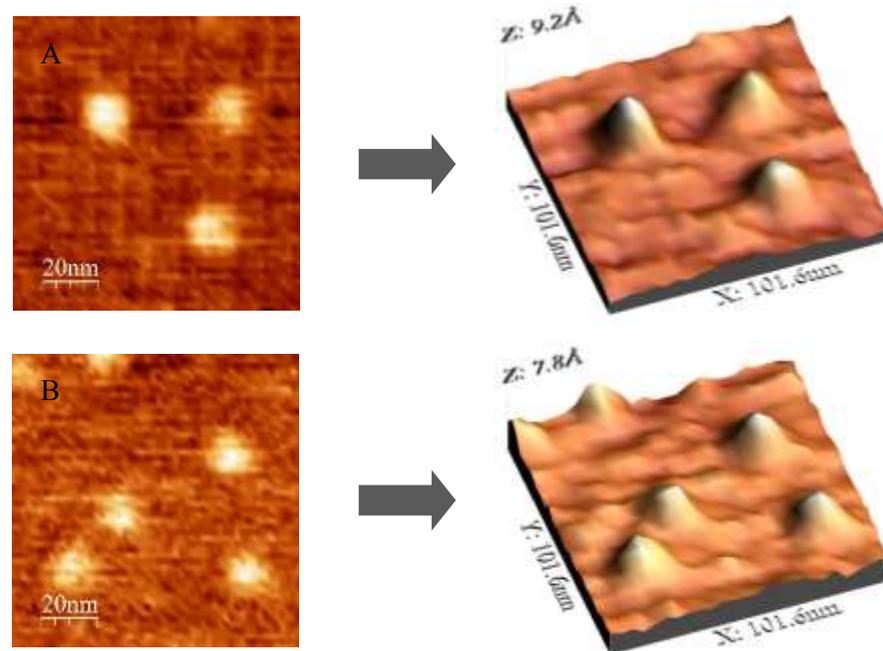


Figure 1: Images of atomic force microscopy of US (A) and USF (B) shown in 2D and 3D views.

Then, an *in vitro* digestion protocol was followed and the digested samples were separated by RP-HPLC. Figure 2 and 3 show the chromatograms for the samples before and after the digestion process, respectively, at 220 nm, in order to visualize proteins and peptides, and at 280 nm, for better appreciation of the FA peak, avoiding the interference of peptides that elute at the same time zone.

The three main peaks that were present in US sample recorded at 220 nm (Figure 2.A), identified as OM, LZ and OVA, correspond to ovomucoid, lysozyme and ovalbumin, in accordance with the peaks identified for EW in a previous

research (Martos *et al.* 2013). OVA peak in USF sample was slightly lower than in US one. The intensity of the peak corresponding to FA was lower in USF samples, in comparison with FA alone, as can be better visualized in the chromatograms obtained at 280 nm (Figure 2.B). This could indicate an interaction between FA and EW nanoparticles in such a way that cannot be separated in the chromatographic conditions used in the present work. Other authors have reported the formation of complexes between FA and different proteins. For example, Liang y Subirade (2002) found, by fluorescence spectroscopy, that FA could be bound to β -lactoglobulin and that the complexation reduced FA photodegradation. In another work, Jha y Kishore (2011) found, by isothermal titration calorimetry in combination with fluorescence and circular dichroism spectroscopies, that bovine serum albumin could effectively bind FA and that the binding was dominated by electrostatic interactions with a contribution of hydrogen bonding and hydrophobic interactions.

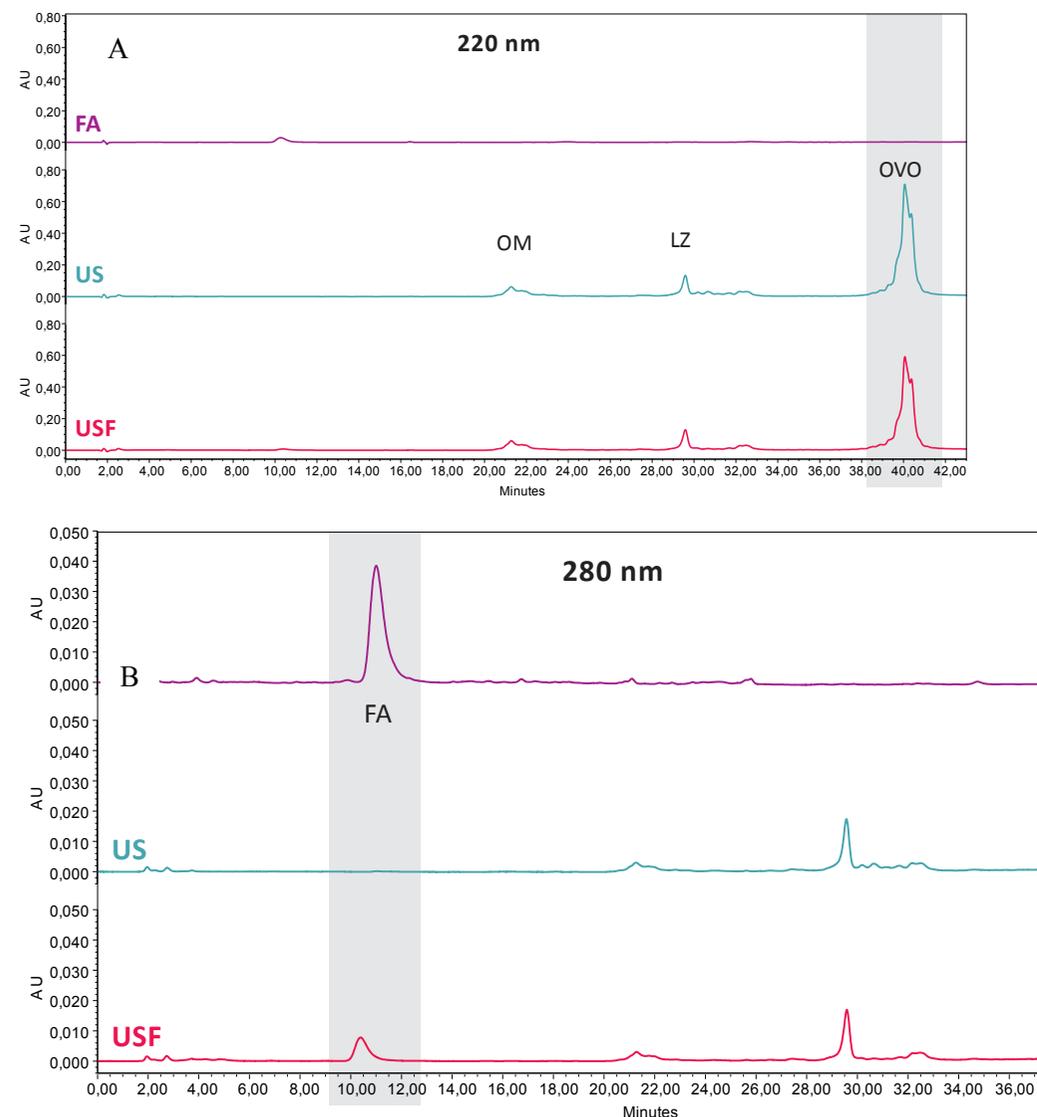


Figure 2: RP-HPLC chromatograms of FA, US and USF samples recorded at 220 nm (A) and 280 nm (B).

Figure 3.A shows the chromatograms of digested samples recorded at 220 nm. Intact OVA was found in US samples, indicating that this protein was only partially digested *in vitro*. Regarding this, there are examples in the literature which report resistance of OVA to digestive enzymes (Martos, *et al.* 2013; Suslick 1990; Tatsumi y Hirose 1997). On the other hand, the intensity of OVA peak in USF digested sample was lower than the corresponding to US sample, at 220 nm, which could indicate that FA enhances OVA degradation by the digestive enzymes. This change in OVA digestibility might be related to a different conformation that the protein would adopt when interacting with FA. Other studies reported that the stability of proteins to digestion may be altered in the presence of various components of the food matrix, such as soluble polysaccharides (Lepoint y Lepoint-Mullie 1998), lipids (Henglein 1993) or protease inhibitors (Riesz 1991). The peaks corresponding to OM and LZ were not observed in the digested samples, suggesting that their proteolysis was complete and no differences were found between digested US and USF samples. On the other hand, at 280 nm, it can be clearly observed that the intensity of FA was the same for USF and FA samples (Figure 3.B). This could indicate that the vitamin was released from the nanocarriers at the end of the gastrointestinal digestion, leaving FA bioaccessible for enterocytes cells.

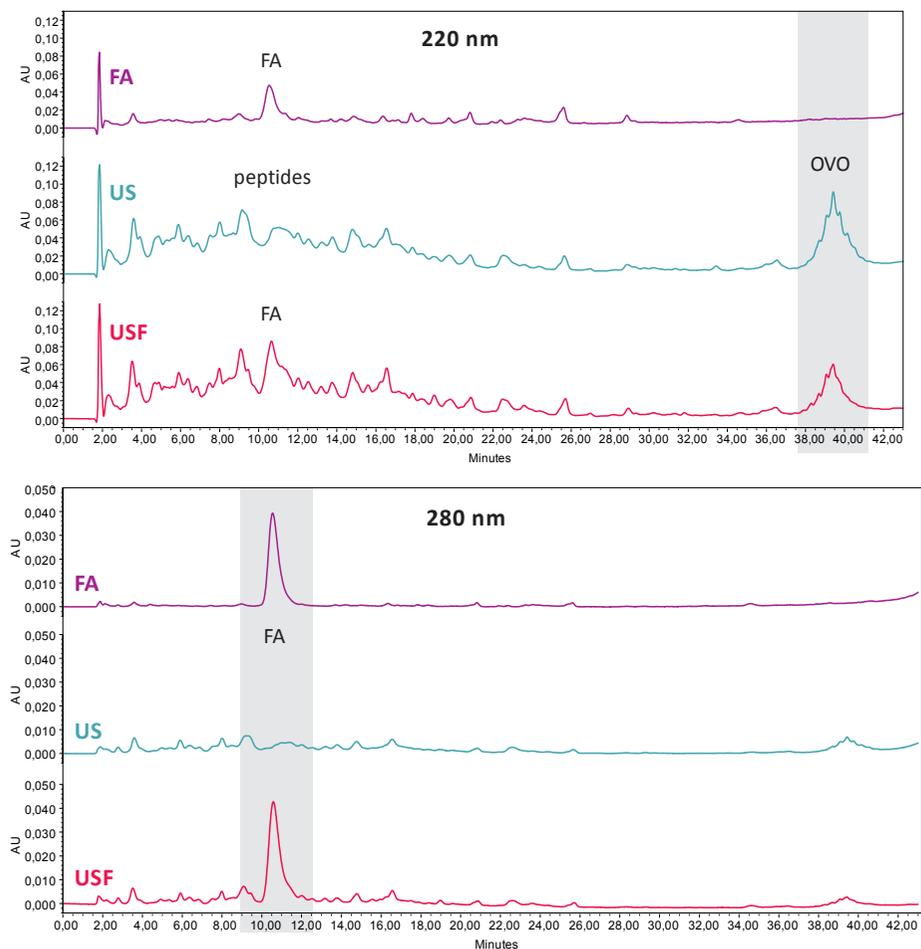


Figure 3: RP-HPLC chromatograms of digested FA, US and USF samples recorded at 220 nm (A) and 280 nm (B).

CONCLUSIONS

The interaction of FA with EW nanoparticles was proved to occur at pH 3. The release of FA from the nanocarriers after the *in vitro* gastrointestinal digestion of the samples is an indication that FA would be bioaccessible in the site of absorption. Binding of FA to EW nanoparticles also proved to be beneficial for the degradation of digestion-resistant EW proteins. EW nanocarriers would constitute an adequate system for the preservation, transport and target delivery of FA.

BIBLIOGRAPHY

- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108: 463-472.
- Ashokkumar, M., Lee, J., Zisu, B., Bhaskarcharya, R., Palmer, M., & Kentish, S. (2009). Hot topic: sonication increases the heat stability of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 92: 5353-5356.
- Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 272-283.
- Chen, R. H., Chang, J. R., & Shyur, J. S. (1997). Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydrate Research*, 299: 287-294.
- de Jong, R. J., Verwei, M., West, C. E., van Vliet, T., Siebelink, E., van den Berg, H., & Castenmiller, J. J. M. (2005). Bioavailability of folic acid from fortified pasteurised and UHT-treated milk in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59: 906-913.
- Gordon, L., & Pilosof, A. (2010). Application of high intensity ultrasounds to control the size of whey proteins particles. *Food Biophysics*, 5: 203-210.
- Henglein, A. (1993). Contribution to various aspects of cavitation chemistry. En: T. J. Mason. *Advances in Sonochemistry*. London, UK and Greenwich, CT: JAI Press. 17-83.
- Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J. M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., & Baro, A. M. (2007). WSXM: A software for

- scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Review of Scientific Instruments*, 78: -.
- Iyer, R., & Tomar, S. K. (2009). Folate: A functional food constituent. *Journal of Food Science*, 74: R114-R122.
- Jha, N. S., & Kishore, N. (2011). Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 43: 814-821.
- Lepoint, T., & Lepoint-Mullie, F. (1998). Theoretical bases. En: J. L. Luche. *Synthetic Organic Sonochemistry*. New York: Plenum. 1-49.
- Liang, L., & Subirade, M. (2002). Study of the acid and thermal stability of α -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. *Food Chemistry*, 132: 2023-2029.
- Liang, L., Zhang, J., Zhou, P., & Subirade, M. (2013). Protective effect of ligand-binding proteins against folic acid loss due to photodecomposition. *Food Chemistry*.
- Martos, G., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2013). Immunoreactivity of hen egg allergens: Influence on in vitro gastrointestinal digestion of the presence of other egg white proteins and of egg yolk. *Food Chemistry*, 136: 775-781.
- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., & Mills, E. N. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal*, 272: 341-352.
- Najbar, L. V., Considine, R. F., & Drummond, C. J. (2003). Heat-induced aggregation of a globular egg-white protein in aqueous solution: Investigation by atomic force microscope imaging and surface force mapping modalities. *Langmuir*, 19: 2880-2887.
- Riesz, P. (1991). Free radical generation by ultrasound in aqueous solutions of volatile and non-volatile solutes. En: T. J. Mason. *Advances in Sonochemistry*. London, UK and Greenwich, CT: JAI Press. 23-64.
- Suslick, K. S. (1990). *Sonochemistry*. *Science*, 247: 1439-1445.
- Swiatlo, N., O'Connor, D. L., Andrews, J., & Picciano, M. F. (1990). Relative folate bioavailability from diets containing human, bovine and goat milk. *Journal of Nutrition*, 120: 172-177.
- Tang, C.-H., Wang, X.-Y., Yang, X.-Q., & Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92: 432-437.
- Tatsumi, E., & Hirose, M. (1997). Highly Ordered Molten Globule—Like State of Ovalbumin at Acidic pH: Native-Like Fragmentation by Protease and Selective Modification of Cys367 with Dithiodipyridine. *Journal of Biochemistry*, 122: 300-308.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft, C., & Schaafsma, G. (2003). Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of nutrition*, 133: 2377-2383.
- Villarrubia, J. S. (1997). Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimations. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 102: 425-454.
- Younes-Metzler, O., Ben, R. N., & Giorgi, J. B. (2011). The adsorption of antifreeze glycoprotein fraction 8 on dry and wet mica. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82: 134-140.

SECADO DE FRUTAS DE *DYOSPIROS KAKI* VAR. FUYU

Borsini, A.A.¹; Albani, O.A.²; Ramallo L.A.²

1: IMAM-CONICET-UNaM, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina.

2: Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales-UNaM, Félix de Azara 1552, Posadas, Misiones, Argentina
arielborsini@gmail.com

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes condiciones de deshidratación sobre la cinética de pérdida de agua y los cambios de color de frutas de *Dyospiros kaki* var Fuyu. Las condiciones de operación fueron: i) Secado con flujo de aire caliente a velocidad y temperatura (45, 60 y 75 °C) constantes (SAC), ii) Secado intermitente alternando periodos de 45 min SAC/ 45 min reposo (SAC INT), a 45, 60 y 75 °C y, iii) SAC a 60 °C luego de un proceso de deshidratación osmótica en solución de sacarosa a 50 y 60 °Brix (DO+SAC). La ecuación de Page fue utilizado para describir la pérdida de agua durante el secado. Los valores del parámetro n no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los diferentes procesos a 45°C y a 60 °C. Los valores de k se incrementaron con la temperatura para los ensayos SAC y SAC INT y no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de k de SAC y de DO+SAC. Los parámetros del color L^* y b^* disminuyeron durante el secado, mientras que a^* se mantuvo constante. La diferencia de color ΔE fue mayor a 75°C y no fue afectada por la aplicación de intermitencia (SAC INT).

Palabras claves: Secado, kaki, cinetica

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of different drying conditions on water loss kinetics and color changes of *Dyospiros kaki* var Fuyu fruits. Operating conditions were: i) drying with air flow at constant velocity and temperature (45, 60 and 75 °C) (SAC), ii) Intermittent Drying with alternating periods of 45 min SAC / 45 min rest (SAC INT), at 45, 60 and 75 °C, iii) SAC at 60 °C after osmotic dehydration process in sucrose solution of 50 and 60 °Brix (DO + SAC). To describe the water loss during drying fruit the Page equation was used. Values of n parameter were not significantly different ($p > 0.05$) for drying processes at 45 and 60 °C, nor for SAC INT and DO+SAC. k values increased with temperature for SAC and SAC INT and no significant difference ($p > 0.05$) between k values of SAC and DO+SAC. Color parameters L^* and b^* decreased during drying, while a^* remained constant. The color difference ΔE was highest at 75 °C and was not affected by the application of rest periods (INT SAC).

Keywords: Drying, Persimmon, Kinetic

INTRODUCCIÓN

El *Diospyros kaki* L. tiene un contenido relativamente alto de fibra alimentaria, compuestos fenólicos, minerales y oligoelementos (Gorinstein *et al* 2001). En general, existen dos tipos de fruta de caqui: astringente y no astringente; las astringentes no pueden ser ingeridas cuando están firmes debido a su alto contenido en taninos solubles. Las no astringentes no son libres en taninos, pero son mucho menos astringentes antes de la maduración; éstos pueden ser consumidos cuando están firmes (Jang *et al* 2011). En los últimos años ha habido una expansión de la producción de caqui en Australia, Nueva Zelanda y América del Sur (Collins y Tisdell 1995)

El secado en corriente de aire es un método tecnológicamente sencillo y relativamente económico cuyo principio básico es el de reducir el contenido de agua del alimento por evaporación superficial, aumentando así el tiempo de conservación y la vida de anaquel del producto, facilitando su transporte y almacenamiento (Park *et al* 2001). La deshidratación osmótica, es una técnica útil para la concentración de sólidos solubles en frutas y verduras, y consiste en la inmersión del alimento, entero o en trozos, en soluciones acuosas de azúcares o sales con alta presión osmótica. Esto da lugar a dos flujos en contra-corriente que fluyen simultáneamente: un flujo de agua importante del alimento a la solución y una transferencia simultánea de soluto de la solución al alimento (Rault-Wack 1994, Torreggiani 1993).

El secado intermitente es un proceso en el cual el calor es aplicado de manera discontinua con periodos o ciclos de reposo (Islam *et al* 2003, Jumah *et al* 2007), que ha sido ampliamente estudiado en la preservación diversos productos como arroz, banana, guayaba, papa, soja y trigo (Aquerreta *et al* 2007, Chua *et al* 2000, 2003, Cnossen *et al* 2003; Nishiyama *et al* 2006, Shei y Chen 2002, Thomkapanich *et al* 2007, Tuyen *et al* 2009).

Estudios en torno al secado de frutos y vegetales han determinado que es un proceso difícil de describir, debido a la complejidad de los fenómenos internos y externos que ocurren durante él. No obstante, en la literatura se encuentran varios métodos propuestos para analizar el secado en capa fina de productos alimenticios: modelos teóricos, semiteóricos y empíricos. El modelado de los procesos de secado es fundamental para la selección y optimización de los mismos. Sin embargo, las ecuaciones la transferencia de calor y masa requieren considerable conocimiento de cálculo numérico para su solución analítica (Simal *et al* 1997, Doymaz 2004, Simal *et al* 2005). Así, el modelo de Page (Ecuación 1) ha sido ampliamente utilizado para simular las curvas de secado peras (Park *et al* 2002), Papaya (El-Aouar *et al* 2003), Zanahoria (Doymaz 2004) y Kiwi (Simal *et al* 2005). En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de la aplicación de períodos de reposo o intermitencia durante el secado con aire a diferentes temperaturas, como así también el proceso combinado deshidratación osmótica-secado sobre la cinética de pérdida de agua y los cambios de color de frutas de *Dyospiros kaki* var Fuyu.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron frutas de *Diospyros kaki* var. *Fuyu* cultivadas en la provincia de Misiones, seleccionando frutos de tamaño y forma homogéneos (diámetro ≈ 71 mm). Además, se tomó como parámetro de selección el estado de maduración de las frutas la concentración de sólidos solubles y el color de las frutas ($15 \pm 1.5^\circ\text{Brix}$, $hue=56 \pm 4^\circ$). Estas frutas fueron extraídas de un lote de 60 muestras, pre-seleccionadas de un cultivo experimental del INTA Montecarlo (Montecarlo, Misiones); los ensayos fueron realizados por duplicado.

Para la deshidratación osmótica se utilizó sacarosa comercial (Alto Uruguay, San Javier, Misiones)

Deshidratación y Secado

Las frutas seleccionadas fueron lavadas con agua clorada, escurridas y cortadas transversalmente a su eje en placas semicirculares de 6 ± 0.5 mm de espesor y 70 ± 4 mm de diámetro medido con calibre digital.

La deshidratación osmótica de kaki se efectuó empleando solución de sacarosa de 50°Brix y 60°Brix , en un baño termostático (Dubnoff, Vicking, Argentina) a 40°C , con agitación continua (60 ciclos/minuto) durante 4 h, la relación masa del sólido/masa solución hipertónica fue mayor de 1:10 (p/p) para garantizar constancia en la concentración del jarabe durante el tratamiento. Estas muestras parcialmente deshidratadas/impregnadas posteriormente fueron sometidas a un secado continuo a 60°C (DO+SAC), durante 5 horas.

Las muestras fueron pesadas y secadas en las siguientes condiciones:

- Secado con flujo de aire caliente a velocidad constante a 45 , 60 y 75°C (SAC).
- Secado intermitente alternando periodos de 45 min SAC/ 45 min reposo a 45 , 60 y 75°C (SAC INT).
- Secado con flujo de aire caliente (60°C) a velocidad constante de muestras pre-tratadas osmóticamente con solución de sacarosa a 50 y 60°Brix - 40°C (DO+SAC).

El proceso de secado (SAC) se efectuó colocando las muestras de fruta, ubicadas sobre una bandeja perforada, en estufa con circulación forzada de aire (Dalvo, modelo Si343, Argentina), a velocidad (1.1 m/s) y temperaturas constantes (45°C , 60°C y 75°C). Durante el periodo de reposo las muestras se conservaron en un recipiente cerrado, de poliestireno expandido de 5 cm de espesor de pared, para minimizar las variaciones de temperatura.

Para cada experiencia de secado intermitente se realizó en paralelo y de manera simultánea, a partir de muestras de la misma fruta, una experiencia de secado continuo.

Para comparar las curvas de secado continuo e intermitente se utilizó el tiempo efectivo de secado o tiempo de aplicación de calor, suprimiendo el tiempo de reposo. Se cuantificó la humedad de la fruta al inicio (fruta fresca) y al finalizar el proceso de secado por el método gravimétrico (48 h en estufa a 75°C , hasta pesada constante). Los resultados se registraron en g de agua por 100 g de materia seca (g/100 g ms). Se determinó la humedad de equilibrio de las frutas a cada temperatura (72 h de SAC a temperatura constante). Para determinar las diferencias. Los resultados fueron analizados a partir de ANOVA, utilizando el método LSD (mínimas diferencias significativas) como método de comparaciones

múltiples, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0.05$). El análisis de varianza fue realizado con el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

Modelos Matemáticos

Las curvas de secado obtenidas experimentalmente fueron modeladas utilizándose el modelo de Page, desarrollado por Page (1949), este modelo fue desarrollado para explicar la pérdida de agua durante el secado de un material en capa fina (Ecuación 1):

$$MR = \frac{W - W_e}{W_0 - W_e} = \exp(-kt^n) \quad (1)$$

Donde W es el contenido de humedad al tiempo t , W_0 el contenido de humedad al tiempo $t=0$ y W_e el contenido de humedad de equilibrio. Los valores de k y n fueron determinados por la técnica de regresión lineal.

Color

Las coordenadas cromáticas fueron medidas con un colorímetro MiniScan EZ Hunterlab (Hunter Associates Laboratory, Inc.) determinándose el color tanto de muestras frescas como secas, utilizándose el sistema CIEL*a*b* (Mendoza *et al* 2006), las medidas se realizaron por duplicado. Para cuantificar los cambios globales de color se utilizó el ΔE (Ecuación 2), que indica cuanta diferencia hay entre los colores de dos muestras.

$$\Delta E = \sqrt{(L_0 - L^*)^2 + (a_0 - a^*)^2 + (b_0 - b^*)^2} \quad (2)$$

RESULTADOS Y DISCUSION

Características de secado

El valor medio de humedad de la fruta fresca fue de 434 ± 56 g / 100 g ms, los valores de humedad para las muestras después del SAC a 45, 60 y 75°C fueron: $65,1 \pm 10$; $49,8 \pm 27,2$ y $11,8 \pm 3,2$ g / 100 g ms, respectivamente. Aquellas deshidratadas mediante SAC INT no mostraron diferencias significativas con las anteriores, siendo los valores de humedad registrados al final de 5 h de secado efectivo: $88,4 \pm 21,1$; $68 \pm 34,1$ y $9,7 \pm 1,3$ g / 100 g ms a las mismas temperaturas. Los valores de humedad de muestras tratadas con DO+SAC a 60°C alcanzaron una humedad final de $21,7 \pm 2,3$ y $19,7 \pm 7,6$ g / 100 g ms a 50 y 60 °Brix respectivamente.

La Figura 1 muestra las curvas de secado de kaki durante el secado continuo y el secado intermitente en la condición 45/45 a 45 °C. En esta figura se observa que, a 45°C, la aplicación de periodos de intermitencia tiene efecto favorable sobre la velocidad de secado, en el periodo de 50 a 230 min, y consecuentemente disminuye el tiempo necesario para alcanzar un determinado valor de humedad.

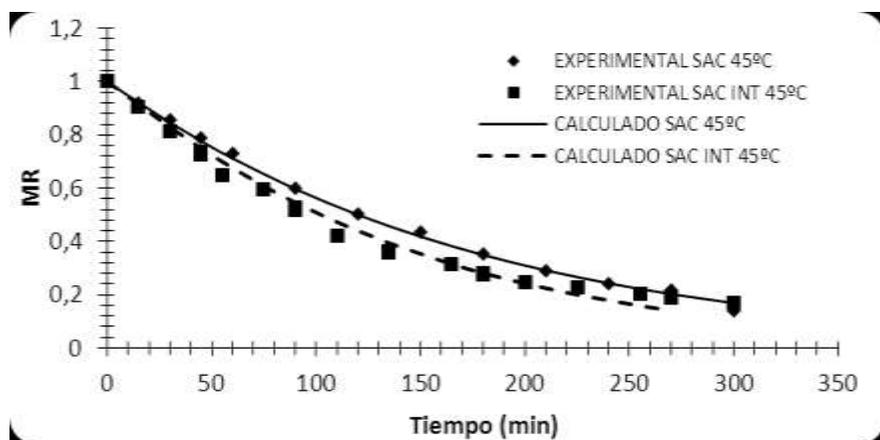


Figura 1 Curvas de secado continuo SAC e intermitente SAC INT 45/45 a 45 °C

En los ensayos a 60°C y 75°C no se observaron diferencias en la aplicación de periodos de intermitencia en relación al secado continuo (figuras 2 y 3),

Se puede observar que la cinética de pérdida de agua del SAC INT presenta poco beneficio como alternativa al secado continuo para frutas de *Diospyros kaki var. Fuyu*, aunque numerosas publicaciones indican resultados diferentes para otros productos. Ramallo *et al* 2010 encontraron que la aplicación de periodos de intermitencia tiene efecto favorable sobre la velocidad de secado en Yerba Mate. Aquerreta *et al* 2007 estudiaron el efecto de la intermitencia en arroz.

La figura 4 muestra las curvas de secado de kaki durante el secado continuo de muestras previamente deshidratadas osmóticamente a dos concentraciones de sacarosa (50 y 60 °Brix), no se observaron diferencias significativas entre éstos tratamientos.

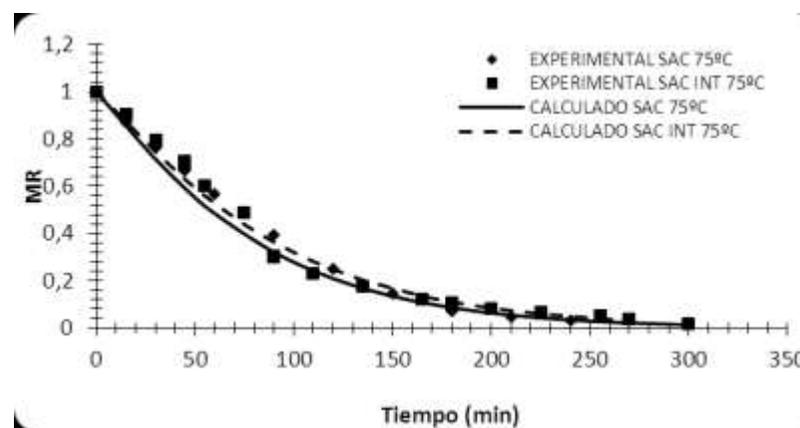
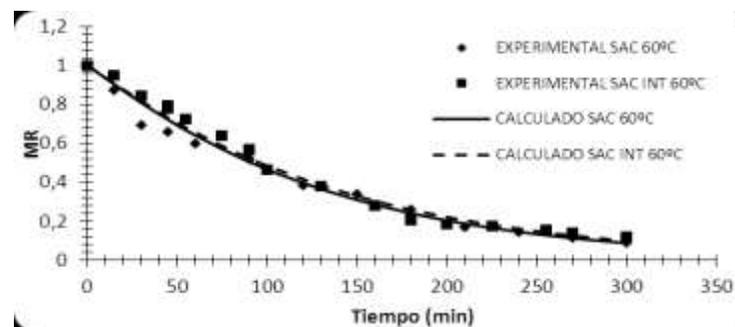


Figura 2 Curvas de secado continuo SAC e intermitente SAC INT 45/45 a 60 °C

Figura 3 Curvas de secado continuo SAC e intermitente SAC INT 45/45 a 75 °C



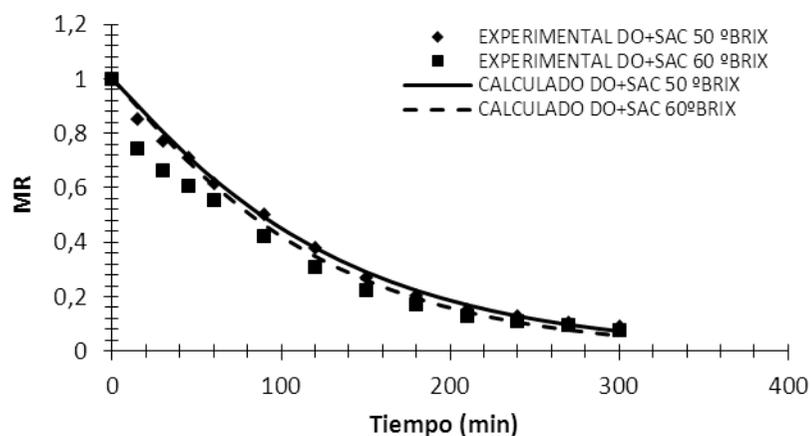


Figura 4 Curvas de secado continuo de muestras previamente deshidratadas osmóticamente (DO+SAC)

En la Tabla 1 se muestran los valores de humedad de equilibrio para SAC, SAC INT y DO+SAC a 45°C, 60°C y 75°C. No se observaron diferencias significativas en los valores de humedad de equilibrio para fruta con diferentes procesos de secado a la misma temperatura, excepto en las muestras previamente impregnadas con solución de sacarosa de 60°Brix. Como era de esperar, la temperatura del proceso afectó significativamente ($p < 0,05$) los valores de humedad de equilibrio.

Tabla 1 Humedades de Equilibrio a distintos tratamientos y distintas temperaturas

T(°C)	Tratamiento	X_{eq} (g/100g ms)**
45	SAC	8,73±0,21 a

	SAC INT	8,25±0,63 a
	SAC	4,01±0,49 b
60	SAC INT	3,62±0,88 b
	DO50°BRIX +SAC	3,95±0,25 b
	DO60°BRIX +SAC	5,07±0,54 c
75	SAC	1,99±0,20 d
	SAC INT	2,23±0,29 d

*Letras diferentes en los valores de X_{eq} señalan diferencia significativa a un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$). ** Cada valor es el promedio \pm la Desviación Standard de los resultados obtenidos

Modelo Matemático

Se utilizó el modelo de Page para describir la pérdida de agua de láminas de fruta de kaki en función del tiempo de secado. En la Tabla 2 se muestran los valores de los parámetros del modelo de Page, resultantes del ajuste de los datos experimentales de secado a la Ec 1. En todos los casos se obtuvieron valores de R^2 superiores a 96%. En las figuras 1, 2, 3 y 4 se presentan los datos experimentales y los calculados mediante la Ecuación 1, en concordancia con el estudio de Doymaz (2012), donde el modelo de Page presenta un buen ajuste para muestras de kaki sometidas a secado por convección.

Los valores del parámetro n de la ecuación de Page no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para las condiciones SAC de 45 y 60 °C con un valor medio de $1,07 \pm 0,03$; por otra parte para el SAC a 75°C el valor resultante de n fue $1,1 \pm 0,02$. Como se puede apreciar en la Tabla 2, la aplicación de tiempos de reposo o intermitencia no afecta significativamente los valores del parámetro n . Igual comportamiento se observa en las muestras de kaki con

deshidratación/impregnación en solución de sacarosa previo al secado con aire.

El parámetro k puede ser considerado como una medida de la velocidad de pérdida de humedad cuando se comparan experiencias con idénticos valores de n . Así, los valores del parámetro k se incrementaron con la temperatura para los ensayos SAC y SAC INT. En cuanto a ensayos de DO+SAC no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) en los valores de k durante el SAC a 60°C de muestras pre-deshidratadas a 50 y 60°Brix. Los valores del Error Promedio Porcentual (EPP) de la estimación variaron desde 3,5 hasta 14,5%. Pese a que el ajuste del modelo de Page es satisfactorio, se observa una aparente disminución del grado de ajuste conforme se incrementa la temperatura de operación (disminución de R^2 y aumento del EPP), este resultado concuerda con el estudio de Puente *et al* (2010) en el secado de manzana con previo tratamiento osmótico.

Tabla 2 Parámetros de la ecuación de Page y parámetros estadístico

T (°C)	Tratamiento	k^*	n	EPP
45	SAC	0,004±0,0006	1,07	3,5
	SAC INT	0,005±0,001	1,07	7,6
60	SAC	0,006±0,001	1,07	7,2
	SAC INT	0,0055±0,001	1,07	8,7
	DO50°BRX +SAC	0,006±0,0004	1,07	6,2
	DO60°BRX +SAC	0,006±0,0001	1,07	7,9
75	SAC	0,008±0,0006	1,1	14,5

SAC INT	0,007±0,0007	1,1	11,5
---------	--------------	-----	------

***Cada valor es el promedio ± la Desviación Standard de los resultados obtenidos**

Al aplicar el modelo de Page se observó una dependencia de k con la temperatura, mientras que n se mantuvo constante con valores de medio de 1,07±0,03 para tratamientos a 45°C y 60°C; y de 1,1±0,02 para tratamientos a 75 °C.

Color

Los parámetros del color L^* y b^* disminuyeron significativamente durante el secado, mientras que a^* se mantuvo prácticamente constante, excepto en los procesos a 75°C . Hubo mayores cambios en el parámetro b^* para tratamientos a 75°C y ensayos de DO+SAC a 60°C; respecto a los resultados de los procesos combinados DO+SAC puede observarse en la Tabla 3 que los cambios más importantes del parámetro b^* se produjeron en la etapa de DO. La diferencia de color ΔE se incrementó con la temperatura de secado y no fue afectada por la aplicación de intermitencia (SAC INT). En la Tabla 3 se muestran los valores medios de los cambios de los parámetros instrumentales del color para cada condición de secado.

Tabla 3 Valores medios de los cambios en los parámetros instrumentales del color por efecto de los diferentes procesos de deshidratación de fruta de kaki

Tratamiento	T (°C)	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE
SAC	45	9,9	0,4	1,5	10,09
SAC INT		9	0,1	2,2	9,33
SAC		8,9	0,5	3,2	9,40
SAC INT		7,3	0,6	3,9	8,31
DO50°BRIX +SAC	60	8	0,9	28,3	10,98
DO60°BRIX +SAC		8,2	0,4	13,5	10,81
SAC	75	3,6	5,5	15,1	16,5
SAC INT		4,1	3	19,6	20,29
DO 50°BRIX		2,4	0,1	19	9,61
DO 60 °BRIX	40	1,4	0,1	18,1	8,35

CONCLUSIONES

La aplicación de periodos de intermitencia o reposo durante el secado a 45 °C de láminas de frutas de *Diospyros kaki* var. *Fuyu* tiene efecto favorable sobre la velocidad de secado en el periodo de 50 a 230 min, pero no afectó la cinética de pérdida de agua a 60°C y 75° C. El modelo de Page describió satisfactoriamente la cinética de secado de frutas de *Diospyros kaki*, no hubo diferencias significativas en los valores de n para SAC a 45° C y 60° C; los valores de n se incrementaron en el secado a 75°C. Los valores de k se incrementaron con la temperatura del proceso.

Los parámetros del color L^* y b^* disminuyeron significativamente durante el secado. La diferencia de color ΔE mostró un marcado incremento a 75°C y no fue afectada por la aplicación de intermitencia (SAC INT).

BIBLIOGRAFÍA

- Aquerreta J, Iguaz A, Arroqui C, Vírseda P. 2007. Effect of high temperature intermittent drying and tempering on rough rice quality. *Journal of Food Engineering*, 80:611-618.
- Chua KJ, Mujumdar AS, Chou SK, Hawlader MNA, Ho JC. 2000. Convective drying of banana, guava and potato pieces: Effect of cyclical variations of air temperature on drying kinetics and color change. *Drying Technology*, 18(4-5): 907- 936.
- Chua KJ, Mujumdar AS, Chou SK. 2003. Intermittent drying of bioproducts - an overview. *Bioresource Technology*, 90: 285-295.
- Cnossen AG, Jimenez M.J, Siebenmorgen TJ. 2003. Rice fissuring response to high drying and tempering temperatures. *Journal of Food Engineering*, 59(1): 61-69.
- Collins RJ, Tisdell JS. 1995. The influence of storage time and temperature on chilling injury in Fuyu and Suruga persimmon (*Diospyros kaki* L.) grown in subtropical Australia. *Postharvest Biology and Technology*, 6:149-157.
- Doymaz I. 2004. Convective air drying characteristics of thin layer carrots. *Journal of Food Engineering*, 61(1):359-364.
- Doymaz I. 2012. Evaluation of some thin-layer drying models of persimmon slices (*Diospyros kaki* L.). *Energy Conversion and Management*, 56: 199-205.
- El-Aouar AA, Azoubel PM, Murr FEX. 2003. Drying kinetics of fresh and osmotically pretreated papaya (*Carica papaya* L.). *Journal of Food Engineering*, 59:85-91.

- Gorinstein S, Zachwieja Z, Folta M, Barton H, Piotrowicz J, Zemser M, Weisz M, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O. 2001. Comparative contents of dietary fiber, total phenolics, and minerals in persimmons and apples. *J Agric Food Chem*, 49(2):952-957.
- Islam, R, Ho JC, Mujumdar AS. 2003. Convective drying with time- varying heat input: Simulation results. *Drying Technology*, 21(7): 1333- 1356.
- Jang I-C, Oh W-G, Ahn G-H, Lee J-H, Lee S-C. 2011. Antioxidant Activity of 4 Cultivars of Persimmon Fruit. *Food Sci. Biotechnol.* 20(1): 71-77.
- Jumah R, Al-Kteimat E, Al-Hamad A, Telfah E. 2007. Constant and intermittent drying characteristics of olive cake. *Drying Technology*, 25: 1421-1426.
- Nishiyama Y, Cao W, Li B. 2006. Grain intermittent drying characteristics analyzed by a simplified model. *Journal of Food Engineering*, 76: 272-279.
- Page GE. 1949. Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers. M.Sc. thesis, Purdue University.
- Park KJ, Yado MKM, Brod F. P. 2001. Estudo de secagem de pêra barlett (*Pyrus sp.*) em fatias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21:288-292.
- Park KJ, Bin A, Brod FPR. 2002. Drying of pear d'Anjou with and without osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 56:97-103.
- Puente L, Lastreto S, Mosqueda MJ, Saavedra J, Cordova A. 2010. Influencia de un Tratamiento Osmótico Sobre la Deshidratación por aire caliente de Manzana Granny Smith. *Dyna*, Año 77, Nro. 164, pp. 274283. Medellín, Diciembre de 2010. ISSN 0012-7353.
- Ramallo LA, Lovera, NN, Schmalko ME. 2010. Effect of the application of intermittent drying on *Ilex paraguariensis* quality and drying kinetics. *Journal of Food Engineering*, 97:188-193.
- Rault-Wack, A-L. 1994. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 5:255-260.
- Shei HJ, Chen YL. 2002. Computer simulation on intermittent drying of rough rice. *Drying Technology*, 20(3): 615-636.
- Simal S, Deyá E, Roselló C. 1997. Simple modelling of drying curves of fresh and osmotically pre-dehydrated apple cubes. *Journal of Food Engineering*, 33:139-150.
- Simal S, Femenia A, Garau MC, Roselló C. 2005. Use of Exponential, Page's and diffusional models to simulate the drying kinetics of kiwi fruit. *Journal of Food Engineering*, 43:109-114.
- Thomkapanich O, Suvarnakuta P, Devahastin S. 2007. Study of intermittent low pressure superheated steam and vacuum drying of heat-sensitive material. *Drying Technology*, 25:205-223.
- Torreggiani, D. 1993. Osmotic dehydration in fruit and vegetable processing. *Food Research International*, 26:59-68.
- Tuyen, TT, Truong V, Fukai S, Bhandari B. 2009. Effects of high-temperature fluidized bed drying and tempering on kernel cracking and milling quality of Vietnamese rice varieties. *Drying Technology*, 27:486-494.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración del INTA Montecarlo por las muestras provistas para los ensayos.

VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO CLOROGÉNICO DURANTE EL PROCESAMIENTO DE LA YERBA MATE (*Illex Paraguariensis*)

Butiuk A.P.^{1,2}, Maidana A.S.¹, Martos M.A.¹, Hours R.A.²

1: Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones, Argentina.

2: Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

anabutiuk@fceqyn.unam.edu.ar

Resumen: El ácido clorogénico (ACG) es un químico fino utilizado en diferentes industrias. Actualmente, no hay producción local de ACG por lo que debe ser importado. Sin embargo, la yerba mate, con cantidades significativas de ACG, constituye una fuente novedosa para la producción del compuesto. El procesamiento industrial involucra diferentes etapas durante las cuales se podrían producir cambios en la concentración del ACG. El objetivo del trabajo fue evaluar la variación de ACG, en la hoja y en el palo, durante las diferentes etapas del procesamiento. El contenido de ACG en la hoja y en el palo varió desde $8,08 \pm 0,10$ a $6,35 \pm 0,10$ g ACG/100 g materia seca, y de $7,89 \pm 0,53$ a $3,56 \pm 0,08$ g ACG/100 g materia seca, respectivamente, a lo largo de las diferentes etapas. El análisis indicó que el mayor contenido de ACG fue encontrado en las muestras de yerba mate recién cosechada: hoja y palo verde. No hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de ACG entre estas muestras. Los presentes resultados indican que el "palo

verde", residuo actualmente poco valorado en la industria yerbatera, podría constituir una materia prima valiosa para la obtención de extractos ricos en ACG.

Palabras clave: ácido clorogénico, yerba mate (*Illex paraguayensis*), procesamiento industrial.

Abstract: Chlorogenic acid (CGA) is a fine chemical used in different industries. Actually, there is no local production of CGA, so it must be imported. However, Yerba Mate, which contains significant amounts of CGA, could be considered as a novel source for production of this compound. The industrial processing involves different stages that can modify the CGA concentration. The aim of this study was to evaluate how, the different processing stages, affect the CGA content in yerba mate leaves and stems. The CGA present in the extracts was determined by an HPLC system. The CGA content ranged from 8.08 ± 0.10 to 6.35 ± 0.10 g CGA/100 g dried material for leaves and 7.89 ± 0.53 to 3.56 ± 0.08 g CGA/100 g for stems, along the different processing stages. The analysis indicated that the highest CGA content was found in the samples obtained from freshly harvested yerba mate, for both green leaves and stems. No significant differences in the CGA content ($p < 0.05$) were found in these samples. The present results indicated that "green stems", an undervalued residue in yerba mate industries, could be considered as a valuable raw material to obtain extracts rich in CGA

Keywords: chlorogenic acid, yerba mate (*Illex paraguayensis*), industrial processing.

INTRODUCCIÓN

Estructuralmente, el ácido clorogénico (ACG, CAS Number: 327-97-9) es un éster formado entre el ácido cafeico y el L-quínico. El ACG presenta importancia biológica ya que es un intermediario en la síntesis de ligninas en vegetales. Por otra parte, se han reportado actividades farmacológicas asociadas al ACG tales como agente contra el cáncer, antioxidante, antiviral, antibacterial y antifúngico con relativa baja toxicidad y efectos secundarios además de bajo potencial de desarrollo de resistencia antimicrobiana (Jiang *et al.* 2001, Farah y Donangelo 2006). Otras actividades farmacológicas mencionadas incluyen la disminución de la gluconeogénesis hepática y la reducción de la absorción de glucosa, con disminución concomitante de picos de glucemia (Shearer *et al.* 2003). El ACG está actualmente disponible en el mercado internacional tanto en forma de producto grado analítico, como así también de grado alimenticio y a granel, siendo en todos los casos considerado dentro de la categoría de Fine Chemicals. Actualmente, en nuestro país no hay producción de ACG por lo que las necesidades locales deben ser satisfechas por importación. El ACG se puede extraer de diferentes fuentes naturales, siendo el género *Eucommia* la principal fuente comercial, particularmente en el caso de empresas productoras chinas (Li *et al.* 2005). Su precio FOB China es del orden de US\$ 3.500/kg para un producto sólido a granel con 95 % (p/p) de pureza (información obtenida de un trader). Recientemente se ha popularizado su extracción a partir de granos de café verde, comercializándose como extracto de café verde en diferentes formas farmacéuticas para

reducir el apetito. Sin embargo, resulta notable mencionar que la yerba mate, con contenidos del orden del 10 % (p/p) en base seca (Marques y Farah 2009; Isolabella *et al.* 2010, Pagliosa *et al.* 2010), puede constituir una fuente totalmente novedosa, autóctona, aún no explotada y altamente competitiva para la producción industrial de este compuesto.

El proceso de producción de la yerba mate implica la cosecha de las hojas de *I. paraguariensis* que son expuestas a fuego directo, proceso que es seguido por su secado, molienda, estacionamiento y envasado para finalmente llegar a su comercialización. El proceso de industrialización puede variar entre las industrias aunque el procedimiento es básicamente el mismo y se puede describir de la siguiente manera (Barchuk 1998, Valduga *et al.* 2003):

1) *Cosecha*: las hojas verdes y pequeños tallos se cortan manual o mecánicamente, se colocan en sacos con una capacidad de unos 100 kg y luego se llevan a la planta de procesamiento.

2) *Tostado o zapecado*: este proceso también se conoce como "pre-secado". La Yerba verde es expuesta a fuego directo, a temperaturas entre 250 y 550 °C durante 2-4 min. Aquí se produce la inactivación de las enzimas oxidantes lo cual propicia a la conservación del color, sabor y aroma de las hojas. En esta etapa se elimina aproximadamente el 25 % de la humedad original.

3) *Secado*: tiene por objetivo reducir el contenido de humedad de la yerba mate desde el 24-34 % (base húmeda, bh) hasta aproximadamente 5 % (bh).

4) *Molienda (canchado)*: El canchado es la molienda gruesa de las ramas de yerba mate que salen del secadero. Se realiza con un molino de martillo que posee una criba de salida. El objetivo de esta etapa es preparar al material para la etapa de

estacionamiento, reduciendo su volumen y aumentando la superficie de contacto entre el material y el aire. También en esta etapa se realiza un tamizado (en tamices rotatorios) para eliminar los palos de mayor tamaño (1-10 % del material de entrada). La yerba mate canchada es posteriormente colocada en bolsas de 50 kg y guardada en depósitos para su estacionamiento.

5) *Estacionamiento*: es el período de tiempo necesario para que el producto adquiera el sabor, aroma y color adecuados. En el proceso de estacionamiento natural, el producto se almacena en condiciones naturales de temperatura y humedad durante 9-12 meses aproximadamente. En el proceso de estacionamiento forzado, el producto se almacena bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y circulación de aire durante un período que puede ir desde 30 a 60 días, con el fin de adquirir el sabor, aroma y color deseados.

6) *Preparación final*: esta última etapa consiste en la molienda fina de la yerba para obtener partículas más pequeñas y el tamizado con el fin de eliminar el polvo y el exceso de tallos conocidos como "palo". A continuación, las fracciones de diferente granulometría que conforman el producto final (hoja, palo y polvo) son mezcladas en proporciones adecuadas y, finalmente, se realiza el empaquetamiento.

A lo largo de las diferentes etapas del procesamiento industrial, especialmente en la cosecha, el zapeado, el secado y el estacionamiento, podrían producirse algunos cambios en el perfil y en la concentración de los compuestos bioactivos de la yerba mate, con la consiguiente modificación de sus actividades farmacológicas (López *et al.* 2006). Hasta la fecha, sólo unos pocos estudios se han llevado a cabo para evaluar los cambios que se producen en el contenido de ACG de la

yerba mate durante su procesamiento. Bastos *et al.* (2006) e Isolabella *et al.* (2010) han estudiado la variación del contenido de ACG, entre otros compuestos, únicamente en la fracción correspondiente a las hojas de la yerba mate en sus diferentes etapas del procesamiento industrial. Sin embargo, no existe información actualizada a cerca de la variación de este compuesto en la fracción denominada "palo" de la yerba mate. Esta última es considerada como uno de los principales residuos de la industria yerbatera.

De acuerdo a lo antes mencionado, el propósito de la presente investigación fue determinar la variación del contenido de ACG y sus compuestos isómeros en la fracción "hoja" y en la fracción "palo" de un lote de *Ilex paraguariensis* obtenido de un establecimiento industrial ubicado al sur de la provincia de Misiones, Argentina, en las diferentes etapas del procesamiento. Esta información es de suma importancia para la selección de la materia prima más conveniente para un proceso industrial de obtención de ACG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos

Para las extracciones se utilizó agua destilada mientras que para la determinación del contenido de ACG se utilizaron los siguientes reactivos: ácido clorogénico (ACG) (Sigma, 98 % p/p de pureza), agua (Panreac, grado HPLC), ácido fórmico (Tedia, 96 % de pureza y grado HPLC) y acetonitrilo (J.T. Baker, grado HPLC).

Selección de la materia prima

En el presente estudio se utilizaron diferentes materiales vegetales derivados de la yerba mate. Entre ellos se incluyó una muestra de yerba mate verde manualmente recolectada al

inicio de la época de zafra (meses de abril-mayo de 2014) sin ningún proceso de industrialización que provenía de un establecimiento de yerba mate (La Cachuera S.A.) ubicado al Sur de la Provincia de Misiones, Argentina. También se utilizaron varias muestras de yerba mate tomadas de diferentes etapas del procesamiento de dicho establecimiento. Todas las muestras analizadas provinieron del mismo lote original de yerba mate. Finalmente, se incluyeron muestras de yerba mate elaborada. A continuación, se detallan las principales características de cada una de dichas muestras.

A: Muestras sin industrialización:

Yerba mate verde (recién cosechada) conteniendo hojas y palos verdes. Este material vegetal fue sometido a un tratamiento térmico para inhibir la actividad enzimática dentro de las 36 h posteriores a la cosecha. Este tratamiento se realizó en nuestro laboratorio utilizando un horno microondas marca "Eslabón de Lujo" de 900 W, a potencia máxima durante 5 min.

B: Muestras industrializadas:

1) Zapecado: yerba mate verde que ha sido expuesta a fuego directo a temperaturas entre 250 y 550 °C durante 2-4 min.

2) Secado: el secado se desarrolló empleando un sistema de secado continuo y estuvo compuesto por las siguientes sub-etapas:

2a. Pre-secado: esta etapa tiene como objetivo reducir el contenido de humedad en las hojas, de tal forma que cuando las mismas se dispongan en el lecho de secado, éste tenga una porosidad alta para facilitar el flujo del gas de secado. El pre-secado se llevó a cabo en un secadero tubular de 7 m de largo en donde la temperatura de los gases de combustión osciló alrededor de los 250 °C y el tiempo de residencia fue de 7 min.

2b. Secado a través de 2 cintas consecutivas: consistió en un túnel de secado de 18 m de longitud en el cual las ramas se transportan a través de 2 cintas consecutivas donde son expuestas a una temperatura de 105-120 °C durante 1,5 h, aproximadamente.

3) Molienda gruesa (canchado): Para cada una de las muestras descritas anteriormente, se realizó un cuarteo sucesivo y posterior remoción manual de las fracciones de hoja y palo. Cada fracción (hojas y palos) de cada muestra fue molida por separado hasta la obtención de un polvo fino utilizando un molino de cuchillas. Se utilizó la fracción de hoja molida y palo molido que atraviesa una malla de 500 µm de apertura nominal.

4) Yerba mate elaborada: yerba mate que ha pasado por las etapas previas de molienda y estacionamiento. El establecimiento utiliza un proceso de estacionamiento mixto; esto es, el producto final constituye una mezcla de yerba mate con diferentes procesos y tiempos de estacionamiento, ya sea natural como acelerado.

Para el caso de esta última etapa, se tomaron muestras de cada una de las fracciones de diferente granulometría (hojas, palos y polvo) con las cuales se formula el producto final. La muestra de polvo se tamizó directamente sin molienda previa. Las muestras de hojas y de palos se molieron por separado en un molino a cuchillas hasta la obtención de un polvo fino que también se tamizó. En los 3 casos se utilizó la fracción de muestra molida que atraviesa una malla de 500 µm de apertura nominal.

Determinación del contenido de humedad de las muestras.

El contenido de humedad se determinó secando las muestras en una estufa convectiva, a 103 ± 2 °C durante 6 h, tiempo en el cual se alcanza peso constante (Norma IRAM 20503). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Preparación de los extractos.

Para la determinación del tiempo de extracción, una muestra de yerba mate aleatoriamente elegida (aproximadamente 50 mg pesados a la décima de miligramo) se extrajo con agua destilada (5 ml, 95-100 °C) (Heck *et al.* 2008, Isolabella *et al.* 2010) en un tubo (10 ml) colocado en un baño termostatizado (95 ± 5 °C) donde se lo mantuvo durante diferentes tiempos (5, 10, 20 y 30 min) con agitación periódica (cada 2 min en agitador de tubos Percytec) para homogeneizar la mezcla de extracción. Concluido el tiempo de extracción y luego de alcanzar la temperatura ambiente, la mezcla fue centrifugada (15 min; 6.000 rpm), el sobrenadante fue recolectado y el volumen del mismo fue ajustado (a 5 ml con agua destilada). El paso de extracción se repitió una vez más sobre el sólido remanente en las mismas condiciones antes descritas. Finalmente, se determinó el contenido de ACG como así también de sus diferentes isómeros y se calculó el contenido total de ACG para cada uno de los extractos obtenidos anteriormente. En base a la información obtenida se seleccionó un tiempo de extracción para las demás muestras a analizar.

La preparación de los extractos para la cuantificación del ACG y sus isómeros en las diferentes muestras de yerba mate se

realizó de manera análoga a la descrita anteriormente empleando el tiempo de extracción seleccionado previamente. Todos los extractos fueron preparados por duplicado y se mantuvieron a 4 °C luego de la extracción. El análisis de los mismos se llevó a cabo dentro de los 4 días posteriores a su preparación.

Determinación del contenido de ácido clorogénico en diferentes muestras obtenidas durante el procesamiento de la yerba mate.

La identificación y cuantificación del ACG y sus compuestos isómeros se realizó utilizando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se expresó como g/100 g muestra seca (% ms). El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía líquida en gradiente utilizando un equipo Shimadzu Prominence, equipado con un autosampler Shimadzu SIL-20 A HT y un detector de arreglo de diodos UV/VIS Shimadzu SPD-M20A. Las muestras (20 µl) se inyectaron en el sistema de HPLC y la separación se realizó en una columna de fase reversa C₁₈ Phenomenex Prodigy ODS3 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm de tamaño de partícula) protegida con un guarda columna de fase reversa C₁₈ de la misma marca. La columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C y la velocidad del flujo varió entre 1-1,2 ml/min. El gradiente binario estuvo compuesto por ácido fórmico al 1 % en agua deionizada (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El gradiente de HPLC comenzó con un 10 % de solvente B, que incrementó linealmente hasta un 17,5 % en 15 min, luego se llevó a un 30 % de solvente B en 2 min y se mantuvo así por 8 min, y, finalmente, se incrementó linealmente a un 10 % de solvente B en el último minuto. El detector de arreglo de diodos fue

ajustado a 326 nm. La identificación del ACG y sus compuestos isómeros se llevó a cabo por comparación de los picos con el tiempo de retención del compuesto estándar cuando corresponda, la absorbancia a 326 nm (máxima para el ACG), la comparación del espectro obtenido a 250-400 nm y los patrones de elución con la literatura (Carini *et al.* 1998, Fang *et al.* 2002; Bravo *et al.* 2006).

La concentración del ACG y sus isómeros en las muestras de yerba mate fue calculada utilizando una curva de calibración del compuesto estándar disponible comercialmente ($y = 6 \times 10^8 x - 18511$, $R^2 = 1$) debido a la igualdad en la estructura química.

Análisis estadístico.

Para el análisis de los datos experimentales se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido por un análisis *post-hoc* mediante la prueba de Tukey. Todas las comparaciones fueron realizadas con un nivel de confianza del 95 %. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media de dos experimentos independientes analizados por duplicado. Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de humedad de las muestras, tanto de las hojas como del palo, varió de acuerdo a las diferentes etapas de procesamiento del material vegetal como era de esperarse (**Tabla 1**). Los valores promedio de humedad encontrados para las diferentes muestras resultaron similares a los reportados por otros autores (Bastos *et al.* 2006).

Tabla 1: Variación del contenido de humedad en muestras de yerba mate obtenidas durante diferentes etapas del procesamiento

Etapas del Procesamiento	Contenido de Humedad (% bh) ^{A,B}		
	Hoja	Palo	Polvo
Cosecha (yerba mate verde)	60,78 \pm 0,13 ^a	61,81 \pm 0,00 ^a	-
Zapicado	20,69 \pm 0,13 ^b	47,38 \pm 0,01 ^b	-
Pre-secado	13,22 \pm 0,09 ^c	34,71 \pm 0,10 ^c	-
Secado en 1 ^{er} cinta	5,27 \pm 0,17 ^d	7,19 \pm 0,02 ^d	-
Secado en 2 ^{da} cinta	2,00 \pm 0,04 ^e	2,26 \pm 0,05 ^e	-
Producto final	2,49 \pm 0,08 ^e	2,80 \pm 0,01 ^e	2,63 \pm 0,11

^A Resultados expresados como g agua/100 g de muestra húmeda (% bh). ^B Resultados expresados como media \pm error estándar. En cada columna, diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La identificación y cuantificación del ACG (ácido 5-*O*-cafeoilquínico) y sus isómeros, el ácido 3-*O*-cafeoilquínico (ácido neo-clorogénico) y el ácido 4-*O*-cafeoilquínico (ácido cripto-clorogénico), fue monitoreada mediante un arreglo de diodos. Todos los extractos preparados, a partir de la fracción de hojas, de palos y de polvo correspondientes a las distintas etapas presentaron un perfil cromatográfico de elución muy similar. En la **Figura 1** se presenta un cromatograma típico de un extracto representativo en el cual se ven identificados los tres compuestos de interés.

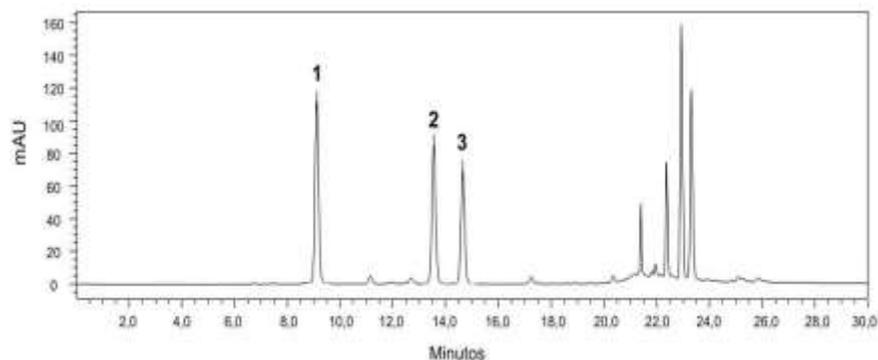


Figura 1: Perfil cromatográfico representativo de un extracto de yerba mate empleando un sistema de HPLC con columna de fase reversa. Señal obtenida a 326 nm. (1): ácido neoclorogénico; (2): ácido clorogénico y (3): ácido criptoclorogénico.

En la **Tabla 2** se detallan las características UV de los picos cromatográficos. Los tres compuestos (picos **1**, **2** y **3**) presentaron el mismo espectro UV con un máximo a 326 nm y un hombro a 296 nm, típico de compuestos derivados del ácido cafeico. El tiempo de retención y el espectro UV del compuesto **2** fueron idénticos al del ACG estándar. Teniendo en cuenta el perfil de elución de los isómeros del ACG reportados en la literatura y el espectro UV de los mismos (Fang *et al.* 2002; Bravo *et al.* 2006), los compuestos **1** y **3** se identificaron como ácido 3-*O*-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico) y ácido 4-*O*-cafeoilquínico (ácido criptoclorogénico), respectivamente.

Tabla 2: Características UV de los picos cromatográficos

Pico	TR (min)	λ_{\max} (nm)	Compuesto	Abreviación
1	9,0	326, 296h	ácido clorogénico	neo- neo-ACG
2	13,5	326, 296h	ácido clorogénico	ACG
3	14,6	326, 296h	ácido clorogénico	cripto- cripto-ACG

TR: tiempo de retención. h: hombro.

En la **Figura 2** se presentan los valores medios para el contenido total de ACG (neo-ACG + ACG + cripto-ACG) de una muestra de yerba mate aleatoriamente elegida obtenidos a partir de diferentes tiempos de extracción mediante dos extracciones sucesivas. En este caso, la muestra seleccionada consistió en la fracción de hojas correspondiente a la yerba mate elaborada.

Los resultados de la **Figura 2** indican que, en las condiciones empleadas, el equilibrio en la extracción acuosa del ACG se alcanzó ya a los 5 min, con un valor experimental de equilibrio promedio del orden de $6,2 \pm 0,40$ g ACG/100 g de muestra seca. De este modo, se seleccionó un tiempo de extracción de 5 min para los estudios posteriores a los efectos de asegurar niveles de extracción similares para el caso de las demás muestras de yerba mate. Resultados similares han sido obtenidos por Murakami *et al.* (2011) y Prudêncio *et al.* (2012), quienes han optimizado la extracción acuosa de polifenoles a

partir de muestras de yerba mate obteniendo valores para el tiempo óptimo de extracción de 3 y 1,5 min, respectivamente.

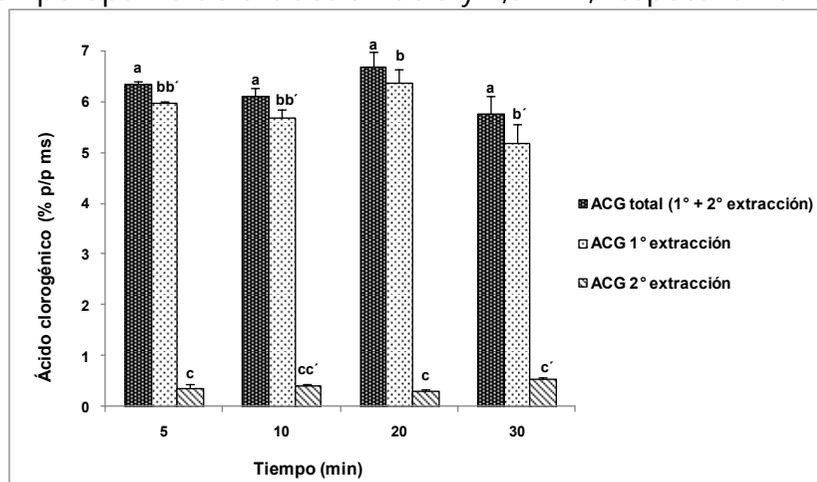


Figura 2: Contenido de ácido clorogénico (ACG) total en la fracción de hojas correspondiente a la yerba mate elaborada obtenido con diferentes tiempos de extracción mediante dos extracciones sucesivas. Resultados expresados como media \pm error estándar de dos experimentos independientes analizados por duplicado y expresados como porcentaje sobre la muestra seca (% ms). Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

En las **Tablas 3** y **4** se detallan la concentración de cada isómero del ACG cuantificado individualmente y del total de ACG (cuantificado como la suma de los tres isómeros), respectivamente, para las fracciones de hoja, palo y polvo, cuando corresponda, que componen la yerba mate y que han sido obtenidas en diferentes etapas de su procesamiento.

Tabla 3: Contenido de ácido clorogénico (ACG) y sus isómeros (neo-ACG y cripto-ACG) en las diferentes fracciones de la yerba mate y en las diferentes etapas de su procesamiento

E. P.	neo-ACG (% ms) ^{1,2}			ACG (% ms) ^{1,2}			cripto-ACG (% ms) ^{1,2}		
	hoja	palo	Polvo	hoja	palo	polvo	hoja	palo	polvo
C	3,59 \pm 0,07 ^a	2,65 \pm 0,19 ^a	-	2,39 \pm 0,02 ^a	3,18 \pm 0,21 ^a	-	2,11 \pm 0 ,00 ^a	2,06 \pm 0,13 ^a	-
Z	3,14 \pm 0,02 ^b	sd	-	2,04 \pm 0,01 ^b	sd	-	1,90 \pm 0 ,03 ^a	sd	-
P S	2,84 \pm 0,06 ^b	sd	-	2,11 \pm 0,06 ^b	sd	-	1,86 \pm 0 ,03 ^{ab}	sd	-
S. 1°	2,89 \pm 0,05 ^a	1,92 \pm 0,02 ^b	-	2,00 \pm 0,07 ^b	2,16 \pm 0,02 ^b	-	1,76 \pm 0 ,09 ^b	1,76 \pm 0,01 ^b	-
S. 2°	3,02 \pm 0,02 ^b	1,71 \pm 0,17 ^b	-	2,07 \pm 0,00 ^b	1,78 \pm 0,17 ^c	-	1,74 \pm 0 ,02 ^b	1,54 \pm 0,14 ^b	-
M G	sd	Sd	-	sd	sd	-	sd	sd	-
P F	2,73 \pm 0,04 ^b	1,00 \pm 0,04 ^c	2,19 \pm 0,09	2,08 \pm 0,03 ^b	1,62 \pm 0,02 ^c	2,46 \pm 0,09	1,54 \pm 0 ,03 ^b	0,93 \pm 0,02 ^c	1,65 \pm 0,04

¹ Resultados expresados como gACG/100 g de muestra seca (% ms). ²

Resultados expresados como media \pm error estándar. En cada columna, diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Muestras de yerba mate obtenidas de un establecimiento de yerba mate ubicado al sur de la Provincia de Misiones-Argentina, durante los meses de abril-mayo de 2014. E.P.: etapas del procesamiento. C: Cosecha (yerba mate verde); Z: Zapicado; PS: pre-secado; MG: molienda gruesa; S. 1°: secado en 1^{er} cinta; S. 2: secado en 2^{da} cinta; PF: Producto final (yerba mate elaborada); S: secado. sd: sin datos.

Los tres isómeros del ACG cuantificados en los extractos mostraron una variación significativa ($p < 0,05$) a lo largo de las diferentes etapas del procesamiento para las diferentes fracciones de yerba mate. Asimismo, hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de los tres isómeros entre los extractos correspondientes a las muestras recién recolectadas y los extractos preparados a partir de las muestras obtenidas luego del zapecado, pre-secado y secado, tanto para la fracción hoja como para la fracción palo. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de los tres isómeros entre los extractos correspondientes a muestras obtenidas luego de las etapas de zapecado, pre-secado y secado (**Tabla 3**).

Tabla 4: Contenido de ácido clorogénico (ACG) total en las diferentes fracciones de la yerba mate (hoja, palo y polvo) en las diferentes etapas del procesamiento

Etapa del Procesamiento	ACG total (% ms) ^{1,2}		
	hoja	palo	polvo
Cosecha (yerba mate verde)	8,08±0,10 ^a	7,89±0,53 ^a	-
Zapecado	7,08±0,02 ^b	-	-
Pre-secado	6,81±0,14 ^b	-	-
Secado en 1 ^{er} cinta	6,65±0,21 ^b	5,84±0,05 ^b	-
Secado en 2 ^{da} cinta	6,83±0,04 ^b	5,03±0,48 ^b	-
Molienda gruesa	sd	sd	-
Producto final	6,35±0,10 ^b	3,56±0,08 ^c	6,29±0,21

¹ Resultados expresados como gACG/100 g de muestra seca (% ms). ² Resultados expresados como media ± error estándar. En cada columna, diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$). sd: sin datos. Muestras de yerba mate obtenidas de un establecimiento de yerba

mate ubicado al sur de la Provincia de Misiones-Argentina, durante los meses de abril-mayo de 2014.

Al comparar el contenido de ACG total en los diferentes extractos, se observó que la yerba mate recién recolectada (tanto la hoja como el palo verde) presentó un contenido de ACG total significativamente superior al de las otras muestras. Asimismo, no se hallaron diferencias significativas en el contenido de ACG total correspondiente a las muestras obtenidas luego del zapecado, pre-secado y secado, tanto para la hoja como para el palo ($p > 0,05$) (**Tabla 4**). Estos resultados difieren de los hallazgos de otros autores (Bastos *et al.* 2006, Isolabella *et al.* 2010) pero se puede deber tanto a la incorrecta manipulación de las muestras como a la falta de uniformidad en la expresión de los resultados.

En general, la concentración de neo-ACG en base seca varió desde $3,59 \pm 0,07$ a $2,73 \pm 0,04$ g/100 g para la hoja, y de $2,65 \pm 0,19$ a $1,00 \pm 0,04$ g/100 g para el palo; la concentración de ACG varió desde $2,39 \pm 0,02$ a $2,00 \pm 0,07$ g/100 g para la hoja, y de $3,18 \pm 0,21$ a $1,62 \pm 0,02$ g/100 g para el palo; y la de cripto-ACG varió desde $2,11 \pm 0,00$ a $1,54 \pm 0,03$ g/100 g para la hoja, y de $2,06 \pm 0,13$ a $0,93 \pm 0,02$ g/100 g para el palo (**Tabla 3**).

Mientras que la concentración de ACG total de la sumatoria de los tres isómeros varió desde $8,08 \pm 0,10$ a $6,35 \pm 0,10$ g/100 g para la hoja, y de $7,89 \pm 0,53$ a $3,56 \pm 0,08$ g/100 g para el palo (**Tabla 4**).

A partir del análisis de los resultados obtenidos, se puede concluir que, en general, la mayor concentración de ACG (considerando los tres isómeros sumados) se encuentra en la muestra correspondiente a la yerba mate recién cosechada (hoja verde y palo verde), no habiendo diferencias

significativas en el contenido de ACG total encontrado tanto en las hojas como en los palos ($p < 0,05$) (**Figura 3**).

CONCLUSIONES

- El análisis cuantitativo-comparativo de todas las muestras analizadas indicó que el contenido de ACG total es ligeramente superior en las muestras correspondientes a la yerba mate recién cosechada (hoja verde y palo verde) y que el mismo disminuye a lo largo del procesamiento.
- No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de ACG con la hoja verde y con el palo verde.
- Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación podrían constituir una guía para la obtención de un extracto rico en ACG a partir de un residuo poco valorado en la industria yerbatera: el "palo".

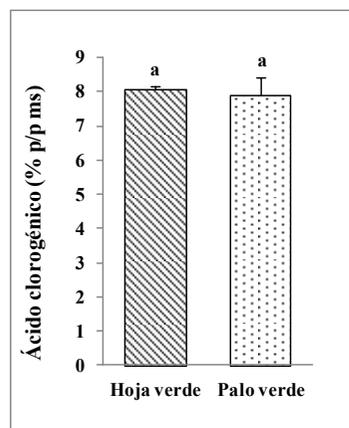


Figura 3: Contenido de ácido clorogénico total en yerba mate recién cosechada (hoja verde y palo verde). Resultados expresados como media \pm error estándar de dos

experimentos independientes analizados por duplicado y expresados como porcentaje sobre la muestra seca (% ms). Diferentes superíndices indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

- Barchuk RD. 1998. Aporte nutricional de la yerba mate. M.Sc. Thesis. Facultad de Medicina, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EA. 2006. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology, 49(3): 399-404.
- Bravo L, Goya L, Lecumberri E. 2006. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. Food Research International, 40: 393-405.
- Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, Colombo L. 1998. Characterization of phenolics antioxidants from mate (*Ilex paraguariensis*) by liquid chromatography mass spectrometry and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 12: 1813-1819.
- Fang N, Yu S, Prior RL. 2002. LC/MS/MS characterization of phenolic constituents in dried plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3579-3585.
- Farah A, Donangelo CM. 2006. Phenolic compounds in coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18: 23-36.
- Heck Cl, Schmalko M, Gonzalez de Mejia E. 2008. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition

- of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 8394–8403.
- Isolabella S, Cogoi L, López P, Anesini C, Ferraro G, Filip R. 2010. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. Food Chemistry, 122: 695-699.
- Jiang Y, Satoh K, Watanabe S. 2001. Inhibition of chlorogenic acid induced cytotoxicity by CoC₁₂. Anticancer Research, 21: 3349-3353.
- Li H, Chen B, Yao S. 2005. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides Oliv.* (*E. ulmoides*). Ultrasonics Sonochem., 12: 295–300.
- López O, Isolabella S, Anesini C, Ferraro G, Filip R. 2006. Estudio cuali-cuantitativo por HPLC de los principios activos presentes en los extractos de *Ilex paraguariensis* (yerba mate) en las diferentes etapas del procesamiento industrial. En: Libro Actas del IV Congreso Sudamericano de la Yerba Mate (1ra edición). Posadas, Argentina: INYM, INTA, UNAM, EPAGRI.
- Marques V, Farah A. 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. Food Chemistry, 113: 1370-1376.
- Negrão Murakami AN, Dias de Mello Castanho Amboni R, Schwinden Prudêncio E, Amante ER, de Moraes Zanotta L, Maraschin M, Cunha Petrus JC, Teófilo RF. 2011. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. Food Science and Technology, 44: 2211-16.
- Pagliosa CM, Vieira MA, Podestá R, Maraschin M, Bertello Zeni AL, Amante ER, Dias de Mello Castanho Amboni R. 2010. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil). Food Chemistry, 122: 173-178.
- Aguiar Prudêncio AP, Schwinden Prudêncio E, Castanho Amboni RDM, Negrão Murakami AN, Maraschin M, Cunha Petrus JC, Ogliarid PJ, Santos Leite R. 2012. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. Food and Bioproducts Processing, 90: 399-405.
- Shearer J, Farah A, De Paulis T, Bracy DP, Pencek RR, Graham TE. 2003. Quinides of roasted coffee enhance insulin action in conscious rats. Nutrient Metabolism, 133: 3529–3532.
- Valduga AT, Finzer JRD, Mosele SH. 2003. Processamento de erva-mate. Erechim: Edifapes, 183.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE PISTACHO (*Pistacia vera L. cv Kerman*)

**Fantino V.M.¹, Bodoira M.R.², Maestri D.M.², Ighani Frau
M.³, Ribotta P.D.⁴, Martínez M.L.^{2*}**

¹Estudiante de la Maestría en Ciencias y Tecnologías de los Alimentos - UNC.

²IMBIV – CONICET y FCEfYN – ICTA - UNC.

³Empresa Pisté – Pistachos Argentinos. San Juan, Argentina.

⁴ICYTAC - CONICET – UNC y FCEfYN – ICTA – UNC.

Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba, Argentina.

e mail: marcelamartinez78@hotmail.com,
mmartinez@efn.uncor.edumailto:mmartinez@efn.uncor.edu

RESUMEN

El pistacho (*Pistacia vera L.*) contiene entre un 50 y 60 % de aceite constituido principalmente por ácido oleico (50 a 55 %) y linoleico (30 a 34 %). La semilla contiene además 21,6 % de proteínas, 22,3 % de hidratos de carbono, 1,1 % de fibras, minerales, vitaminas (tocoferoles), polifenoles y pigmentos. El objetivo principal del presente trabajo fue realizar la optimización del proceso de extracción del aceite de pistacho mediante prensa de tornillo helicoidal a escala piloto. Para llevar a cabo el estudio se utilizó un diseño experimental de superficie de respuesta de Box-Behnken. El punto óptimo de extracción resultó de la combinación de las siguientes variables de proceso: reducción 4 mm; velocidad 20 rpm; temperatura de prensado 40°C y humedad de la semilla 10 % (0,111 b.s.). Se generaron las siguientes variables de respuesta:

un rendimiento de extracción del 79,61 % (b.s.), contenido de sólidos en el extracto de 7,39 %, cantidad de aceite retenido en el residuo de extracción de 18,52 % (b.s.). En todos los tratamientos se obtuvieron muestras de aceite de buena calidad química y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Palabras Claves: aceite de pistacho, extracción, optimización, calidad química.

ABSTRACT

Pistachio (*Pistacia vera L.*) seeds contains between 50 to 60 % of oil, 21.6 % of proteins, 22.3 % of carbohydrates, 1.1 % of fiber, minerals, vitamins (tocopherols), polyphenols and pigments. Pistachio oil composition is dominated largely by unsaturated fatty acids mainly oleic and linoleic acids, 50 to 55 and 30 to 34 %, respectively. The main goal of this work was to optimize the pistachio oil extraction process by cold pressing using a screw press pilot scale. A Box-Behnken experimental design was used to study the optimization process by response surface analysis. The independent variables considered were seed moisture content, restriction die, screw press speed and barrel temperature, while the response variables measured were oil yield, fines content in oil, residual oil in the extractive waste material and oil quality. Since chemical quality data of chia seeds oil pressed at different conditions was not affected, the response was optimize to maximize oil yield. The results suggested that optimum extraction point resulted from the combination of the following variables: 10 % (0.111 g/g dry solids), 4 mm restriction die, 20 rpm screw press speed and 40 °C barrel

temperature were the best processing combination to maximize oil yield (79.6 % b.s.).

Key words: pistachio oil, extraction, optimizing, chemical quality.

INTRODUCCIÓN

La producción nacional de pistacho (*Pistacia vera* L.) se encuentra cerca de las 250 toneladas con una superficie cultivada de 787 hectáreas. Las principales provincias productoras son San Juan, La Rioja, Catamarca y Mendoza con 485, 200, 60 y 23 hectáreas, respectivamente. En San Juan existen cinco grandes productores que suman 450 hectáreas más 35 hectáreas que están en manos de pequeños productores; resultando esta provincia el principal polo productivo de pistacho en el país. No obstante el crecimiento de estos sectores productivos, no ha sido acompañado en forma adecuada por un conocimiento científico riguroso de importantes aspectos que hacen a la calidad de la materia prima y, en consecuencia, de los subproductos elaborados. El interés en este sentido, tanto desde el punto de vista científico como aplicado, es enorme, puesto que a la vez que estos conocimientos propenden a la sustentación del cultivo, se buscan nuevos desarrollos con la finalidad de darle mayor valor agregado a la producción.

El panorama agrícola de San Juan cambió notablemente a partir de cultivos implantados por los proyectos de diferimiento impositivo. Mediante este sistema se otorgaron cupos fiscales a varias provincias, entre ellas San Juan, para ser orientados a las empresas con proyectos de inversión para la producción agropecuaria no industrial. A partir de 1992 se presentaron en la provincia proyectos que cubrieron gran cantidad de hectáreas antes incultas. Aunque la mayor proporción de estos emprendimientos se orienta a la plantación de vid y olivos, también le siguen en importancia

los proyectos de frutos secos incluido el pistacho. El valor comercial de los frutos secos radica fundamentalmente en la utilización de la pulpa o semilla que se consume fresca, tostada o salada, en confituras, pastelería, panadería, u otros usos culinarios. Sin embargo, la semilla del pistacho, ha comenzado a ser valorizada por sus cualidades nutricionales. La semilla contiene entre un 50 y 60 % de aceite constituido principalmente por ácido oleico, omega-9 (52 a 72 %) y linoleico, omega-6 (12 a 31 %), 19 y 22 % de proteínas, 14 % de hidratos de carbono, 1,1 % de fibras, minerales (principalmente potasio), vitaminas (β caroteno, tiamina, riboflavina, tocoferoles y ácido ascórbico) y otros compuestos hidrosolubles como polifenoles y pigmentos (Arena *et al.*, 2007; Bellomo y Fallico, 2007; Tsantili *et al.*, 2010). La composición ácida del aceite de pistacho ayuda a reducir el nivel de colesterol, triglicéridos y presión arterial; lo que se traduce en una disminución del riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares.

A nivel mundial el consumo de aceites vegetales se ha incrementado notablemente en los últimos años. La utilización de aceites vegetales para preparar alimentos es una práctica milenaria, a la que si se le agregan las numerosas aplicaciones que han tenido lugar en tiempos recientes, dan cuenta de la elevada demanda de los mismos, sobre todo en los países industrializados.

En Argentina, la producción de aceites comestibles ha mostrado en los últimos años un crecimiento sostenido y en la actualidad es una actividad económica de gran relevancia. Dentro de este gran rubro de la economía, la elaboración de aceites no tradicionales, como los de nuez, almendra, pistacho, avellana, entre otros ofrece una oportunidad novedosa. Estos aceites tienen un alto valor agregado y

pueden obtenerse por metodologías relativamente sencillas, por lo que su producción no exige costos demasiado elevados. Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de esta actividad es la carencia de información relativa a los aspectos químicos y tecnológicos del proceso de obtención de los aceites, de las propiedades y posibilidades de uso de los mismos.

Como se ha descrito, el pistacho, es un alimento rico en lípidos de excelente calidad nutricional. En función de esta premisa y teniendo en cuenta la carencia de información científica relativa a la producción, conservación y utilización de este aceite, los objetivos del presente trabajo fueron: i) estudiar la influencia de las variables del proceso de extracción mediante prensa de tornillo helicoidal sobre el rendimiento y la calidad química del aceite de pistacho, ii) optimizar el proceso de obtención de aceite de pistacho mediante prensa de tornillo helicoidal, iii) estudiar la estabilidad oxidativa del aceite de pistacho bajo condiciones de almacenamiento acelerado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las extracciones se llevaron a cabo con pistacho (*Pistacia vera* L.) proveniente de la localidad de Rawson, provincia de San Juan, campaña 2013. Los mismos fueron acondicionados y almacenados en cámara de frío a 10 ± 2 °C hasta el momento de su utilización.

Las semillas presentaron un contenido de aceite del 48,51 % (p/p) y humedad inicial del 3,79 % (p/p). Las mismas fueron molidas con un molino a rodillos de acero inoxidable de apertura regulable y tamizadas en un tamizador vibratorio

hasta alcanzar un tamaño de partícula comprendido entre 4 a 8 milímetros.

Para las operaciones de prensado se realizaron diferentes tratamientos teniendo en cuenta:

Contenido de humedad: se ajustó mediante humidificación del material. Se trabajó con tres niveles de humedad: 3, 7 y 11 % (b.h.). La humidificación se llevó a cabo según la metodología propuesta por Singh y Bargale (2000). El agua se agregó a la muestra (200 gramos de material molido) mediante aspersión. Luego se colocó en bolsas de polipropileno cerradas herméticamente y se almacenó durante 48 horas a 5°C. El recipiente fue sometido a agitación, a intervalos regulares de tiempo, para asegurar una distribución uniforme de la humedad en el material. Luego los lotes se colocaron en recipientes tapados para evitar variaciones en el contenido de humedad y se llevaron a estufa durante 30 minutos. Antes de ingresar a la prensa, se determinó el contenido de humedad de cada muestra según metodología descripta en AOCS (2009).

Temperatura de prensado: se trabajó con tres temperaturas 25, 55 y 75 °C. Las mismas se lograron ajustando la temperatura del material mediante calentamiento en estufa. La temperatura del barral se ajustó a cada una de las temperaturas de trabajo mediante una camisa termostatazada en forma de anillo que envolvía al mismo.

Reducción: se utilizaron distintos tamaños de restricciones 4, 5, 6 y 8 milímetros.

Velocidad de la prensa: se trabajó con velocidades de 20,40 y 60 rpm, para ello se reguló la misma a través del regulador manual de velocidad que posee la prensa.

La extracción del aceite se llevó a cabo en una sola etapa en una prensa de tornillo helicoidal a escala piloto marca Komet (Modelo CA 59 G). La prensa se encendió 15 minutos antes de cada extracción para que entre en régimen. Para cada extracción, se calentaron los dispositivos de la prensa (tornillo, reducción, barral y soporte) junto con la muestra, durante 30 minutos y a la temperatura indicada. Como resultado del prensado de cada muestra se obtuvieron dos productos el extracto y el residuo de extracción, los cuales fueron pesados. También se controló la temperatura de salida de la torta o residuo de extracción con un termómetro digital colocado en el orificio de salida (reducción) de la prensa.

Los dispositivos de la prensa fueron lavados y secados en estufa luego de cada extracción.

El extracto obtenido se colocó en frascos color caramelo de 50 mililitros y el residuo de extracción en bolsas de polipropileno selladas.

A cada frasco se le inyectó nitrógeno con la finalidad de crear una atmósfera inerte. Ambos productos se almacenaron a -18 °C hasta el momento de su utilización.

Cantidad total de aceite extraído (% AE)

Se calculó en base al contenido inicial de aceite en el material de partida y al contenido de aceite residual en la torta. Los mismos se determinaron según el método oficial AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2009).

Cantidad de sólidos en el extracto (%SE)

Los aceites obtenidos del prensado se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos y a una temperatura de 25 °C. Luego se procedió a separar el sobrenadante (aceite) y posteriormente se pesó la cantidad de sólidos obtenidos y el porcentaje de sólidos en el extracto se calculó por diferencia de pesada.

El aceite centrifugado se almacenó en frascos color caramelo, eliminando el oxígeno del espacio de cabeza con inyección de nitrógeno, para su posterior análisis químico.

Cantidad de aceite retenido en el residuo sólido (%)

De cada extracción, se pesaron 10 gramos de torta, se molieron en molino de cuchillas, se deshidrataron en estufa (105 °C) y se sometieron a extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet, durante 12 horas, utilizando como disolvente n-hexano. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y posterior a la extracción (AOCS, 2009). El rendimiento en aceite se expresa como %, base seca.

Calidad de los aceites obtenidos

A cada una de las muestras de aceite obtenido se les determinó los índices generales de calidad en lo relativo grado de acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específica (k_{232} y k_{270}) (AOCS, 2009). También fueron analizados en su composición acídica, contenido en sustancias antioxidantes endógenas (tocoferoles, polifenoles, clorofilas y carotenoides) según metodologías empleadas anteriormente (Torres *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2006; Martínez y Maestri,

2008). El tiempo de inducción (horas) de los aceites se determinó mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 L/h, temperatura 100 °C) (Frankel, 2005).

Análisis estadístico de los resultados

En la planificación de los ensayos experimentales se aplicó el diseño de Box- Behnken. Se utilizaron tres niveles en cada uno de los factores del proceso: humedad de la semilla (% b.h.), temperatura de prensado (°C), velocidad de prensado (rpm), restricción de la prensa (mm), mientras que las variables respuestas evaluadas fueron rendimiento de extracción (%), contenido de sólidos en el extracto (%) y la calidad química del aceite obtenido: índice de peróxidos (meq. de O₂/Kg de aceite), grado de acidez (% ácido oleico), coeficientes de extinción específica (k232 y k270), contenido de tocoferoles totales (µg/g aceite), polifenoles (mg/kg) y estabilidad oxidativa (h).

Los resultados fueron analizados mediante la utilización del software Statgraphics Plus ver. 5.1. La calidad de los modelos ajustados fue evaluada mediante ANOVA y para el ajuste de los modelos de los datos experimentales se obtuvo el coeficiente de determinación, R². Se ajustaron polinomios de segundo grado para expresar las respuestas (Y_n) como función de las variables (Ec 1).



(Ec. 1)

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y se realizaron réplicas del punto central para permitir la

estimación del error puro mediante la suma de cuadrados. Se llevaron a cabo dos diseños diferentes, el primero exploratorio (ensayos preliminares) y el segundo para ajustar los factores de diseño.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características del material vegetal

En la tabla 1 se muestra la composición de la semilla. El contenido de aceite estuvo acorde con valores previamente informados (Arena et al., 2007; Bellomo y Fallico, 2007; Tsantili et al., 2010).

Tabla 1. Composición de semillas de Pistacho

Humedad (% b.h.)	3,79
Contenido de Aceite(%b.s.)	48,51

Ensayos preliminares: "Exploratorio"

En una primera etapa se aplicó un diseño experimental con 28 tratamientos (4 puntos centrales) descrito en la tabla 2. La figura 1 muestra los efectos principales significativos sobre el rendimiento de aceite. Los factores humedad de la semilla, temperatura de prensado y reducción presentaron un p-valor menor al nivel de significancia ($\alpha=0,05$), lo que implica que estos factores afectan significativamente la variable rendimiento de aceite. Los valores de aceite extraído estuvieron comprendidos entre 0 % y 66,53 % del total de aceite disponible. El contenido de sólidos en el extracto fue

afectado significativamente por la humedad de la semilla, la temperatura de proceso y la reducción de la prensa.

Tabla 2. Diseño Box-Benken. Ensayos Preliminares

T	Factores ^a				RA ^b %	SE ^c %
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄		
1	11	25	5	40	39,68	60,32
2	7	50	6	20	55,86	44,14
3	7	25	4	40	18,59	81,41
4	11	50	6	40	45,54	54,46
5 ^d	7	50	5	40	49,3	50,7
6	7	50	4	20	66,53	33,47
7	7	75	4	40	61,83	38,17
8	3	25	5	40	0	100
9	7	75	6	40	40,66	59,34
10	7	25	5	60	0	100
11	3	50	6	40	0	100
12	3	50	4	40	7,09	92,91
13	3	50	5	20	14,17	85,83
14	7	50	6	60	40,64	59,36
15	7	75	5	60	48,99	51,01
16	7	50	4	60	56,07	43,93
17	11	50	5	60	55,01	44,99
18	3	75	5	40	22,94	77,06
19 ^d	7	50	5	40	53,88	46,12
20	7	25	6	40	11,36	88,64
21	11	50	5	20	58,03	41,97
22	7	75	5	20	57,09	42,91
23	7	25	5	20	18,67	81,33
24 ^d	7	50	5	40	45,01	54,99
25 ^d	7	50	5	40	50,51	49,49

26	11	50	4	40	58,86	41,14
27	11	75	5	40	55,03	44,97
28	3	50	5	60	0	100

^a X₁: humedad de la semilla, X₂: temperatura de prensado, X₃: reducción, X₄: velocidad de prensado. ^bRendimiento de aceite. ^c Sólidos en el extracto. ^d Punto central.

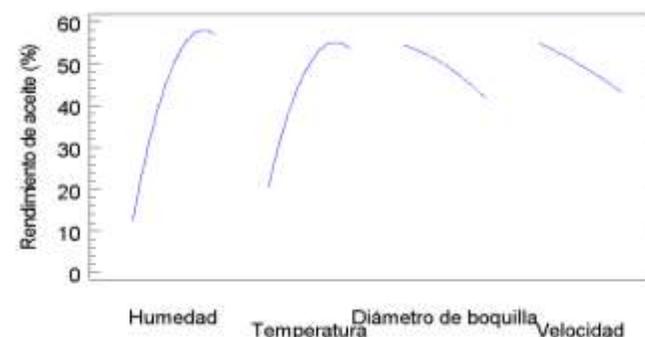


Figura 1. Efectos principales sobre el rendimiento de aceite en el ensayo preliminar

En el gráfico anterior podemos observar la variabilidad de la cantidad de aceite extraído frente a los factores involucrados en el diseño. Respecto al efecto individual de cada una de las variables de proceso sobre la cantidad de aceite extraído se observó que, a medida que se incrementa el contenido de humedad de la semilla y la temperatura de proceso aumenta el rendimiento de aceite extraído hasta un punto en que dicho incremento tiene un efecto nulo o negativo. Por otro lado, la cantidad de aceite extraído disminuye con el aumento en el diámetro de boquilla y la velocidad de prensado.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos preliminares se elaboró un nuevo diseño experimental considerando los factores humedad de la semilla, temperatura de prensado y reducción de la prensa con la finalidad de determinar su combinación adecuada para maximizar la cantidad de aceite extraído, minimizar el contenido de sólidos co-extraídos y preservar la calidad química del producto final. El factor velocidad de prensado se mantuvo constante (20 rpm) dado que los resultados del análisis de la varianza de los ensayos preliminares no mostraron influencia significativa sobre el rendimiento en aceite. El nuevo diseño Box-Behnken estudió los efectos de los 3 factores en 16 tratamientos (4 puntos centrales). El diseño experimental y las variables de respuesta consideradas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Diseño Box- Behnken - Efecto de las variables de proceso en el rendimiento de aceite

T	X ₁	X ₂	X ₃	RA ^b %	SE ^c	AR ^d (%)	IP ^e	GA ^f	K ₂₃₂	k ₂₇₀	L ^g	C ^h
1	8	7	5	73,	5,9	26,	0,2	0,2	1,7	0,1	0,6	0,1
		5		55	5	45	68	5	93	64	82	16
2	8	5	6	58,	4,5	41,	0,2	0,2	1,6	0,1	0,5	0,0
		5		41	8	59	39	2	63	53	94	89
3	8	5	4	76,	5,8	23,	0,2	0,2	1,7	0,1	0,6	0,1
		5		78	6	22	80	6	16	58	50	03
4	1	5	5	68,	3,4	31,	0,1	0,2	1,6	0,1	0,6	0,1
i	0	5		36	9	64	75	3	45	50	38	03
5	1	5	5	69,	4,3	30,	0,1	0,2	1,6	0,1	0,6	0,1
i	0	5		97	5	03	82	5	60	54	50	08
6	1	5	5	70,	3,6	29,	0,2	0,2	1,6	0,1	0,6	0,0
i	0	5		90	5	10	65	2	62	47	26	97
7	1	3	5	64,	3,4	36,	0,1	0,2	1,7	0,1	0,5	0,0
	2	5		00	6	00	97	7	88	52	97	96
8	1	5	5	72,	4,8	27,	0,1	0,2	1,6	0,1	0,6	0,0
i	0	5		02	5	98	83	7	37	48	04	94
9	1	7	4	75,	5,0	24,	0,2	0,2	1,7	0,1	0,6	0,1
	0	5		81	7	19	48	7	03	57	90	09
1	1	5	4	74,	4,5	25,	0,2	0,2	1,7	0,1	0,6	0,1

0	2	5		5	7	50	65	7	40	55	81	14
1	1	7	5	61,	4,0	38,	0,2	0,3	1,6	0,1	0,6	0,1
1	2	5		74	4	26	63	3	68	59	40	10
1	1	7	6	67,	4,6	32,	0,2	0,2	1,6	0,1	0,6	0,1
2	0	5		18	7	82	70	7	79	57	83	17
1	1	5	6	60,	4,4	39,	0,2	0,2	1,7	0,1	0,6	0,1
3	2	5		51	8	49	75	6	15	62	69	16
1	1	3	4	71,	5,0	28,	0,2	0,2	1,6	0,1	0,5	0,0
4	0	5		50	5	50	59	5	32	49	83	91
1	8	3	5	60,	4,8	39,	0,0	0,2	1,6	0,1	0,5	0,0
5	5	5		79	8	21	50	1	44	48	29	79
1	1	3	6	62,	4,1	37,	0,2	0,2	1,5	0,1	0,5	0,0
6	0	5		75	2	25	79	2	95	44	62	91

^a X₁: humedad de la semilla (%), X₂: temperatura de prensado(°C), X₃: reducción. ^b Rendimiento de aceite (%). ^cSólidos en el extracto (%). ^d Aceite retenido en la torta(%). ^eIP (índice de peróxidos, meq O₂ / g de aceite). ^f Grado de acidez (g ácido oleico /g aceite). ^g Absorb. 470nm Luteína. ^hAbsorb. 670nm Clorofila. ⁱpunto central.

De acuerdo al análisis estadístico realizado, los factores humedad de la semilla, temperatura de prensado y reducción de la prensa afectaron significativamente el rendimiento de aceite (p- valor <0,05).

La ecuación (Ec. 2) del modelo ajustado es:

$$\text{Rendimiento} = -31,41 + 1,66.X_2 + 21,80.X_1 - 14,84.X_3 - 0,006.X_2^2 - 0,094.X_2.X_1 + 0,0015.X_2.X_3 - 0,996.X_1^2 + 0,5475.X_1.X_3 + 0,30625.X_3^2 \quad (\text{Ec. 2})$$

El coeficiente de determinación del modelo logró explicar 92,69% de la variabilidad de los datos.

Según el Diagrama de Pareto (Figura 2), los tres factores ejercieron un efecto cuadrático sobre el rendimiento de aceite, negativo para la humedad y la temperatura de prensado, y positivo para la reducción de la prensa.

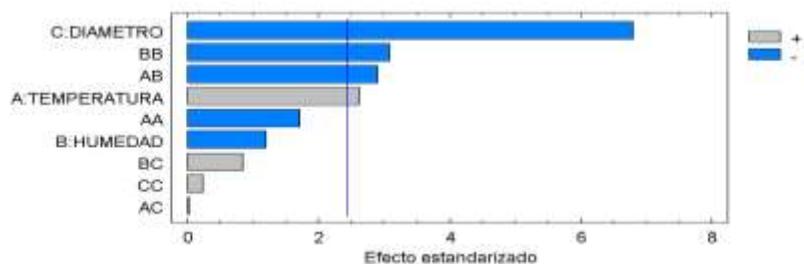


Figura 2: Diagrama de Pareto

Estos resultados indicaron que a medida que se incrementó la reducción de la prensa se produjo una disminución del rendimiento hasta un mínimo, mientras que los factores de humedad y temperatura de prensado maximizaron el rendimiento de la extracción a valores bajos y un aumento posterior de ambos factores provocó la reducción de esta variable (Figura 3).

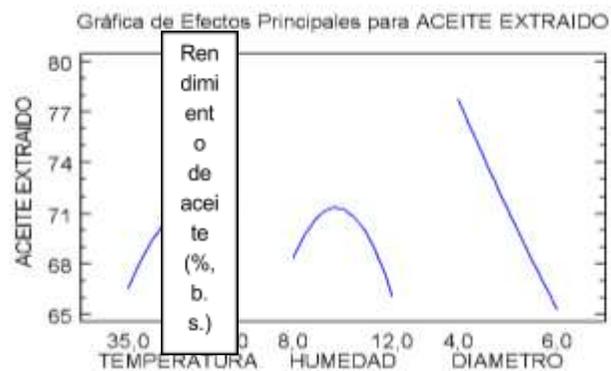


Figura 3: Variabilidad de la cantidad de aceite extraído frente a los factores involucrados en el nuevo diseño.

La siguiente superficie, esquematiza la distribución de los valores de aceite extraído (% b.s.) en toda el área de trabajo abarcada por el diseño aplicado.

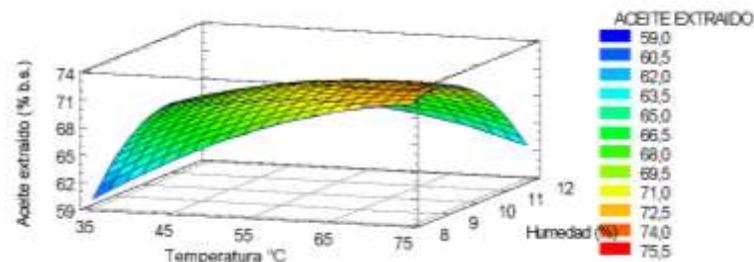


Figura 4. Superficie de respuesta estimada

El porcentaje de aceite extraído aumentó al incrementar el contenido de humedad de la semilla y al disminuir la temperatura de extracción. La humidificación del material, previo al prensado, provocó una expansión y ruptura de las estructuras celulares e incrementó la plasticidad y permeabilidad del material, lo que facilitó la salida del aceite aumentando el rendimiento de extracción y disminuyendo la cantidad de sólidos extraídos en el aceite. Los resultados de este diseño mostraron rendimientos en aceite notablemente superiores (58,41 – 76,78 %) a los obtenidos en los ensayos preliminares. La cantidad máxima de aceite extraído 76,78 % (b.s.) se obtuvo con el tratamiento 3.

En la tabla 4, se pueden observar los parámetros químicos evaluados para los aceites obtenidos mediante los distintos tratamientos.

Tabla 4. Efecto de los distintos tratamientos sobre los parámetros de calidad del aceite de obtenido

T	IP ^a	GA ^b	k ₂₃₂	k ₂₇₀	L ^c	C ^d
1	0,0499	0,21	1,644	0,148	0,529	0,079
2	0,2797	0,26	1,716	0,158	0,650	0,103
3	0,2391	0,22	1,663	0,153	0,594	0,089
4	0,2682	0,25	1,793	0,164	0,682	0,116
5	0,2633	0,33	1,668	0,159	0,640	0,110
6	0,2648	0,27	1,740	0,155	0,681	0,114
7	0,2749	0,26	1,715	0,162	0,669	0,116
8	0,1973	0,27	1,788	0,152	0,597	0,096
9	0,2787	0,22	1,595	0,144	0,562	0,091
10	0,2589	0,25	1,632	0,149	0,583	0,091
11	0,1748	0,23	1,645	0,150	0,638	0,103
12	0,2648	0,22	1,662	0,147	0,626	0,097
13	0,1815	0,25	1,660	0,154	0,650	0,108
14	0,1834	0,27	1,637	0,148	0,604	0,094
15	0,2701	0,27	1,679	0,157	0,683	0,117
16	0,2477	0,27	1,703	0,157	0,690	0,109

^aIP (índice de peróxidos, meq O₂ / g de aceite). ^bGrado de acidez (g ácido oleico /g aceite). ^c Absorb. 470nm Luteína. ^dAbsorb. 670nm Clorofila

Se observaron incrementos en los valores de acidez (0,21 a 0,33 % ácido oleico), índice de peróxido (0,0499 a 0,2797 meq

O₂ / g de aceite), k₂₇₀ (0,148 a 0,164), contenido de luteína (0,529 a 0,690 abs.) y clorofila (0,079 a 0,117 abs.) con el aumento de la humedad y de la temperatura de prensado. El análisis de varianza permitió confirmar que la temperatura del proceso de extracción y la humedad fueron las principales fuentes de variabilidad para los parámetros mencionados. Se detectaron diferencias menores entre los tratamientos en el contenido de dienos.

En todos los casos se obtuvieron aceites de calidad química aceptable ya que los parámetros están dentro de los valores aceptables: GA < 1 (% ácido oleico), IP < 1 meq de O₂/kg aceite, k₂₃₂ < 2,10 y k₂₇₀ < 0,18.

Extracción de aceite óptima

La combinación de los factores, que predice un máximo en el rendimiento de aceite en la región de trabajo proporcionada por el software, fue de 10 % humedad de la semilla, 40°C la temperatura de prensado y 4 mm de restricción de salida en la prensa.

Los resultados mostraron que no se encontró diferencias significativas entre el valor estimado por el modelo (80,122 %) y el observado experimentalmente (79,61%) para el rendimiento de aceite, lo que sugiere un buen ajuste del modelo a los datos experimentales.

Los parámetros químicos del aceite obtenido según la respuesta optimizada se muestran en la Tabla 5. En todos los tratamientos se obtuvieron muestras de aceite de buena calidad química y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Tabla 5. Parámetros físicos y químicos de los puntos óptimos

PUNTO OPTIMO	
PARÁMETROS	V=20rpm - R= 4mm - H= 10% - T= 40°C
FÍSICOS	
% AE	79,61
% SRE	7,39
%AR	16,71
QUÍMICOS	
GA(%)	0,240
IP (meq/kg)	0,260
k232	1,717
k270	0,156
Tiempo de Inducción(hs)	30,34
ÁCIDOS GRASOS	
Ac. Oleico (C18:1)	51,90
Ac. Linoleico (C18:2)	33,10
Ac. Palmítico (C16:0)	11,550
Ac. α -Linolénico (C18:3)	2,172
Ac. Palmitoleico (C16:1)	0,973
Ac. Esteárico (C18:0)	0,372
TOCOFEROLES mg/Kg aceite	
α	115
β	54
γ	777

δ	61
PIGMENTOS	
Clorofila (mg Clorofila/Kg A)	22,329
Luteína (mg luteína/Kg A)	43,53
FENOLES	No detectado

El orden de abundancia de ácidos grasos fue el siguiente (Tabla 6): ácido oleico (C18:1) > ácido linoleico (C18:2) > ácido palmítico (C16:0) > ácido α -Linolénico (C18:3) > ácido palmitoleico (C16:1) > ácido esteárico (C18:0). Los valores anteriores se corresponden con datos encontrados en bibliografía (Chahed, 2008). La semilla presentó composición de ácidos grasos saturados (C16:0, C18:0), monoinsaturados (C16:1, C18:1) y ácidos grasos poliinsaturados (C18:2, C18:3). El ácido oleico (C18:1) fue el principal ácido graso que representa más del 50% del total de ácidos grasos en la semilla.

Tabla 6. Composición de semillas de Pistacho

Composición de Ácidos Grasos	% relativo promedio
C16:0	11,575
C16:1	0,943
C18:0	0,493
C18:1	53,275
C18:2	32,500
C18:3	1,561

CONCLUSIONES

Por sus cualidades físicas (tamaño, dureza) y contenido de aceite, la semilla de pistacho constituye un material apropiado para la extracción del aceite por prensado.

El diseño de Box-Behnken permitió determinar la combinación óptima de variables para la optimización del proceso de extracción de aceite de pistacho mediante prensa de tornillo helicoidal a escala piloto. Los resultados encontrados en este estudio mostraron una combinación de humedad de semilla de 10 % (0,102 b.s.), una restricción de salida de 4 mm, una velocidad de prensado 20 rpm y una temperatura de prensado de 40°C. Se generaron las siguientes variables de respuesta: un rendimiento de extracción del 79,61 % (b.s.), contenido de sólidos en el extracto de 7,39 %, cantidad de aceite retenido en el residuo de extracción de 18,4 % (b.s.).

En todos los tratamientos se obtuvieron muestras de aceite de buena calidad química y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. El aceite obtenido en el punto óptimo del diseño respondió a los parámetros: grado de acidez del $0,24 \pm 0,01$ % (% ácido oleico); índice de peróxidos de $0,26 \pm 0,03$ meq. de O_2/Kg de aceite; coeficientes de extinción específica, K_{232} y K_{270} , $1,717 \pm 0,094$ y $0,156 \pm 0,001$, respectivamente; contenido de tocoferoles totales de 953 mg/kg aceite. La concentración de carotenoides

fue de $43,5 \pm 0,92$ mg/kg aceite y una concentración de clorofilas de $22,3 \pm 1,05$ mg/kg aceite.

Las características químicas del aceite de pistacho obtenido y el estudio realizado sobre la viabilidad de implementación de la tecnología de prensado con prensa de tornillo helicoidal, representan un aporte significativo a los fines de establecer bases para la potencial elaboración de aceite de pistacho a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Alvarez – Ortí, M., Quintanilla, C., Sena, E., Alvarruiz, A., Pardo, J.E. (2012). The effects of a pressure extraction system on the quality parameters of different virgin pistachio (*Pistacia vera* L. var. Larnaka) oil. *Grasas y aceites*, 63 (3): 260 – 266.

Amaral, J.S., Casal, S., Pereira, J.A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P. (2003). Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7698-7702.

AOCS (1998). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Ed. AOCS Press, Champaign, USA.

Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Maccarone, E. Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds *Food Chemistry* 104 (2007) 403–408.

Bellomo, M.G., Fallico B. Anthocyanins, chlorophylls and xanthophylls in pistachio nuts (*Pistacia vera*) of different

- geographic origin *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (2007) 352–359.
- Burket, S. 2000. Industry and Trade Summary. Edible nuts. USITC Publication 3352. Office of Industries. U.S. International Trade Commission Washington.
- Carmona, H. 2005. Pistachos de San Juan para el mercado nacional. *Diario de Cuyo*.
- Chahed, T., Bellila, A., Dhifi, W., Hamrouni, I., M'hamdi, B., Kchouk, M.E. and Marzouk, B. Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. *Grasas y aceites*, 59 (1), Enero - Marzo, 51-56, 2008, ISSN: 0017-3495
- Frankel, E.N. (2005). Lipid oxidation. Ed. Barnes & Associates, Bridgwater, England.
- Ixtaina, V.Y., Cardarelli, D. A., Mattea, M. A., Nolasco, S. M., Tomas, M. C.. Extracción de aceite de chia (*Salvia hispanica L.*) mediante CO₂. En: XII Congreso Latino-americano de Oleos e Gorduras, Florianópolis, Brasil, 2007.
- Martínez, M.L., Marín, M.A., Salgado Faller, C.M., Revol, J., Penci, M.C., Ribotta, P.D. (2012). Chia (*Salvia hispanica L.*) oil extraction: study of processing parameters. *Food Science and Technology*, 47, 78-82.
- Medine, M., Sükrü, K. (1999). Storage stability of whole-split pistachio nuts (*Pistacia vera L.*) at various conditions. *Article Food Chemistral*, Vol. 66: 227-233.
- Montgomery D. (2005). Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons Inc., New York.
- Savage, G.P., Dutta, P.C., McNeil, D.L. (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnut oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 1059- 1063.
- Singh, J., Bargale, P.C. (2000). Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression. *Journal of Food Engineering*, 43 (2): 75-82.
- Torres, M.M., Martínez, M.L., Maestri, D.M. (2005). A multivariate study of the relationship between fatty acids and volatile flavor components in olive and walnut oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 82: 105–110.
- Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M.V., Lambrinea, E., Rouskas, D., Roussos, P.A. Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistacia vera L.*) varieties. *Scientia Horticulturae* 125 (2010) 562–568.
- Tsantili, E., Konstantinidis, K., Christopoulos, M.V., Roussos, P.A. (2011). Total phenolics and flavonoids and total antioxidant capacity in pistachio (*Pistacia vera L.*) nuts in relation to cultivars and storage conditions. *Scientia Horticulturae* 129: 694-701.
- Vázquez-Roncero, A., Janer Del Valle, C. & Janer Del Valle, M.L. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24: 350-357.
- Wiesenborn D, Doddapaneni R, Tostenson K, Kangas N. (2001). Cooking indices to predict screw-press performance for crambe seed. *J Am Oil Chem Soc.* 78: 467- 471.
- Zheng Y, Wiesenborn DP, Tostenson K, Kangas N (2003). Screw pressing of whole and dehulled flaxseed for organic oil. *J Am Oil Chem Soc.* 80: 1039-1045.

SUPERMACROPOROUS CONTINUOUS ADSORBENT WITH SULFO GROUPS FOR LACTOFERRIN ADSORPTION

Fidelis P.C.; Minim V.P.R.; Minim L.A.

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brazil
lminim@ufv.br

Abstract: Whey proteins have functional, nutritional and technological properties promoting their use as ingredients and supplements. Lactoferrin (LF) is an 80 kDa glycoprotein, with isoelectric point at high pH values. Cryogels are polymeric gels formed in frozen media characterized by interconnected macropores low flow resistance and clear diffusion of any size solutes. A cation-exchange cryogel with sulfo-binding groups was prepared by grafting of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSA) on polyacrylamide-based cryogels. The influence of graft polymerization parameters on morphological characteristics and flow was evaluated using a central composite design. Adsorption isotherms for lactoferrin on the cryogel at different pH values and NaCl concentrations were determined by batch. Permeability and porosity were negatively influenced by the graft polymerization parameters whereas ionic capacity was positively affected. The Langmuir model was fitted to isotherm experimental data and the adsorption capacity was determined. For both pH values it was observed a decrease in the adsorption capacity of the cationic cryogel with increasing ionic strength, indicating that the process is driven by electrostatic interaction. The cryogel produced showed a high

capacity of lactoferrin adsorption and good flow properties supporting its use for lactoferrin separation from a more complex fluid as the cheese whey.

Keywords: lactoferrin, cryogel, cation-exchange.

Resumen:

La lactoferrina es una glicoproteína presente en el suero de queso de 80 kDa, con el punto isoeléctrico a valores altos de pH. Los criogeles son geles poliméricos formados en medios congelados caracterizados por baja resistencia de flujo y difusión clara de solutos de cualquier tamaño. El criogel de intercambio de cationes con grupos vinculantes sulfónicos fue preparado por "grafting" de 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico en criogeles de poliácridamida. La influencia de los parámetros de polimerización de injerto sobre las características morfológicas y de flujo se fueron evaluadas. Las isothermas de adsorción para la lactoferrina sobre lo criogel a diferentes pH y concentraciones de NaCl fueron determinadas. La permeabilidad y la porosidad fueron influenciadas negativamente por los parámetros de polimerización, y la capacidad iónica fue afectada positivamente. El modelo de Langmuir se ajustó a los datos experimentales de las isothermas y se determinó la capacidad de adsorción. Para ambos valores de pH, se observó una disminución en la capacidad de adsorción del criogel catiónico con el aumento de la fuerza iónica, lo que indica que el proceso está impulsado por interacción electrostática. El criogel producido mostró una alta capacidad de adsorción de lactoferrina y buenas propiedades de flujo que apoyan su uso para la separación de lactoferrina de fluidos complejos como suero de queso.

Palabras clave: lactoferrina, criogel, intercambio catiónico

INTRODUCTION

Lactoferrin (LF) is a whey protein presented at low concentrations ranging from 0.02 to 0.4 g.L⁻¹ (Miller et al., 2007). LF is an 80 kDa glycoprotein, with isoelectric point at high pH values. One of its functions is to transport metals, but it is also an important defense molecule and has a wide variety of physiological functions, such as antiviral, antimicrobial, antioxidant and immunomodulatory activities (Farnaud e Evanns, 2003).

Cryogels are polymeric gels formed in frozen media and were introduced as a new separation matrix for application in bioseparation processes (Lozinsky et al., 2001). Continuous stationary phase supermacroporous cryogels are then monoliths having pore sizes ranging from 10 to 100 µm, which enable the separation of large biomolecules presented in not clarified solutions.

Cryogel show extremely low flow resistance thus allowing the chromatographic process at high flow and low pressures, and allow the passage of solutions containing particulates and viscous materials without clogging the column, overcoming common difficulties observed in conventional chromatographic processes (Chen et al., 2008).

The cryogels binding characteristics can be modulated by introducing additional polymer functional groups such as cation or anion-exchange ligands, immobilizing affinity metal ion, or embedding adsorbent particles. Cation-exchange functional groups can be introduced to the cryogel pore wall surface by graft polymerization of monomers with ion-exchange groups using suitable initiator (Yao et al., 2007).

Several experimental parameters can change the adsorption behavior of proteins in ion-exchange cryogels, for example, buffer used, temperature and ionic strength (Pessoa e Kilikian, 2005). In order to optimize this process for protein purification it is necessary to know the adsorption equilibrium. Usually the equilibrium is presented in the form of adsorption isotherms which relate the concentration of a compound in solution and on the solid adsorbent surface.

A supermacroporous monolithic cryogel has been prepared by radical cryo-copolymerization of acrylamide with functional co-monomer, allyl glycidyl ether, and cross-linker N,N-methylene-bis-acrylamide (PAAm-cryogel). Graft polymerization of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSA) was used to achieve a cationic adsorbent with sulfo binding groups (PAAm-SO₃), designed for cation-exchange.

The influence of graft polymerization parameters in morphological (porosity and number of active sites) and hydrodynamic properties (water permeability) of cryogels were evaluated. Given the favorable characteristics of monolithic columns and the possibility of post-processing of whey for lactoferrin recovery, the lactoferrin binding properties to PAAm-SO₃ cryogel was also evaluated. The relationship of pH and ionic concentration with physical constants for the adsorptive process was studied by means of adsorption isotherms. The proposal has the great advantage of the possibility of using concentrated serum milk, which would not be possible when working with fixed bed columns.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Acrylamide(AAm), allyl glycidyl ether (AGE), N,N-methylene-bis-acrylamide (MBAAm), 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPSA), N,N,N,N- tetramethyl-ethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (APS), all >99% pure, were purchased from Sigma Aldrich Inc (EUA). Lactoferrina (95 %) were purchased from Glanbia Nutritionals (EUA). All other reagents were analytical grade and use as received.

Methods

The polyacrylamide cryogel matrix was produced by copolymerization of AAm and AGE monomers and MBAAm crosslinking monomer, initiated by TEMED and APS, within 3 mL plastic syringes under freezing temperature. The monomers were weighed on an analytical balance (Ohaus Adventurer Pro, USA) and dissolved in ultrapure water (MilliQ, Millipore, USA). The mixture was degassed in ultrasound bath (Branson 1510R-MT, USA) for 5 min and cooled in an ice bath. The final monomer concentration was 6% (4.74 g of AAm, 1.27 g of MBAAm and 1 ml of AGE). The polymerization was initiated adding 110 mg of APS and then 95 μ L TEMED (Kumar et al., 2006).

The mixture was then added to a plastic syringes, sealed at both ends and immersed in ethanol at -12 °C for 16h. After this, the cryogel was thawed at room temperature and washed with ultrapure water.

The cryogel activation was based on Yao et al., (2007). An initiator solution containing 5 ml of NaOH (1.0 mol.L⁻¹) and 15

ml of K₅(Cu(HIO₆)₂) (0.031 mol.L⁻¹) was pumped through the PAAm-cryogel at a 1 mL min⁻¹ flow rate at constant temperature of 41 °C for 30 min. Then, AMPSA monomer solutions (1, 2 or 3 mol.L⁻¹) were pumped through the column for grafting. The volume pumped (3, 6.5 or 10 column volume) and reaction time (0.5, 1.25 or 2h) were varied according to the design, at constant temperature of 41 °C with monomer recirculation. Finally, the column was washed with 0.1 mol L⁻¹ HCl and ultrapure water at 1 ml min⁻¹ to remove AMPSA residues. The obtained cryogels are so labeled PAAm-SO₃.

Microstructures of the obtained cryogels were examined by scanning electron microscope (SEM). Porosity was determined using acetone according to the tracer pulse-response method. The water permeability of cryogel (*k_w*) was determined by measuring different hydrostatic pressure drops across the cryogel column (*p_w*) versus the corresponding water flow rates (*Q_w*). The number of active sites (sulfonic groups) was estimated by 0.1 mol.L⁻¹ NaOH titration.

Adsorption isotherms were determined by the batch method. LF solutions at increasing concentrations were added to a known mass of cryogel at different pH and salt concentrations. The LF concentrations on the adsorbent and in the bulk were used to adjust the Langmuir isotherm. The maximum adsorption capacity of the adsorbent (*q_m*) and the equilibrium constant of adsorption (*K_d*) were estimated under equilibrium conditions.

Experimental design

The cryogel characterization was conducted completely randomized with three replicates and values were expressed as mean and standard deviation for the analysis of

morphological (SEM, porosity and number of active sites) and hydrodynamic properties (water permeability).

The significance ($p < 0.05$) of the influence of activation parameters of the cryogel on these properties were evaluated employing a face centered design (FCD). The reliability of the obtained models were assessed by checking the determination coefficient (R^2) and the statistical significance level ($p < 0.05$) for Fisher test (F). The level of significance of regression coefficients was obtained by Student's test (t).

The Langmuir model was fit to experimental data by non-linear regression. The reliability of the model was assessed the same way as above. The parameters of the Langmuir model were then expressed as a function of pH and salt concentration through polynomial regression, and the quality of the model parameters determined.

All statistical analyzes were performed using the Statistical Analysis System® Version 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licensed by Universidade Federal de Viçosa.

Results and discussion

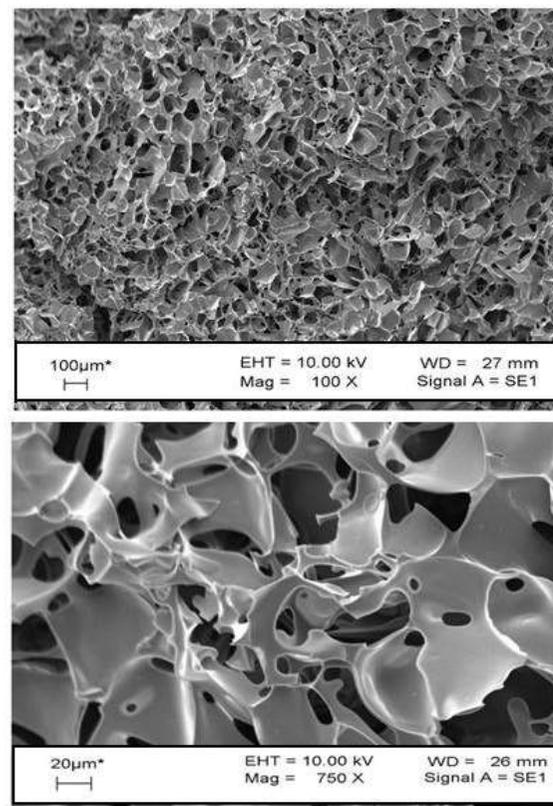


Figure 1 - Structure of the PAAm-SO₃-cryogel obtained by scanning electron microscopy. Center for Microscopy and Microanalysis (UFV).

Table 1. Permeability (K_w), porosity (ϕ) and number of active sites (NAS) values obtained at different graft polymerization parameters.

Column	Conc. (mol.L ⁻¹)	t (h)	Volume (CV)	$K_w \times 10^{12}$ (m ²)	ϕ (%)	NAS (mmol.g ⁻¹)
1	1	0.50	3.0	6.786	77.29	0.2573
2	1	0.50	10.0	5.926	89.99	0.2312
3	1	2.00	3.0	6.638	72.85	0.2742
4	1	2.00	10.0	5.814	59.55	0.2005
5	3	0.50	3.0	4.508	76.44	0.7306
6	3	0.50	10.0	5.228	70.31	0.3800
7	3	2.00	3.0	4.948	87.80	0.8879
8	3	2.00	10.0	3.772	70.48	0.3578
9	1	1.25	6.5	6.938	65.08	0.3160
10	3	1.25	6.5	4.521	69.19	0.6773
11	2	0.50	6.5	8.121	64.55	0.3022
12	2	2.00	6.5	3.953	71.78	0.2625
13	2	1.25	3.0	7.475	86.97	0.1970
14	2	1.25	10.0	1.508	65.67	0.2000
15	2	1.25	6.5	5.221	82.76	0.1680
16	2	1.25	6.5	7.554	70.46	0.2276
17	2	1.25	6.5	3.797	66.29	0.2159
18	2	1.25	6.5	9.242	77.52	0.2445

The cryogel-pAAm-SO₃ exhibited uniform sponge-like structure with interconnected supermacropores of pore size ranging from 10 to 100 μm , as can be seen in figure 1.

The influence of graft polymerization parameters (AMPSA concentration, volume and reaction time) in these characteristics was evaluated using the face centered composite design and the results are shown in table 1.

Permeability, porosity and number of active sites mean values were $5.7 \times 10^{-12} \pm 0.11 \times 10^{-12} \text{ m}^2$; $73 \pm 8.7\%$ and $0.34 \pm 0.01 \text{ mmol SO}_3 \cdot \text{g}^{-1}$ dry cryogel, respectively.

The reaction time did not show significant effects ($p < 0.05$) in any of the properties evaluated. The influence of AMPSA concentration and volume on permeability (K_m), porosity (ϕ) and number of active sites (NAS) are shown graphically in figure 2.

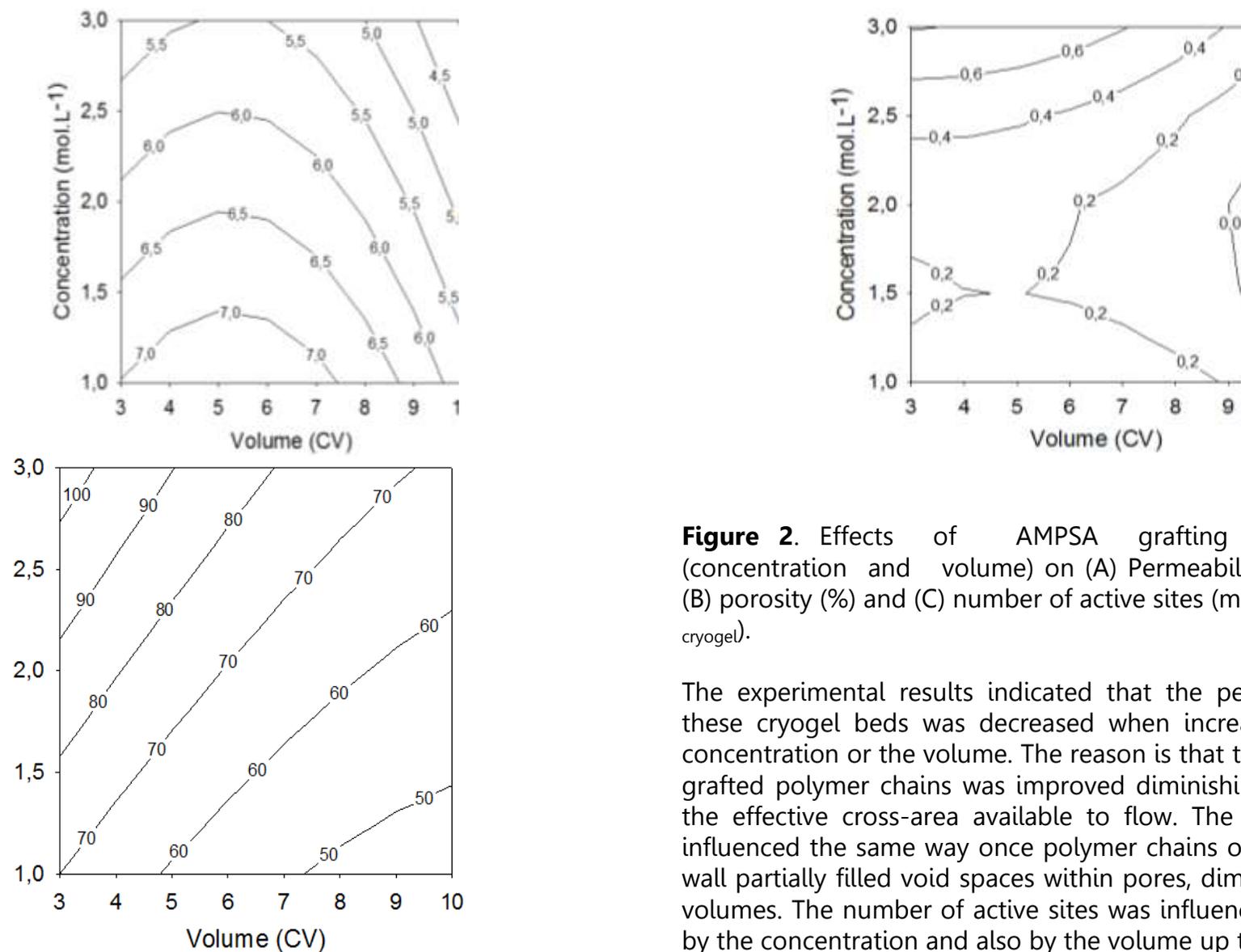


Figure 2. Effects of AMPSA grafting parameters (concentration and volume) on (A) Permeability (10^{-12} m^2), (B) porosity (%) and (C) number of active sites ($\text{mmol SO}_3 \cdot \text{g}^{-1} \text{ dry cryogel}$).

The experimental results indicated that the permeability of these cryogel beds was decreased when increasing AMPSA concentration or the volume. The reason is that the amount of grafted polymer chains was improved diminishing the effective cross-area available to flow. The porosity was influenced the same way once polymer chains on the cryogel wall partially filled void spaces within pores, diminishing pore volumes. The number of active sites was influenced positively by the concentration and also by the volume up to a 5 CV. The increment on monomers grafted to the surface resulted in

more available binding sites, what was prompted by increasing concentration.

The adsorption of lactoferrin into the cryogel followed the Langmuir model (Figure 3). The Langmuir model was fit by non-linear regression to the equilibrium data and adjustments were satisfactory for all cases ($R^2 > 0.96$).

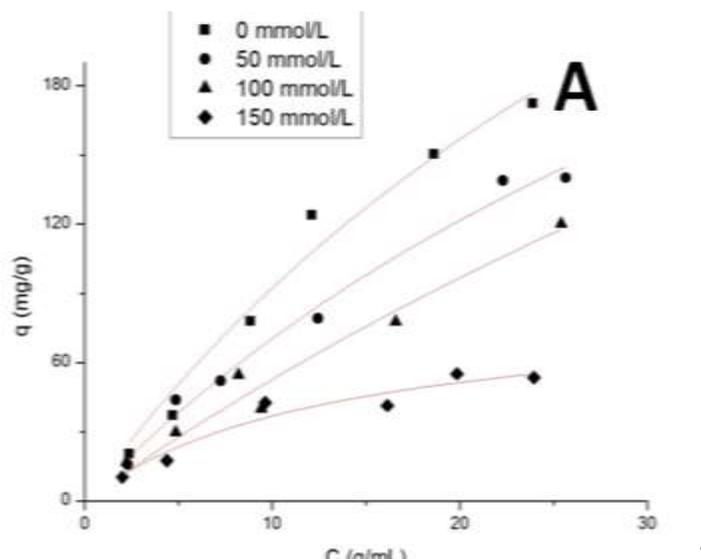


Figure 1 – Lactoferrin adsorption isotherms obtained at different NaCl concentration values (A) pH 8.0 and (B) pH 6.0 at 25 °C.

In order to mathematically represent the relationship of the adjusted parameters determined by Lagmuir (K_m and q_m) with NaCl concentration and pH, polynomial models were fitted ($R^2 > 0.95$). The parameters significance was evaluated by a t-

test ($p < 0.05$). Thus equations relating K_m and q_m with pH and salt concentration were determined (equations 1).

$$q_m = 6259.6 - 665.7 \times \text{pH} - 46.2 \times \text{SAL} + 5.1 (\text{pH} \times \text{SAL})$$

$$K_m = 703.3 - 75.7 \times \text{pH} - 5.2 \times \text{SAL} + 0.58 (\text{pH} \times \text{SAL}) \quad (1)$$

For both pH values there was a decrease in the adsorption capacity of the PAAM-SO₃-cryogel with increasing salt concentration. As the concentration of salt in solution in ion exchange chromatography, higher the salt concentration, the lower the adsorption capacity of the resin indicating that the main force involved in the ion exchange process is the electrostatic attraction.

It was also observed that the maximum adsorption capacity for lactoferrin (q_m) was higher for pH 6.0. The influence of pH on protein ion exchange processes is associated with protein isoelectric point (pI) and hence its net charge at different pH values. The more distant from the isoelectric point, the greater the net charge of the protein and its interaction with the adsorbent is more likely to be enhanced.

CONCLUSIONS

A supermacroporous monolithic cryogel has been prepared by radical cryo-copolymerization of acrylamide with functional co-monomer, allyl glycidyl ether, and cross-linker N,N-methylene-bis-acrylamide. Graft polymerization of 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid was used to achieve a cationic adsorbent with sulfo binding groups. AMPSA grafting parameters (volume and concentration) influenced on properties of acrylamide-based columns and should be manipulated in order to obtain cryogel with optimum process characteristics. The adsorption of lactoferrin to the cation exchange cryogel adsorbent was influenced by pH and salt concentration. Thus, PAAm-SO₃-cryogel produced showed a high capacity of lactoferrin adsorption and good flow properties supporting its use for lactoferrin separation.

Acknowledgement

The authors thank FAPEMIG, CNPQ and CAPES for their funding of this research.

BIBLIOGRAPHY

- CHEN, F., YAO, K., SHEN, S. e YUN, J. Influence of grafting conditions on the properties of polyacrylamide-based cation-exchange cryogels grafted with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid. *Chemical Engineering Science*, v. 63, n. 1, p. 71-77, 2008. ISSN 0009-2509.
- FARNAUD, S. e EVANS, R. W. Lactoferrin--a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, v. 40, n. 7, p. 395-405, 2003. ISSN 0161-5890.
- KUMAR, A., BANSAL, V., ANDERSSON, J., ROYCHOUDHURY, P. K. e MATTIASSON, B. Supermacroporous cryogel matrix for integrated protein isolation: Immobilized metal affinity chromatographic purification of urokinase from cell culture broth of a human kidney cell line. *Journal of Chromatography A*, v. 1103, n. 1, p. 35-42, 2006. ISSN 0021-9673.
- LOZINSKY, V., PLIEVA, F., GALAEV, I. e MATTIASSON, B. The potential of polymeric cryogels in bioseparation. *Bioseparation*, v. 10, n. 4, p. 163-188, 2001. ISSN 0923-179X.
- MILLER, G. D., JARVIS, J. K. e MCBEAN, L. D. *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*. 3 ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.
- PESSOA, J. e KILIKIAN, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Barueri, SP: Manole, 2005.
- YAO, K., YUN, J., SHEN, S. e CHEN, F. In-situ graft-polymerization preparation of cation-exchange supermacroporous cryogel with sulfo groups in glass columns. *Journal of Chromatography A*, v. 1157, n. 1-2, p. 246-251, 2007. ISSN 0021-9673.

MODIFICACIÓN DE LECITINA CRUDA DE GIRASOL MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS

Goñi M.L.¹, Constenla D.T.¹, Van der Meeren P.², Carelli A.A.¹

1: PLAPIQUI-UNS-CONICET, Camino La Carrindanga km 7, 8000, Bahía Blanca, Argentina.

2: PAINT Group, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Ghent, Belgium.

lauragoni@gmail.com

Resumen: La lecitina cruda de girasol, un subproducto del proceso de desgomado del aceite, es una mezcla compleja de fosfolípidos (PLs), aceite (triglicéridos, TGs) y otros compuestos minoritarios, y debido a sus propiedades emulsionantes es ampliamente utilizada en la industria alimenticia y farmacéutica. Su modificación enzimática le agrega valor, al transformar PLs en lisofosfolípidos (LPLs), presentando ventajas tecnológicas para la industria. Si se utiliza una enzima con actividad lipásica, los TGs también pueden ser hidrolizados dando di- y monoglicéridos (DGs y MGs), compuestos con variada aplicación como emulsionantes. En este trabajo se estudia la hidrólisis enzimática de lecitina cruda de girasol utilizando Lecitase® Ultra, caracterizando los productos obtenidos según el grado de hidrólisis. El contenido de PLs y LPLs se determinó mediante ³¹P-NMR y el contenido de TGs, DGs y MGs mediante CCG-FID. Se obtuvieron muestras de lecitina modificada con un notable incremento en su contenido de

LPLs, MGs y DGs, obteniendo una variación en la composición según el grado de hidrólisis. Cada una de estas mezclas podría presentar propiedades emulsionantes específicas de gran interés para diferentes aplicaciones, ya sea como mezclas o con una previa separación en grupos de componentes según sea el requerimiento específico.

Palabras Clave: lecitina de girasol, hidrólisis enzimática, emulsionantes

Abstract: Sunflower lecithin, a by-product from the sunflower oil degumming, is a complex mixture of phospholipids (PLs), oil (triacylglycerides, TGs), and minor compounds, and it is widely used in the food and pharmaceutical industry due to its emulsifying properties. Enzymatic hydrolyzed lecithins may present technological and commercial advantages over native lecithins, converting PLs into lysophospholipids (LPLs). Using an enzyme with lipase activity, triacylglycerides can be also hydrolyzed giving di- and monoacylglycerides (DGs, MGs), also known for their wide range of applications as emulsifiers.

The aim of this contribution is to study the enzymatic hydrolysis of sunflower lecithin by Lecitase® Ultra, analysing the composition of the modified products with different hydrolysis degrees. PLs and LPLs were analysed by ³¹P-NMR, and CCG-FID was used to determine TGs, DGs, and MGs composition.

The results showed a remarkable increment in the LPLs, MGs y DGs content of modified lecithins, and a significant variation in the composition with the hydrolysis degree was observed. This products may have a distinguish emulsifier performance, and it could be a very interesting product with different

applications whether as a mixture or with a previous separation into fractions according to the specific application.

Key Words: sunflower lecithin, enzymatic hydrolysis, emulsifiers

INTRODUCCIÓN

El complejo aceitero argentino es uno de los sectores de la industria alimenticia que ha evidenciado mayor crecimiento durante los últimos años. Localmente se manifiesta una creciente necesidad de producir materiales elaborados con mayor valor agregado, tanto para consumo interno como para exportación. Argentina es uno de los principales productores y exportadores de aceite de girasol (*Helianthus annuus* L.) y la industria local se destaca por su avanzada tecnología y alta competitividad. Los fosfolípidos (PLs) son componentes naturales de las semillas oleaginosas que pasan al aceite durante el proceso de extracción. Estos compuestos deben ser removidos, ya que pueden depositarse durante el transporte o almacenamiento del aceite crudo como así también afectar su estabilidad y características sensoriales. Las gomas, producto del desgomado acuoso de aceites vegetales, constituidas fundamentalmente por agua, PLs y aceite, pueden ser modificadas para obtener productos con un mayor valor agregado adecuados para ser usados como aditivos alimenticios. La modificación enzimática de lecitinas, produce cambios en la estructura de los fosfolípidos, transformándolos en lisofosfolípidos (LPLs), por lo que le otorga un valor agregado, presentando ventajas comerciales y tecnológicas para la industria. Los LPLs contribuyen a mejorar las propiedades funcionales y fisicoquímicas del producto, obteniendo características emulsionantes y dispersantes propias, como por ejemplo una mejor acción emulsionante en emulsiones Aceite/Agua (van Nieuwenhuyzen y Tomás 2008).

Los lípidos neutros comprenden la fracción no polar de la lecitina cruda, compuesta por restos de aceite que permanece junto con las gomas en el proceso de desgomado. Esta fracción está compuesta por triglicéridos (TGs), y puede encontrarse en menor medida algo de diglicéridos (DGs) y monoglicéridos (MGs). Si bien los TGs no presentan interés desde el punto de vista de la utilización del producto como emulsionante, sus productos de hidrólisis (DGs y MGs) son ampliamente utilizados en la industria de alimentos y cosmética por sus conocidas propiedades surfactantes (Hasenhuettl 2008).

Si bien la enzima Lecitase® Ultra es una fosfolipasa, su actividad lipásica ha sido reportada por varios autores (Mishra *et al.* 2009), sugiriendo que los triglicéridos presentes en la muestra de lecitina cruda nativa pueden ser atacados por la enzima e hidrolizados a mono y diglicéridos, obteniendo lecitinas modificadas no sólo en su composición de fosfolípidos y ácidos grasos libres, sino también en la composición de sus lípidos neutros. En general, como las emulsiones alimenticias son productos complejos que pueden sufrir diferentes mecanismos de desestabilización, en la industria se utilizan mezclas de emulsionantes con características específicas para satisfacer las distintas necesidades de los productos.

En este trabajo se describe la modificación de lecitina cruda de girasol mediante hidrólisis enzimática utilizando Lecitase® Ultra, un preparado enzimático con actividad fosfolipasa, caracterizando los sustratos y productos obtenidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La lecitina cruda, proveniente del desgomado acuoso del aceite de girasol, fue provista por una empresa oleaginosa

local. Su caracterización química general, según normas internacionales (AOCS-Sección J 2003) reveló que contenía un 67% de materia insoluble en acetona (aproximadamente 45% PLs), 32% aceite y 0,5% agua.

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en medio acuoso, a pH = 5 y en un reactor batch con temperatura controlada ($T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$), según lo informado en Goñi (2014). Como catalizador enzimático se utilizó Lecitase® Ultra en su forma libre, un preparado comercial gentilmente donado por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca), que presenta actividad fosfolipasa A₁ (PLA₁; E.C.3.1.1.32; 10000 U/ mL). La relación lecitina cruda:preparado enzimático fue de 80 mg:1 μ L. La reacción se llevó a cabo por distintos intervalos de tiempo (t_h), entre 10 y 360 min, realizando cada ensayo por duplicado. Para detener la reacción enzimática, luego de transcurrido el t_h deseado, las muestras fueron incubadas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min para inactivar la enzima. Todos los ensayos de hidrólisis se realizaron por duplicado.

La determinación cuali-cuantitativa de fosfolípidos y lisofosfolípidos se llevó a cabo mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de fósforo (^{31}P -NMR) según se describe en Goñi (2014). Se prepararon muestras de 2% (m/m) de lecitina nativa e hidrolizada en solución de 10% (m/m) deoxicolato sódico (DC, Sigma, Italia), y 2 mM EDTA disódico (p.a. Acros Organic), utilizando fosfometilglicina (PMG, Monsanto Europe, N. V.) como estándar interno para cuantificación, en una concentración de 5 mM. Las soluciones se prepararon con 50% (v/v) de agua destilada y 50% (v/v) de agua deuterada (D_2O , Armar, Suiza).

Todas las muestras de lecitina (nativa y modificada) en agua fueron preparadas alternando sonicación y agitación a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La preparación de las muestras para la determinación de PLs y LPLs mediante ^{31}P -NMR se realizó por duplicado. Estas determinaciones se llevaron a cabo en un equipo Bruker Avance 500 (500 MHz, Rheinstetten, Alemania), operado a una frecuencia de 202,46 MHz. La adquisición de datos se efectuó con 65180 data points, pulso de excitación de 90° , y Número de escaneos: 256.

La determinación cuali-cuantitativa de lípidos neutros se llevó a cabo por Cromatografía gaseosa capilar (CCG-FID) por el método del estándar interno, utilizando una metodología recomendada por Pacheco *et al.* (2014). Para la preparación y acondicionamiento de las muestras, se eliminó el agua por liofilización y se realizó una purificación para separar la fracción de PLs y LPLs, los que pueden interferir en la determinación por GC. La purificación se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida (SPE- cartuchos de fase Diol, 500 mg, J.T. Baker) empleando la técnica desarrollada por Carelli *et al.* (1997) en la cual la fase estacionaria se acondiciona con 2 ml de metanol, 2 ml de cloroformo y 2 ml de hexano, luego se siembra la muestra y se extrae la fracción de lípidos neutros (MGs, DGs y TGs) con 2 ml de cloroformo.

Luego de la purificación los productos fueron silanizados con N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoro-acetamida (MSTFA), previa adición de tricaprina (TC) y tripalmitoleína (TPO) como estándares internos, para su inmediata determinación cromatográfica, resultando una solución de 40 mg/ml de muestra con 0,842 mg/ml de TC y 0,455 mg/ml de TPO.

Se empleó un cromatógrafo de gases 4890D (Agilent, Hewlett-Packard) equipado con un detector de ionización de llama (FID). La temperatura del inyector se mantuvo constante a $380\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizó una columna capilar metálica (MXT-65TG, 30m x 0,25mm x 0,1 μ m; 35% dimetil-65% difenil polisiloxano; Restek,

Bellefonte, USA). La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 4 min para luego incrementarse hasta 350 °C a una velocidad de 25 °C/min y luego a 360 °C a 0,2 °C/min. Como gas portador se empleó hidrógeno a una velocidad lineal de 41 cm/s. El volumen inyectado fue de 1 µL. Se utilizó una relación de split de 1:60. La cuantificación de los compuestos se llevó cabo mediante el método del estándar interno, utilizando TPO como estándar para TGs y TC para DGs y MGs. La adquisición de datos y la integración de los picos se llevó a cabo con el Software HP 3398A GC Chemstation (Hewlett-Packard, 1998). La preparación y acondicionamiento de las muestras y la determinación cromatográfica fueron realizadas por duplicado.

Todos los resultados tanto de la composición de lípidos neutros como de fosfolípidos y lisofosfolípidos se presentan como un promedio de al menos dos determinaciones con su desvío estándar. Cuando fue necesario, las diferencias observadas entre los valores encontrados se compararon estadísticamente utilizando el test de Student (t-test).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se muestran los resultados para la determinación de PLs y LPLs en lecitina cruda de girasol nativa y modificada enzimáticamente con distintos grados de hidrólisis según el tiempo de reacción. El grado de hidrólisis de fosfolípidos (%H_{PL}) se calculó según la ecuación 1:

$$\%H_{PL} = \frac{[PL_0] - [PL_t]}{[PL_0]} \times 100 \quad (1)$$

Tabla 1: Contenido de fosfolípidos (PLs) y lisofosfolípidos (LPLs) en lecitina cruda de girasol, nativa y modificada con

diferentes grados de hidrólisis (%H_{PL}) según el tiempo de reacción (t_h)

t _h (min)	%H _{PL}	PLs*	LPLs*
0	-	40,57 ± 0,56	4,40 ± 0,11
10	64,32	14,89 ± 0,13	19,13 ± 0,21
20	76,37	9,92 ± 0,11	21,56 ± 0,19
30	81,77	7,67 ± 0,17	19,05 ± 0,19
40	84,44	6,54 ± 0,18	17,91 ± 0,21
60	88,88	4,71 ± 0,14	16,67 ± 0,18
90	95,59	1,90 ± 0,05	13,92 ± 0,16
180	99,50	0,20 ± 0,01	10,13 ± 0,20
360	100	0,00 ± 0,00	8,41 ± 0,18

*g/ 100 g de lecitina cruda. Media aritmética ± desviación estándar. n = 2.

Puede observarse que el contenido de PLs disminuye considerablemente a tiempos cortos de reacción, encontrando un %H_{PL} mayor al 60% luego de 10 min de hidrólisis para llegar a casi un 90% en la primer hora de reacción. Por su parte, se observa que los LPLs aumentan durante los primeros 20 min de reacción, alcanzando un valor máximo de aproximadamente 22 % (m/m), para luego comenzar a disminuir a medida que avanza la hidrólisis, hasta un 8% luego

de 360 min de reacción. Cabe aclarar que no se muestran resultados para tiempos superiores a 360 min, debido a que no se hallaron diferencias significativas en la composición luego de este tiempo, lo que sugiere que se ha llegado al estado estacionario de la reacción o que la enzima ha sido saturada.

De los resultados obtenidos para las muestras hidrolizadas, se desprende que en las condiciones estudiadas, además de la hidrólisis de fosfolípidos para generar lisofosfolípidos (monoalquil fosfoglicéridos) ocurre también la hidrólisis de éstos últimos, liberando el segundo ácido graso y generándose el correspondiente glicerofosfolípido (la forma más hidrolizada de los fosfoglicéridos). MacKenzie *et al.* (2009) han demostrado la especificidad de Lecitase® Ultra como PLA₁, descartando la posibilidad de la que la enzima pueda hidrolizar el ácido graso en la posición *sn*-2. Sin embargo, como se ha visto, el análisis de las muestras hidrolizadas revela la hidrólisis de LPLs. Esto puede explicarse mediante la reacción no enzimática denominada *acil-migración*, en donde ocurre la migración del ácido graso (AG) en la posición *sn*-2 de los LPLs resultantes de la hidrólisis de PLs, a la posición *sn*-1, y de esta manera la enzima vuelve a hidrolizar el LPL obteniéndose el correspondiente GPL.

En la **Figura 1** se muestra la reacción de hidrólisis de los PLs, utilizando Lecitase® Ultra (PLA₁), mostrando el proceso de acil-migración, generándose el 2-LPL, el cual puede ser atacado nuevamente por la enzima para dar un glicerofosfolípido (GPL), compuesto sin características surfactantes. Por lo tanto en este tipo de modificación de lecitinas se desea la maximización de LPLs, evitando que la reacción avance a GPLs.

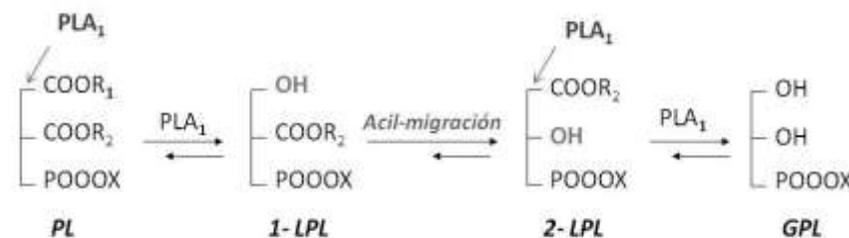


Figura 1: Reacción de hidrólisis de fosfolípidos en la modificación enzimática de lecitinas utilizando Lecitase® Ultra (PLA₁) como catalizador.

La acil-migración es una reacción muy difícil de evitar debido a que la molécula del monoalquil-fosfolípido es termodinámicamente más estable cuando tiene el ácido graso en la posición *sn*-1, por lo que la conversión de 1-LPL a 2-LPL ocurre de manera espontánea. En general, esta migración es catalizada por ácidos o bases, y altas temperaturas, y se ve favorecida en medios con alto contenido de agua (Kiełbowicz *et al.* 2012). Esta reacción no enzimática permite la hidrólisis de los lisofosfolípidos, por lo que genera que exista un punto óptimo de reacción donde se tiene el mayor contenido de LPLs, la especie de mayor interés desde el punto de vista de las propiedades emulsionantes. En las condiciones de reacción estudiadas, se encontró que este punto óptimo de mayor contenido de LPLs, se obtiene a un tiempo de hidrólisis de 20 min.

Con respecto al análisis de lípidos neutros (LN), en la **Tabla 2** se muestran los resultados obtenidos para lecitina cruda nativa y modificada con distintos tiempos de reacción, entre 30 y 360 min.

Puede verse que los TGs disminuyen suavemente durante los primeros 30 min de reacción, para luego comenzar a disminuir más bruscamente pasados los 60 min.

En cuanto a los MGs y DGs, que son tanto productos de reacción de los TGs como sustratos para la enzima, muestran un comportamiento análogo al de los LPLs, aumentando en el comienzo, para luego comenzar a disminuir por hidrólisis. Sin embargo también puede verse que no existen cambios importantes durante la primera media hora de reacción, teniéndose diferencias muy pequeñas en la composición de las tres especies. Incluso para los MGs, el análisis estadístico reveló que las diferencias encontradas en los valores promedio entre $t_h = 0$ y 30 min no son significativas.

Para tiempos de reacción mayores a los 60 min, se observa como la hidrólisis de TGs se hace importante, obteniendo una disminución de TGs mayor al 90%, luego de 180 min de reacción. Esto sugiere que el preparado enzimático Lecitase® Ultra presenta actividad lipásica, hidrolizando los lípidos neutros presentes en la lecitina cruda.

Cabe destacar que, al igual que para los fosfoglicéridos, los resultados en la composición de LN no mostraron diferencias significativas para tiempos de hidrólisis mayores a 360 min.

Algunos autores han encontrado que la fosfatidilcolina inhibe la actividad lipasa de Lecitase® Ultra, compitiendo por el sitio activo de la enzima (Mishra *et al.* 2009). Esto podría explicar el aumento en la actividad lipasa de la enzima a partir de los 60 min de reacción, cuando se ha alcanzado más de un 90% de hidrólisis para la PC.

Tabla 2: Contenido de monoglicéridos (MGs), diglicéridos (DGs) y triglicéridos (TGs) en lecitina cruda de girasol nativa y modificada, según el tiempo de reacción (t_h)

t_h (min)	MGs*	DGs*	TGs*
0	0,41 ± 0,01 ^a	1,86 ± 0,01 ^a	26,36 ± 1,50 ^e
30	0,45 ± 0,02 ^a	2,79 ± 0,14 ^b	21,56 ± 1,64 ^d
60	3,47 ± 0,12 ^d	6,47 ± 0,13 ^d	12,10 ± 0,92 ^c
90	2,18 ± 0,11 ^c	3,11 ± 0,09 ^c	5,75 ± 0,53 ^b
180	0,82 ± 0,04 ^b	2,62 ± 0,10 ^b	2,20 ± 0,18 ^a
360	0,78 ± 0,04 ^b	2,36 ± 0,10 ^b	2,01 ± 0,19 ^a

*g/ 100 g de lecitina cruda. Media aritmética ± desviación estándar. n=4. Letras iguales en una misma columna indican que no existen diferencias significativas, con el 95% de confianza ("a" corresponde al menor valor y "e" al mayor).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demostraron una acción lipasa de la enzima Lecitase® Ultra, hidrolizando a los lípidos neutros presentes en la lecitina cruda, lo que concuerda con lo informado por varios autores en la literatura.

Se observó que todas las muestras obtenidas a diferentes tiempos de hidrólisis presentaban diferencias en su composición, lo que seguramente otorgue características emulsionantes y dispersantes propias a cada una de ellas. Por ejemplo, en la muestra hidrolizada a $t_h = 1$ h el alto contenido de MGs y DGs podría dar como resultado un producto con características emulsionantes mejoradas con respecto a las lecitinas modificadas puras, que sólo contienen PLs, LPLs y AGLs.

Puede decirse que en las condiciones de reacción estudiadas la hidrólisis de TGs y PLs ocurre en mayor medida durante las dos primeras horas de reacción.

Esto indicaría que mediante la hidrólisis de lecitina cruda de girasol utilizando Lecitase® Ultra, es posible obtener mezclas de TGs, DGs, MGs, PLs, LPLs, AGL e incluso glicerol, dependiendo del avance de la reacción. Estas mezclas podrían presentar propiedades emulsionantes específicas de gran interés para diferentes aplicaciones.

También podría considerarse el fraccionamiento posterior de la lecitina modificada, obteniendo por un lado la fase de lípidos neutros con un alto contenido de MGs y DGs, y por otro lado, la fracción polar compuesta con un alto contenido de LPLs. Ambas fracciones presentarán características

emulsionantes propias para distintas aplicaciones en la industria farmacéutica y de alimentos.

Dependiendo de la aplicación deseada puede elegirse el tiempo de reacción que permita obtener la composición más adecuada, en términos de contenido total de fosfoglicéridos (PLs+LPLs), relación LPLs/PLs, relación de fosfoglicéridos hidrofílicos/hidrofóbicos, relación PLs/MGs, etc. Cabe mencionar que si bien existen algunos ejemplos concretos que permiten sacar conclusiones sobre el tipo de fosfoglicérido más adecuado para una aplicación dada, se trata todavía de un terreno empírico, que requiere de investigaciones más sistemáticas. Debido a ello, es posible también encontrar información contradictoria en la literatura. Por ello la caracterización del contenido de PLs y LPLs en lecitina cruda de girasol presentada en este capítulo podría permitir correlacionar su composición con sus características como agente emulsionante en diferentes aplicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- AOCS. 2003. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: AOCS Press.
- Carelli AA, Brevedan MIV, Crapiste GH. 1997. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(5): 511–514.
- Goñi ML. 2014. Utilización de Lipasas en la Modificación Enzimática de Lecitinas Crudas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur.

Hasenhuettl GL. 2008. Food Emulsifiers and Their Applications (2° ed.). New York: Springer.

Kiełbowicz G, Gładkowski W, Chojnacka A, Wawrzenczyk C. 2012. A simple method for positional analysis of phosphatidylcholine. *Food Chemistry*, 135: 2542–2548.

MacKenzie A, Scott D, Imamura S, Yazawa K. 2009. Determination of Phospholipase positional and substrate selectivities using ³¹P-NMR. *Industrial Research*, 91: 22.

Mishra MK, Kumaraguru T, Sheelu G, Fadnavis NW. 2009. Lipase activity of Lecitase® Ultra: characterization and applications in enantioselective reactions. *Tetrahedron Asymmetry*, 20(24): 2854–2860.

Pacheco C, Palla C, Crapiste GH, Carrín ME. 2014. Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. *Food Analytical Methods*. 7(10): 2013-2022.

Van Nieuwenhuyzen W, Tomás MC. 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(5): 472–486.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CONICET, ANPCyT, UNS (Argentina), UGent (Bélgica) y al Proyecto EUROTango (Erasmus mundus Action II) por el financiamiento.

PRODUCCIÓN DE UVA DE BAJO CONTENIDO CALÓRICO EN BASE A ÓSMOSIS EN EDULCORANTE NATURAL *STEVIA*

Laborde M.B.^{1,2,3}, Coconi M.B.^{2,3}, Barreto G.P.³, Pagano A.M.^{2,3}

1: CONICET

2: TECSE – Facultad de Ingeniería – UNICEN

3: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), Olavarría, Argentina.

Resumen: Se estudió la deshidratación osmótica para la obtención de uva de bajas calorías utilizando un pretratamiento dual (D3S) de sustitución de los azúcares propios de la fruta por el edulcorante natural *Stevia*, evaluándose el efecto de los procesos sobre la calidad del producto sobre un diseño factorial. El pretratamiento dual D3S es un proceso en dos etapas asistido (o no) por ultrasonido, la primera de remoción de azúcares naturales en agua destilada, seguida por una etapa de incorporación de edulcorante natural a distintas concentraciones (18, 20 y 22% p/p) y tiempos (30, 60 y 90 minutos) a temperatura ambiente. Las frutas se evaluaron a los distintos estadios del proceso en su contenido de sólidos solubles (°Brix). El proceso dual que permitió sustituir la máxima cantidad de azúcares (57%) de alto contenido calórico (glucosa y fructosa) propios de la fruta por el edulcorante natural *Stevia* de bajo contenido calórico (esteviósido y maltodextrina), consistió en una primera etapa de 30 minutos de ósmosis en agua destilada asistida por ultrasonido seguida de una posterior etapa de 30 minutos de

inmersión en solución de *Stevia* del 20% p/p sin aplicación de ultrasonido.

Palabras Clave: uva, deshidratación osmótica, sustitución de azúcares, *Stevia*.

Abstract: The study of the osmotic dehydration of grapes to obtain low calories raisins applying a dual treatment (D3S) based on the substitution of original sugars of the fruit by the natural sweetener *Stevia*, was made. Effects of the process on the product quality was evaluated. The dual D3S treatment is a process of two stages assisted (or not) by ultrasound; the first of elimination of the fruit sugars in distilled water, followed by a second stage of osmosis in natural sweetener at different concentrations (18, 20 and 22% p/p) and times (30, 60 and 90 minutes) at ambient temperature. The samples were evaluated in soluble solids content (°Brix) at different times during the process. The maximum substitution of high-calorie sugars (glucose and fructose) of the fruit by low-calorie *Stevia* sweetener was obtained using an initial stage of 30 minutes osmosis assisted by ultrasound followed by a ulterior stage of 30 minutes osmosis in 20% w/w of *Stevia* without ultrasound application.

Keywords: grape, osmotic dehydration, sugar substitution, *Stevia*

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores han tomado una postura más exigente en sus dietas y se han concientizado en el impacto que estas tienen sobre la salud, motivo por el cual han modificado su compra hacia productos más saludables. Frente a esta situación, las dietas se han basado en dos ejes principales, reducir la ingesta de calorías (Brownell *et al.* 2009) y promover el consumo de frutas (Rekhy y McConchie 2014) lo que ha provocado que los alimentos de bajo contenido calórico se hayan convertido en una gran tendencia en la industria alimentaria. Motivo que arribo que en este trabajo se manipule una fruta, la uva, y se proyecte reducir el contenido de los azúcares propios de la misma, principalmente glucosa y fructosa (Eyeghe-Bickong *et al.* 2012, Ghrairi *et al.* 2013), sustituyéndolos por el edulcorante natural (cero calorías) proveniente de un arbusto nativo del noroeste de Paraguay, la *Stevia rebaudiana* (Lemus-Mondaca *et al.* 2012).

Esta fruta es un alimento saludable no sólo por ser rica en fibra, calcio, magnesio y potasio (Ghrairi *et al.* 2013), sino también por su contenido en compuestos fenólicos con potente acción antioxidante que hacen que su consumo aporte diversos beneficios para la salud. Ya que se ha demostrado que presentan efecto preventivo contra enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares (Leifert y Abeywardena 2008, Williamson y Carughi 2010), mejora los conductas nutricionales en pacientes con diabetes tipo II (Kanellos *et al.* 2014), posee la actividad de inhibir la proliferación de una amplia variedad de células tumorales

(células del colon, de mama, renal y cáncer de tiroides) (Sahpazidou *et al.* 2014, Sun *et al.* 2012).

El presente proyecto, cuya finalidad es contribuir al desarrollo de alimentos saludables de calidad diferencial y alto valor agregado, se enfoca al estudio de la deshidratación de uva basada en ósmosis para la obtención de uva osmodeshidratada de bajo contenido calórico, utilizando un pretratamiento dual (DS3) de sustitución de los azúcares propios de la fruta por el edulcorante natural *Stevia* (García-Noguera *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2012), evaluándose el efecto de la aplicación de ultrasonido en ambas etapas del tratamiento D3S (Fernandes y Rodrigues 2007, Fernandes *et al.* 2008a, Fernandes *et al.* 2008b, Fernandes *et al.* 2009, Nowacka *et al.* 2014). La primera etapa corresponde a un pretratamiento de eliminación de azúcares propios de la uva con y sin la aplicación de ultrasonido, mientras que la en segunda etapa las uvas en mitades se sumergen en soluciones distintas concentraciones de edulcorante natural durante diferentes tiempos de ósmosis con y sin aplicación de ultrasonido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los ensayos se efectuaron a partir de uva (*Vitis vinífera* L.) rosada de la variedad *Red Globe* seleccionada por tamaño, color y estado de maduración, adquirida en el mercado Central Tandil (Provincia de Buenos Aires, Argentina) y almacenadas en refrigeración (2-5°C) hasta el momento de su procesado.

En la deshidratación osmótica se empleó edulcorante natural de *Stevia* en polvo provisto por la empresa Dulsevia (Posadas, Argentina).

Diseño experimental

Se trabajó sobre un diseño experimental factorial considerando los siguientes factores, con tres repeticiones:

Tipo de tratamiento (TRAT) para el proceso dual: con aplicación de ultrasonido (con US) y sin aplicación de ultrasonido (sin US) en Etapas I y II

Concentración (C) del edulcorante natural *Stevia* para la Etapa II: 18% p/p, 20% p/p y 22% p/p

Tiempo (t) de ósmosis en solución de *Stevia* para la Etapa II: 30, 60 y 90 minutos.

Procedimiento experimental

Preparación de las muestras

Los ensayos se efectuaron a partir de uva rosada cv. *Red Globe* seleccionadas por tamaño, color y estado de maduración. Tras la selección las uvas se lavaron por inmersión con agua potable a temperatura ambiente durante 10 minutos y fraccionadas por la mitad para extraerles las semillas. Las muestras fueron caracterizadas en cuanto a su peso promedio con/sin semilla (balanza analítica METTLER AE240, precisión $\pm 0,0001$ g), longitudes características (calibre manual, precisión $\pm 0,01$ mm), contenido de humedad (AOAC, 1990) y de sólidos solubles (refractómetro ABBE, Japón, precisión $\pm 0,05$ °Brix).

Etapas I del tratamiento dual D3S

La primera etapa del tratamiento D3S (eliminación de los azúcares propios de la uva) se definió en base a resultados

bibliográficos obtenidos para distintas frutas como banana (Fernandes *et al.* 2007), ananá (Fernandes *et al.* 2008a), melón (Fernandes *et al.* 2009), donde se ha demostrado que la mayor pérdida de sólidos solubles en esta fase se logra cuando la fruta se trata por inmersión en agua destilada durante 30 min a una frecuencia de ultrasonido de 25 kHz utilizando una relación fruta:solvente de 1:4. También se evaluó la exposición de las muestras bajo las mismas condiciones pero sin aplicación de ultrasonido. Todos los pre-tratamientos fueron realizados por triplicado.

Etapas II del tratamiento dual D3S

Las muestras provenientes de la Etapa I se sometieron a un tratamiento de incorporación de edulcorante natural *Stevia* (en reemplazo de los azúcares propios de la fruta) mediante un proceso de ósmosis empleando soluciones de edulcorante con tres concentraciones diferentes (18, 20 y 22% p/p) durante tres tiempos distintos de tratamiento (30, 60 y 90 minutos) y a dos niveles de frecuencia ultrasónica (0 kHz y 25 kHz), empleando una relación fruta:solución de 1:2, a temperatura ambiente, por triplicado. Luego las muestras fueron extraídas de las soluciones, escurridas, colocadas sobre papel absorbente.

Variables de control

Para el seguimiento del proceso, las muestras de uva fueron evaluadas al finalizar la primera etapa del tratamiento dual D3S y a los diferentes intervalos de tiempo de la segunda fase (30, 60 y 90 minutos), en cuanto a su contenido de sólidos solubles SS (refractómetro ABBE, Japón, precisión $\pm 0,05$ °Brix) y contenido de humedad M (estufa de aire forzado a 60°C

hasta peso constante, García-Noguera *et al.* 2010). Esta última variable se utilizó para determinar la pérdida de agua (WL) durante el proceso mediante la siguiente ecuación:

$$WL(\%) = \frac{(w_i \cdot M_i - w_f \cdot M_f)}{w_i} \times 100 \quad (1)$$

donde: M_i : humedad inicial de frutas en base húmeda (g agua / g); M_f : humedad final del fruto en base húmeda (g agua / g); w_i : masa de fruta inicial (g); w_f : masa fruto final (g).

Análisis estadístico de resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante Análisis de la varianza (ANOVA) empleando el software SYSTAT V12 a fin de evaluar la influencia ($\alpha=0,5$) de los parámetros (uso de ultrasonido, concentración, tiempo) sobre las características de calidad de los productos. También, se utilizó la metodología de superficie de respuesta (RSM) a fin de determinar los polinomios predictivos del contenido de sólidos solubles en función de los factores significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de la materia prima

En la **Tabla 1** se presentan resumidas las características de la uva fresca empleada en los tratamientos.

Tabla 1: Caracterización de la materia prima.

Peso promedio	Diámetro (mm)	Humedad (% b.h)	Sólidos solubles	Azúcares de la uva mayoritarios*
---------------	---------------	-----------------	------------------	----------------------------------

(g)	meridional ecuatorial			(°Brix)	(mg/g)	
					glucosa	fructosa
10,95	± 27,46	± 24,90	± 79,2 ± 1,19	18,37	± 39,02	39,92
3,08	2,39	2,52		0,32		

*Laborde *et al.* (2015).

Análisis del proceso

En la **Figura 1** se presentan los resultados de la variación del contenido de sólidos solubles (con sus correspondientes barras de error) de las muestras sometidas a la Etapa I de eliminación de los azúcares propios de la fruta.

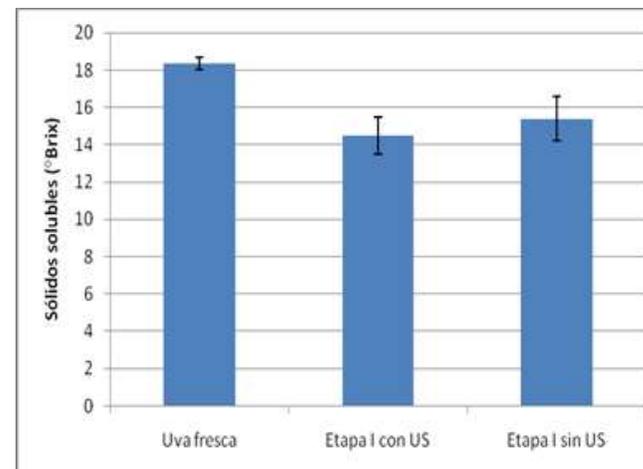


Figura 1: Eliminación de azúcares (sólidos solubles) propios de la uva en la Etapa I del tratamiento dual.

Se observa que en la primera etapa del proceso dual se logró la mayor remoción de los azúcares propios de la fruta (evaluados a través del contenido de sólidos solubles, °Brix) sometiendo a la uva a inmersión en agua destilada durante 30 minutos con aplicación de ultrasonido (Etapa I con US). Este tratamiento permitió remover un 23,1% de los sólidos solubles presentes en la fruta fresca, los cuales involucran a los azúcares de alto valor calórico que la componen, principalmente glucosa y fructosa (**Tabla 1**).

Al final del mejor pre-tratamiento, que consiste en la aplicación de ultrasonido durante la ósmosis en agua destilada, se observó un mínimo cambio en el contenido de humedad de la uva. La pérdida de agua evaluada mediante la Ec. (1) correspondió en promedio a $2,63\% \pm 1,3$. Este resultado fue del orden del reportado por Fernandes *et al.* (2009) para ananá ($3,1\% \pm 0,8$). Se ha demostrado que el tratamiento con ultrasonido en la primera etapa del proceso mejora la transferencia de masa en muchas frutas (Fernandes y Rodrigues 2007, Fernandes *et al.* 2008a, Fernandes *et al.* 2008b, Fernandes *et al.* 2009, Nowacka *et al.* 2014).

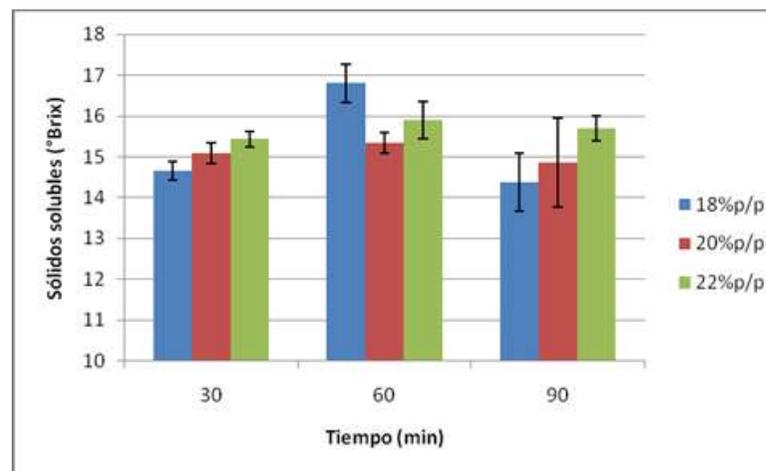
Coincidentemente, en el presente trabajo la aplicación de ondas de ultrasonido en agua destilada durante 30 minutos tuvo efecto positivo en el tratamiento dual D3S, tal como se aprecia en la **Figura 1**, permitiendo remover los azúcares propios de la fruta durante esta primera etapa.

Este comportamiento podría atribuirse a la formación de microcanales en la estructura celular de la uva causadas por la aplicación de ondas ultrasónicas. En función de estos resultados, se seleccionó la metodología del uso de ultrasonido para la Etapa I del proceso.

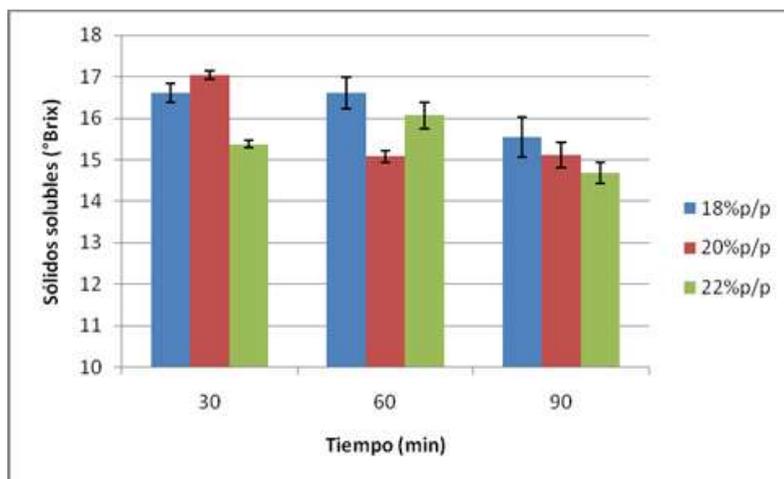
Durante la Etapa II de incorporación de edulcorante natural *Stevia* con y sin la asistencia de ultrasonido, se obtuvieron los resultados para el contenido de sólidos solubles que aparecen en la **Figura 2**.

En principio, en general se puede observar que se obtuvieron distintos contenidos de sólidos solubles en las muestras según las condiciones del proceso.

Para un mismo tiempo de proceso y una misma concentración de edulcorante se alcanzaron diferentes contenidos de sólidos solubles según se aplique o no ultrasonido. Así por ejemplo, un tratamiento asistido por ultrasonido de 90 minutos de DO en solución de *Stevia* al 18% p/p condujo a alcanzar contenidos de sólidos solubles de $14,38^\circ\text{Brix} \pm 0,71$, mientras que para el mismo tiempo y concentración sin uso de ultrasonido se logró conseguir $15,55^\circ\text{Brix} \pm 0,49$.



Etapa II con US



Etapa II sin US

Figura 2: Incorporación de edulcorante en la segunda etapa del tratamiento dual D3S.

Independientemente del tiempo de deshidratación osmótica, en la mayor parte de los casos se obtuvieron mayores contenidos de sólidos solubles como consecuencia de la incorporación del edulcorante cuando no se empleó ultrasonido (sin US) (**Figura 2**).

El análisis de la varianza (ANOVA) del efecto de los factores de la segunda etapa del tratamiento dual D3S sobre el contenido de sólidos solubles de las uvas (**Tabla 2**) demostró que que tanto la concentración de la solución osmótica, como el tiempo de inmersión y la aplicación de ultrasonido –y sus interacciones- fueron factores influyentes en la incorporación de edulcorante.

Tabla 2: Análisis de la perturbación de los factores en la incorporación edulcorante.

Factor	grado libertad	deF	p
C	2	3,35	0,04626518
TRAT	1	14,86	0,00045936
t	2	22,96	0,00000037
C × TRAT	2	11,17	0,00016842
C × t	4	10,11	0,00001368
TRAT × t	2	13,78	0,00003602
C × TRAT × t	4	5,45	0,00154043
Error	36		

A su vez, dentro de cada tratamiento, también tuvieron efecto significativo la concentración, el tiempo y sus interacciones sobre el cambio de sólidos solubles (**Tabla 3**).

Tabla 3: Análisis de la perturbación de los factores en la incorporación edulcorante dentro de cada tratamiento con/sin aplicación de ultrasonido.

Factor	grado libertad	deF	p
con US			
C	2	2,95	0,07801179
t	2	10,99	0,00075855
C × t	4	4,87	0,00772522
Error	18		
sin US			
C	2	21,57	0,0000166
t	2	42,84	0,0000001

Tratamiento	Factor	grado de libertad	de F	p
	C × t	4	17,45	0,0000052
	Error	18		

La mayor incorporación del edulcorante natural "cero calorías" en la segunda etapa del proceso dual, se logró cuando se sometió a la muestra proveniente de la Etapa I a un tratamiento osmótico en solución de *Stevia* al 20% (p/p) durante 30 minutos sin aplicación de ultrasonido (**Figura 2**). Las uvas sometidas a estas condiciones lograron aumentar su contenido de sólidos solubles un 1,57% respecto a la uva proveniente de la Etapa I.

CONCLUSIONES

La aplicación del proceso D3S dual con la primera etapa asistida por ultrasonido y la segunda etapa sin aplicación de ultrasonido demostró ser un tratamiento viable para sustituir los azúcares de alto contenido calórico propios de la uva (glucosa y fructosa) por azúcares naturales de bajo contenido calórico (*Stevia*).

La aplicación de ultrasonido durante 30 minutos en la primera etapa del proceso dual D3S fue el pretratamiento más apropiado para remover los azúcares propios de la fruta fresca.

La solución de edulcorante natural *Stevia* al 20% p/p resultó ser la concentración más adecuada para conseguir la mayor incorporación de *Stevia* en la fruta (a tiempo inicial del tratamiento, 30 min).

BIBLIOGRAFÍA

Brownell KD, Schwartz MB, Puhl RM, Henderson KE, Harris JL. 2009. The need for bold action to prevent adolescent obesity, *Journal of Adolescent Health*, 45(3):S8–S17.

Eyégghé-Bickong HA, Alexandersson EO, Gouws LM, Young PR, Vivier MA. 2012. Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries, *Journal of Chromatography B*, 885–886:43–49.

Fernandes FAN, Rodrigues S. 2007. Ultrasound as pre-treatment for drying of fruits: Dehydration of banana, *Journal of Food Engineering*, 82(2):261–267.

Fernandes FAN, Gallão MI, Rodrigues S. 2008. Effect of osmotic dehydration and ultrasound pre-treatment on cell structure: Melon dehydration, *Food Science and Technology*, 41(4):604–610.

Fernandes FAN, Gallão MI, Rodrigues S. 2009. Effect of osmosis and ultrasound on pineapple cell tissue structure during dehydration, *Journal of Food Engineering*, 90(2):186–190.

Fernandes FAN, Linhares FE, Rodrigues S. 2008. Ultrasound as pretreatment for drying of pineapples, *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(6):1049–1054.

García-Noguera J, Weller CL, Oliveira FIP, Rodrigues S, Fernandes FAN. 2010. Dual-stage sugar substitution in

strawberries with a *Stevia*-based sweetener, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(1):225–230.

Ghrai F, Lahouar L, Amira EA, Brahmi F, Ferchichi A, Achour L, Said S. 2013. Physicochemical composition of different varieties of raisins (*Vitis vinifera* L.) from Tunisia, *Industrial Crops and Products*, 43:73–77.

Kanellos PT, Kaliora AC, Tentolouris NK, Argiana V, Perrea D, Kalogeropoulos N, Kountouri AM, Karathanos VT. 2014. A pilot, randomized controlled trial to examine the health outcomes of raisin consumption in patients with diabetes, *Nutrition*, 30(3):358–364.

Laborde MB, Barreto GP, Pagano AM. 2015. Pasas de uva de bajas calorías obtenidas por deshidratación combinada: optimización del proceso y evaluación de la eficiencia antioxidante. *Avances en Ciencias e Ingeniería* (ISSN 0718-8706), 6(1) (AC11220-14) (*en prensa*).

Leifert WR, Abeywardena MY. 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols, *Nutrition Research*, 28(11):729–737.

Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. 2012. *Stevia* rebaudiana *Bertoni*, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects, *Food Chemistry*, 132(3):1121–1132.

Nowacka M, Tylewicz U, Laghi L, Dalla Rosa M, Witrowa-Rajchert D. 2014. Effect of ultrasound treatment on the water state in kiwifruit during osmotic dehydration, *Food Chemistry*, 144:18–25.

Oliveira FIP, Rodrigues S, Fernandes FAN. 2012. Production of low calorie Malay apples by dual stage sugar substitution with *Stevia*-based sweetener, *Food and Bioproducts Processing*, 90(4):713–718.

Rekhy R, McConchie R. 2014. Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals, *Appetite*, 79:113–123.

Sahpazidou D, Geromichalosa GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakisd AM, Tzanakakise GN, Hayesf AW, Kouretas D. 2014. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells, *Toxicology Letters* (article in press).

Sun T, Chen QY, Wu LJ, Yao XM, Sun XJ. 2012. Antitumor and antimetastatic activities of grape skin polyphenols in a murine model of breast cancer, *Food and Chemical Toxicology*, 50(10):3462–3467

Williamson G, Carughi A. 2010. Polyphenol content and health benefits of raisins, *Nutrition Research*, 30(8):511–519.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a UNICEN y CONICET por el financiamiento del proyecto y la beca doctoral de la Lic. Laborde, y a “Dulsevia” (Posadas, Argentina) por facilitar el edulcorante *Stevia* para el trabajo.

ESTRATEGIAS DE ENSEÑANZA APLICADAS A LA INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

Lemes A.C.¹, Reis D.F.¹, Otero D.M.¹, Guido E.S.¹, Kalil S.J.¹

1: Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande, Brasil.
ailtonlemes@furg.br

Resumen: Considerando que la transición de la enseñanza media a la enseñanza superior es compleja, se hace necesario acciones motivacionales para la adaptación y permanencia de adolescentes y jóvenes adultos en la enseñanza superior. Tales acciones deberán aumentar el interés así como la identificación de los estudiantes por las actividades desempeñadas en su profesión, contribuyendo con la formación de profesionales bien preparados por las universidades. El objetivo de este trabajo fue aplicar estrategias de enseñanza visando estimular el aprendizaje en Microbiología de Alimentos y el aprovechamiento del curso de Ingeniería de Alimentos a través del desenvolvimiento de actividades complementares en conjunto: estudiantes en sus diversos niveles y docentes. Las actividades propuestas estimularon el aprendizaje en microbiología y por la profesión elegida que deben ser continuamente incentivadas visando una mejor enseñanza. Además, servirá como incentivo a la dedicación de los estudiantes a sus tareas y a una mayor identificación con el curso.

Palabras clave: enseñanza, microbiología, ingeniería.

Abstract: Considering that transition for higher education is complex, motivational actions it is necessary for adaptation and stay of the adolescents and young adults in the higher education. Such actions should increase the interest and identification of students by activities developed by the selected occupation, contributing to the formation of well-trained professionals by universities. Thus, the objective of present study was to use teaching strategies aiming to stimulate the learning in Food Microbiology discipline and the harnessing of the Food Engineering course, through development of the complementary activities jointly with students, post-graduate students and teachers. The carried activities stimulated the learning in food microbiology and the identification by the selected profession, and they should always be encouraged for a teaching excellence. Furthermore, the activities served as an incentive to dedication of the students and for a greater empathy by the selected graduate course.

Keywords: teaching, microbiology, engineering.

INTRODUCCIÓN

La transición de la enseñanza media para la superior es compleja por lo que es necesario encontrar medios para enfrentar los desafíos y las adversidades, como acciones motivacionales para la adaptación y permanencia en la enseñanza superior que resulte en el suceso académico de adolescentes e jóvenes adultos.

Acciones motivacionales pueden permitir a los ingresados en la enseñanza superior herramientas que permitan la permanencia y el interés en las actividades desempeñadas en la profesión elegida, y contribuir además con la formación de profesionales bien preparados por las universidades. Una estrategia para estimular a los estudiantes a despertar el interés por la profesión consiste en que estos adquieran una idea más clara de lo que significa, en la práctica, el trabajo en su profesión. Un abordaje eficaz consiste en invitar a los profesionales a la universidad para contar su día a día, y los aspectos prácticos del mercado de trabajo (Kearney 2011).

Estas prácticas visan, principalmente, reducir la evasión de los estudiantes de la enseñanza superior provocadas por la falta de motivación e identificación con o curso elegido. Esto es un problema internacional que afecta el resultado final de los sistemas educacionales, ya que las deserciones de estudiantes son desperdicios sociales, académicos y económicos.

Raros son los casos de instituciones de enseñanza superior brasileñas que tengan un programa institucional profesionalizado de combate a los problemas expuestos (Silva-Filho *et al.* 2007). De esta forma, con la finalidad de

mejorar la enseñanza superior en el país, las universidades federales se adhieren al Programa de Apoyo a Planos de Restructuración y Expansión de las Universidades Federales (REUNI) instituido por el Ministerio de Educación (MEC). El programa tiene como metas la ampliación de la oferta de educación superior pública, la reestructuración académica y curricular, renovación pedagógica de la educación superior, flexibilidad intra e inter institucional, compromiso social de la institución y soporte de la pos graduación al desenvolvimiento e perfeccionamiento cualitativo de los cursos de graduación (Dias y Oliveira 2009).

De esta manera, visando disminuir los problemas citados anteriormente, el presente trabajo tuvo por objetivos, a través del uso de estrategias de enseñanza, estimular el interés por la profesión elegida y contribuir en la cualificación de los estudiantes del curso de Ingeniería de Alimentos, principalmente los vinculados a la disciplina de Microbiología de Alimentos, a través de la efectiva acción de las propuestas en conjunto con estudiantes, pos graduados y docentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El grupo de incentivo y acompañamiento a los alumnos del curso de graduación en Ingeniería de Alimentos fue compuesto por profesores y estudiantes del Programa de Pos Graduación en Ingeniería y Ciencias de Alimentos (PPG-ECA) y de la Escuela de Química y Alimentos (EQA) de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG) por un período de dos años, haciendo parte del proyecto REUNI.

Diversas metodologías fueron creadas durante el período lectivo para despertar curiosidades y estimular el aprendizaje de los alumnos del curso de Ingeniería de Alimentos, más

específicamente en la disciplina de Microbiología de Alimentos. Entre las actividades desarrolladas se destacan la realización de grupos de estudios, conferencias y talleres didácticas pedagógicas, actividades motivacionales a través de la evaluación de artículos técnicos, seminarios, entre otros. Al final de todas las actividades propuestas fue aplicado a los estudiantes un cuestionario de evaluación. A continuación la descripción de las actividades realizadas:

Grupos de estudios

Los grupos de acompañamiento y estudios dentro de la disciplina de Microbiología de Alimentos del curso de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Federal de Rio Grande fueron realizados quincenalmente en local y horarios establecidos previamente, donde los alumnos tenían la posibilidad de participar. Las actividades del grupo fueran siempre acompañadas por estudiantes del Programa de Pos graduación en Ingeniería y Ciencias de Alimentos, y guiadas por la docente responsable por la disciplina. La estrategia adoptada para el desarrollo de las actividades dentro del grupo consistió al principio en identificar los tópicos de mayor dificultad encontrados por parte de los estudiantes con base en cuestionamientos y levantamiento directo con los alumnos inscriptos en grupos anteriores. A partir de la identificación de los temas de mayor dificultad se comenzaban las discusiones y la aplicación de ejercicios sobre ellos.

Conferencias y talleres didácticos pedagógicos

Las conferencias ofrecidas a los estudiantes fueron programadas y distribuidas durante los períodos lectivos contemplados por el presente proyecto y fueron realizadas por profesionales con conocimiento técnico en el asunto

abordado. Las conferencias realizadas fueron: Introducción a la Microbiología: Conceptos y Aplicaciones; Purificación de Proteínas obtenidas de microorganismos; Microbiología de Lácteos; Aislamiento y Selección de microorganismos para la Obtención de Enzimas de Interés Industrial; Técnicas Moleculares aplicadas a la Microbiología de Alimentos y Cadena Productiva de la Leche: Riesgos y Desafíos. Además fueron realizadas cuatro talleres didáctico pedagógicas: Técnicas para la presentación de Trabajo Oral; Elaboración de Informes Técnicos Científicos; Investigación de Material Bibliográfico y Elaboración de Currículos: *Vitae* e *Lattes*. Todos los talleres y conferencias ofrecidas fueron ampliamente divulgados dentro de la universidad por medio impreso y digital de manera de llegar al mayor número posible de participantes.

Actividades motivacionales

Los estudiantes de la disciplina fueron motivados a asociar los contenidos dados en clase con la práctica a través de la utilización de artículos técnico-científicos. De esta forma, luego del abordaje de los contenidos teóricos fueron ofrecidos a los alumnos artículos referentes a los asuntos propuestos en clase con aplicación práctica. Los artículos utilizados fueron: Microorganismos indicadores de calidad de higiene y sanidad, Factores extrínsecos e intrínsecos, Análisis microbiológica de los alimentos que aparecen en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos ocurridos en Rio Grande do Sul, Brasil y un boletín epidemiológico sobre la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en el Brasil durante los años 1999 a 2004. Los alumnos fueron instruidos a discutir los temas expuestos y destacar los puntos pertinentes encontrados, así como asociar

los datos contenidos en los trabajos con los temas abordados anteriormente en clase.

Presentación de seminarios

Los alumnos del curso de Ingeniería de Alimentos en la disciplina de Microbiología de Alimentos fueron estimulados a presentar seminarios referentes a los asuntos abordados en las clases prácticas. Como ayuda para la realización de los seminarios los alumnos recibirán material con instrucciones relacionadas a la estructura del seminario, tema a ser abordado en cada tópico, aspectos de las presentaciones orales (postura, vestimenta, vocabulario y desenvoltura adecuada) y consejos para la confección del material multimedia. Los asuntos abordados en los seminarios fueron los siguientes: Recuento de mohos y Levaduras y Cámara de Neubauer; Test de Swab; Recuento de Bacterias Mesófilas Aeróbicas; Coloración de Gram; Recuento de Mohos y Levaduras y Recuento de Coliformes Totales y Termotolerantes. Los alumnos fueron distribuidos en grupos, tenían un tiempo determinado para la presentación y desarrollo del tema. Al final de cada presentación los estudiantes fueron estimulados a discutir y plantear preguntas sobre los temas presentados por los demás grupos. La docente responsable por la disciplina realizó la evaluación técnica del seminario presentado, destacando los aspectos positivos y los puntos a tratar en las próximas actividades.

Evaluación de las actividades desarrolladas

Las actividades desarrolladas durante la vigencia del proyecto fueron evaluadas a través de la aplicación de cuestionarios a los estudiantes. Además, los alumnos respondieron una auto evaluación referente a su actuación como estudiante,

abordando cuestiones sobre participación e interés en los estudios. En el cuestionario fueron levantadas preguntas relacionadas a: dedicación de los alumnos a los estudios, contribución de las actividades desarrolladas en el proyecto para la formación académica y cualificación profesional, aumento del interés por el curso a través de las actividades desarrolladas, evolución en los estudios y estímulo al aprendizaje, contribución para el conocimiento del área de trabajo a través del uso de artículos en clase, mejor aprovechamiento de las clases prácticas por el acompañamiento de los becarios del proyecto. Además, los estudiantes fueron estimulados a evaluar (D-deficiente, R-regular, B-bueno, MB-muy bueno) las conferencias y talleres realizadas en relación al contenido, lenguaje, objetividad, esclarecimiento de dudas, calidad del material utilizado, local del evento, expectativas, actividad después de la taller e sobre la divulgación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Unos ochenta estudiantes del curso de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Federal de Rio Grande participaron de las actividades llevadas a cabo por el proyecto. La actuación de los grupos de acompañamiento dentro de la disciplina de Microbiología de Alimentos contribuyeron directamente en la formación de los estudiantes, no solo en lo que se refiere a un menor índice de retención, reprobación y deserciones, pero también por el mayor aprovechamiento del curso y a la formación de profesionales más calificados. Los grupos actuaron como medios de mejorar la enseñanza a través del desarrollo de las metodologías que faciliten el aprendizaje y fortalezcan la relación entre la teoría y la

práctica, el contacto de los alumnos con el ambiente profesional y la integración curricular en diferentes aspectos. Llevando en consideración que los alumnos del curso de Ingeniería de Alimentos hasta el tercer año del curso no tienen mucho contacto con los asuntos inherentes a la disciplina de Microbiología de Alimentos, bien como los temas referentes a la actuación profesional, las conferencias ofrecidas dieron a los alumnos del curso como aplicar los conocimientos básicos de la disciplina en la actuación profesional. En la conferencia "Microbiología: Conceptos y su Aplicación en Alimentos", se abordaron conocimientos teóricos sobre microbiología y su aplicación en la industria de alimentos, también fueron presentados los microorganismos de interés para los alimentos, así como los factores que afectan el crecimiento de los mismos.

Con la finalidad de posibilitar a los alumnos el conocimiento de nuevas técnicas de identificación de microorganismos y mostrar la importancia de las enzimas originadas de forma biotecnológica en la industria de alimentos, se llevó a cabo la conferencia "Aislamiento y Selección de Microorganismos para la Obtención de Enzimas de Interés Industrial". Además, en esa actividad tomaron conocimiento de los medios de cultivo, las placas de petri, fotos de microorganismos aislados, artículos científicos, imágenes y testes rápidos para la identificación de microorganismos normalmente utilizados en la industria.

La conferencia "Técnicas Moleculares aplicadas a la microbiología de Alimentos" permitió a los estudiantes conocer los fundamentos relacionados al uso de técnicas moleculares utilizadas como herramientas en la microbiología de alimentos y la potencialidad de estas técnicas para superar las limitaciones encontradas en los métodos tradicionales.

En la conferencia "Cadena Productiva de la Leche: Riesgos e Desafíos" fueron abordados temas inherentes al desenvolvimiento de la producción de la leche, avances en el proceso de industrialización y las dificultades encontradas por los productores en procesar la leche dentro de las normas sanitarias exigidas. Las fotos muestran los momentos de la conferencia.



Figura 1: (a) Conferencia "Microbiología: Conceptos y sus Aplicaciones en los Alimentos"; (b) Conferencia "Aislamiento y

Selección de Microorganismos para la Obtención de Enzimas con Interés Industrial"; (c) "Técnicas Moleculares aplicadas a la Microbiología de Alimentos"; (d) "Cadena Productiva de la Leche: Riesgos y Desafíos".

Uno de los principales problemas que los alumnos enfrentaron, fue la dificultad de presentar trabajos, tanto en la clase, como en congresos de iniciación científica, por ese motivo se realizó un taller sobre "Técnicas de Presentación de Trabajos Orales". Esa actividad permitió a los alumnos el conocimiento de técnicas que van desde la postura del conferencista presentar el tema.

Otra dificultad encontrada por los alumnos era como realizar las notas de las informaciones que reciben en las clases. Visando minimizar tal dificultad, se realizó el taller "Elaboración de Informes Técnicos Científicos" donde se trataron temas de cómo es la estructura en un informe o en un trabajo científico, en concordancia con las normas de publicaciones técnica científicas.

Luego que finalizan la carrera, muchos estudiantes buscan entrar al mercado de trabajo, esa búsqueda siempre comienza por la confección de su currículum. El taller "Elaboración de currículum *Vitae* y *Lattes*" enseñó a los alumnos las etapas necesarias para realizar correctamente este importante documento profesional. Durante la presentación de esta actividad, y con la ayuda de computadores conectados a internet ofrecidos por la facultad, los alumnos fueron orientados en la realización de su propio currículum *Lattes*.

El taller "Investigación en Material Bibliográfico" permitió el conocimiento a los alumnos de temas que abordan la investigación a partir de datos ya analizados y publicados en medios escritos y/o electrónicos (libros, artículos científicos,

páginas en internet), ya que los alumnos encontraron dificultades en realizar los Informes y trabajos en el momento de la investigación bibliográfica. Con el auxilio de computadores, los alumnos aprendieron como utilizar las herramientas de las principales bases científicas como Periódicos Capes, *Science Direct*, *Scielo* y Google académico. La Figura 2 muestra los momentos de la realización de estas actividades.



Figura 2: (a) Taller "Técnicas de Presentación Oral"; (b) Alumnos asistiendo al taller "Elaboración de Informes Técnicos Científicos"; (c) Alumnos participando del taller "Elaboración de Currículos: *Vitae* y *Lattes*"; (d) Alumnos participando del taller "Investigación en Material Bibliográfico".

Fuera eso, las actividades motivacionales permitieron a los alumnos asociar los temas dados en clase con la práctica, mediante la utilización de artículos científicos, ya que los estudiantes tienen poco contacto con este tipo de material. La presentación de seminarios, referentes a los temas tocados en las clases prácticas, posibilitó una mayor participación, involucramiento, dedicación y aprendizaje de los alumnos en ambas áreas.

Las actividades realizadas despertaron un gran interés por parte de los alumnos, que fueron bastante participativos e debatieron sobre los asuntos tratados. Los estudiantes contemplados por las actividades propuestas presentaron un aumento en sus calificaciones, como se observa en la Figura 3. Considerando los cuatro bimestres de 2012 en la materia Microbiología de Alimentos, el promedio final fue 6,9, mientras que en el año 2010 y 2011 el promedio fue de 6,4 lo cual representa un aumento de 7,1% en las calificaciones. La realización de las actividades proporciona a los estudiantes incrementos importantes en su formación académica y profesional, una vez que las actividades extracurriculares son extremadamente importantes para su aprendizaje, debiendo ser continuamente incentivados para una mejor enseñanza.

Al interrogatorio realizado a los estudiantes sobre su dedicación a los estudios y participación en clase, los resultados mostraron que 33,3% de los alumnos se dedican

mucho a los estudios, 37,5% se dedican lo suficiente, 2,5% se dedican regularmente e 4,2% se dedican poco. Interrogados sobre la contribución de las actividades desarrolladas en la formación académica y calificación profesional, los resultados fueron bastante interesantes, mostrando que 95,8% de los alumnos concordaron que las actividades desarrolladas ayudaron y 4,2% no concordaron. Con relación al mayor interés por el curso en que están insertadas las actividades propuestas y desarrolladas, los resultados demuestran que 58,3% concuerdan plenamente, 25% concuerdan en parte y 16,7% se mostraron indiferentes. En cuanto a la contribución de las actividades para la evolución de los estudios y estímulo del aprendizaje, se constató que 45,9% concordaron plenamente, 33,3% concordaron en parte y 20,8% se mostraron indiferentes.

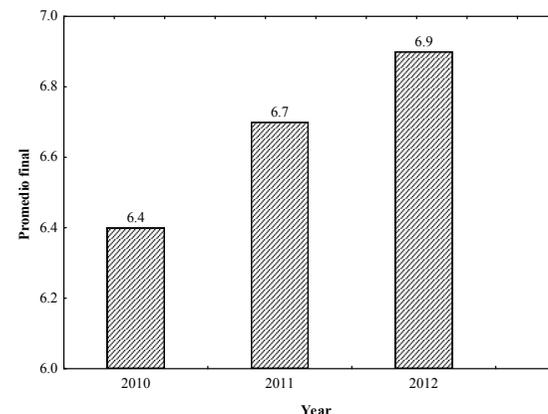


Figura 3: Promedio final de las calificaciones de la materia: Microbiología de Alimentos años 2010, 2011 y 2012.

Puntos importantes relacionados a la lectura de artículos, cuestiones aplicadas en clase, aclaraciones de dudas, y

acompañamiento de los becarios del proyecto también fueron interrogados. Los resultados mostraron que la aplicación de artículos contribuyó para el conocimiento en las áreas de trabajo, tanto como las aclaraciones de dudas. En los alumnos interrogados 95,8% creen que las cuestiones aplicadas contribuyeron en el aprendizaje de la materia de Microbiología de Alimentos; y 91,7% que el acompañamiento de los becarios en las clases prácticas, en auxilio al profesor, mejoró el aprovechamiento de las mismas.

En general, los estudiantes creen que el proyecto sumó conocimiento y que las conferencias, talleres, seminarios y las actividades motivacionales fueron bien interesantes y productivos.

CONCLUSIONES

Las actividades extra curriculares aplicadas a los estudiantes fueron sumamente importantes pues auxiliaron en su aprendizaje, y deben ser continuamente estimuladas visando una enseñanza mejor. También, deben ser utilizadas como forma de incentivo a la dedicación de los alumnos a los estudios y una mayor identificación con o curso elegido.

Las actividades desarrolladas permitieron una mejor enseñanza de la materia de Microbiología de Alimentos, despertando interés por parte de los alumnos a través de actividades no tradicionales ofrecidas en el desarrollo de la materia.

Además, el proyecto REUNI proporcionó al pos graduado mayor aproximación con los alumnos de la graduación, contribuyendo para su crecimiento en el área de la docencia, principalmente por el aprendizaje adquirido a través de la organización y preparación de las actividades realizadas, que servirán de base para su profesionalización docente.

BIBLIOGRAFÍA

Dias LSF, Oliveira AR. (2009). REUNI e seus aspectos: um estudo de caso na Universidade Federal de Minas Gerais. Anais do IX Colóquio Internacional sobre Gestão Universitária na América do Sul. Florianópolis.

Brasil, Ministério da Educação. REUNI: Objetivos, metas e diretrizes gerais. Disponível em: <http://reuni.mec.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=25&Itemid=28>. Acesso em: 22 de maio. 2014.

Kearney, C. (2011). Iniciativas para aumentar o Interesse dos Alunos na prossecução de Estudos e Carreiras Profissionais nos domínios da Ciência, Tecnologia, Engenharia e Matemática. Observatory for new Technologies and Education.

Silva Filho RLL, Motejunas PR, Hipolito O, Lobo MBCM. (2007). A evasão no ensino superior brasileiro. Cadernos de Pesquisa, 37: 641-659.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CAPES por la beca REUNI de Pos Graduación, que posibilito la realización de este trabajo; a los conferencistas y voluntarios que participaron de las actividades.

CONGELACIÓN DE FRUTOS MADUROS DE MAMÓN (*Carica papaya* L.)

Lovera, N.N.^{1,2}, Ramallo, L.², Salvadori, V.O.^{1,3}

1: Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET.

2: Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales, UNaM.

3: Depto. de Ing. Química, Facultad de Ingeniería, UNLP.

nancy.lovera@conicet.gov.ar

Resumen: En el presente trabajo se estudió el efecto de la impregnación con calcio en la calidad final de frutos de mamón (*Carica papaya* L.) congelados. Se emplearon frutas maduras, las que se seccionaron en cilindros de 10,5 mm de altura y 30 mm de diámetro. Fueron impregnadas en solución isotónica de lactato de calcio (1,5% p/p), a temperatura (45°C) y agitación (150 rpm) constantes, durante 4 y 8 horas. Se evaluaron distintos métodos de congelación: en freezer domiciliario, en túnel con circulación de aire y en N₂ líquido. Se determinó el color, el exudado y las propiedades mecánicas de las muestras, antes y después de la congelación. La evolución de la temperatura durante el proceso de congelación en túnel de aire se monitoreó con termocuplas. El tratamiento de impregnación provocó una disminución tanto de la temperatura de inicio de congelación como del tiempo de congelación. El pretratamiento con Ca tiene un efecto protector sobre las pérdidas por exudado (3-6% y 10-17% de exudado, con y sin pretratamiento respectivamente). La tensión máxima y la firmeza son sensiblemente mayores en la fruta congelada luego del pretratamiento con Ca que en

aquella sin impregnación con Ca. El cambio de color total fue similar en frutas pretratadas y sin pretratamiento.

Palabras clave: Calcio, Textura, Mamón, Congelación.

Abstract: In this work the effect of calcium impregnation pretreatments on the final quality of frozen papaya (*Carica papaya* L.) were studied. Ripe fruits were used, which were cut into cylinders of 10.5 mm height and 30 mm diameter. Fruit cylinders were dipped in isotonic calcium lactate solution (1.5% w/w), temperature (45 °C) and constant stirring (150 rpm), for 4 or 8 hours. Different freezing methods were evaluated: household freezer, tunnel and liquid N₂. Color, drip loss and mechanical properties of freezing-thawed samples were determined. The blast tunnel freezing was monitored with thermocouples. The impregnation treatment caused a decrease of both the initial temperature and the freezing time. Pretreatment with Ca has a protective effect on the drip loss, which is significantly reduced (3-6% versus 10-17%, with and without pretreatment, respectively). The mechanical properties (firmness) are substantially greater in the frozen fruit after pretreatment with Ca. The total color change was similar in fruit pretreated and without pretreatment.

Keywords: Calcium, Texture, Papaya, Freezing.

INTRODUCCIÓN

La papaya o mamón es un fruto de origen centroamericano que se cultiva en la región norte de Argentina, en la actualidad la mayor parte de su producción se destina a la elaboración de dulces (mamón en almíbar, fruta confitada, y mermeladas). Es un fruto de alto contenido de agua, rico en vitaminas A, C y en potasio. Estudios realizados con otros frutos tropicales (mango, ananá, etc.) informan que la congelación puede causar daños físicos que provocan disminución de la calidad (exudado, firmeza). Asimismo, es sabido que la impregnación con sales de calcio como tratamiento previo a otras etapas de procesamiento mejora las propiedades mecánicas de la fruta madura, sin alterar su color característico (Siramard y Charoenrein 2014).

Chauhan *et al.* (1999) estudiaron el efecto de los pretratamientos de escaldado en soluciones de azúcar y de inmersión en soluciones de Cl_2Ca y ácido ascórbico en muestras de ananá congelada, encontrando que el pretratamiento con Ca fue más efectivo para minimizar las pérdidas por exudado y en mantener la textura en láminas de fruta congeladas y descongeladas. Resende *et al.* (2002) estudiaron la impregnación al vacío con soluciones de hidrocoloides con y sin la adición de sacarosa y nitrato de calcio, como pretratamiento en la congelación de melón, atribuyendo el mantenimiento de la firmeza de la fruta a la presencia de iones calcio.

La adición de calcio (Cl_2Ca) y pectina es útil como pretratamiento de frutillas congeladas para mantener la textura y disminuir el exudado en frutas congeladas-

descongeladas (García-Berbari *et al.* 1998). Suutarinen *et al.* (2000) encontraron que el pretratamiento con Cl_2Ca estabiliza la estructura de los tejidos en frutillas congeladas. Galetto *et al.* (2010) estudiaron la congelación por inmersión en soluciones de Cl_2Ca de frutillas, y encontraron que la presencia del Ca en la fruta produjo una disminución de las pérdidas de agua por exudado durante la descongelación de las frutas. En la búsqueda de nuevos productos y técnicas de conservación de papaya, que permitan ampliar su campo de comercialización, se propone estudiar el efecto del pretratamiento de impregnación con calcio en la calidad final de la fruta de papaya congelada, evaluando distintos métodos de congelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Se trabajó con cinco frutas (F1-F5) de mamón (*Carica papaya* L.) de 76–100% de superficie amarilla (grado de maduración 5) (Pereira *et al.* 2009), de $1,68 \pm 0,28$ kg, adquiridas en el mercado minorista de la provincia de Misiones. Las frutas fueron lavadas con agua destilada y peladas con cuchillo de acero inoxidable. La pulpa se seccionó, con un sacabocados de acero inoxidable, en cilindros de $10,5 \pm 0,5$ mm de altura y 30 ± 1 mm de diámetro. Cada tratamiento completo de impregnación y congelación se efectuó con muestras de una misma fruta, con el objetivo de disminuir la variabilidad natural de las características fisicoquímicas del producto. De cada fruta se obtuvieron 50 cilindros de los cuales se seleccionó un lote de 40 muestras para los ensayos.

Pre-tratamiento: Impregnación con calcio

Una solución isotónica de sacarosa con 1,5% de lactato de calcio, a 45°C y en agitación constante (150 rpm), se utilizó como medio de impregnación. Estas condiciones de operación fueron seleccionadas debido a que proporcionan apropiados resultados de incorporación de calcio y firmeza en la fruta (Lovera *et al.* 2011). La solución fue isotónica con respecto al contenido de sólidos solubles de la fruta fresca con el fin de evitar los mecanismos de transferencia de agua (deshidratación osmótica o lixiviado). Los cilindros de fruta recién cortados fueron inmediatamente sumergidos en la solución de impregnación durante 4 y 8 h. Luego se retiraron de la solución de impregnación y se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada, cada vez con un volumen equivalente a tres veces el ocupado por el vegetal. Se tomaron al azar muestras para cuantificar propiedades mecánicas, color y humedad.

Congelación y descongelación

Muestras impregnadas durante 4 ó 8 h y sus respectivos controles (muestras de fruta fresca) se congelaron, empleando distintos equipos: i) un túnel de congelación con flujo de aire tangencial (-30°C y 3 m/s), ii) inmersión en nitrógeno líquido (-196°C), iii) freezer de tipo domiciliario (Whirlpool, WVG30D1, Brasil) a -20°C durante 24 horas.

Durante la congelación en túnel y en N₂ líquido se registró la temperatura mediante termocuplas dispuestas en el centro de las muestras y conectadas a un adquirente de datos conectado a una PC (Keithley, DAST TC, USA). Las muestras permanecieron en el equipo de congelación hasta que todas

las termocuplas indicaron temperaturas próximas al medio refrigerante. Además se determinó el coeficiente de transferencia de calor (h) midiendo el flujo de calor y la temperatura superficial de la fruta durante la congelación en túnel, mediante un sensor de flujo de calor (Omega Engineering Inc, HFS-4, USA).

La descongelación de las muestras se realizó en condiciones controladas, a 20°C durante 2 h en frascos cerrados, las mismas se destinaron a las determinaciones instrumentales de color, exudado y textura.

Determinación de la conductividad térmica

La conductividad térmica (k , W/m°C) de frutas de papaya frescas, con pretratamiento con Ca y congeladas en freezer domiciliario se determinó mediante el instrumento KD2 (Decagon Devices Inc., Pullman, WA). En las muestras frescas y con pretratamiento, la determinación se realizó a temperatura ambiente y en las muestras congeladas a la temperatura media del freezer (-20 °C). Las muestras fueron cilindros de papaya de 6 cm de alto y 2,5 cm de diámetro para adaptarlas al sensor del equipo, cilindro de acero inoxidable de 2,8 mm de diámetro y 60mm de largo.

Determinación de indicadores de calidad Humedad, contenido de sólidos solubles y pH.

El contenido de agua o humedad se determinó gravimétricamente, mediante secado de aproximadamente 7 g de fruta en estufa a 75 °C hasta pesada constante (48 h) (AOAC 1980). La determinación del contenido de sólidos

solubles se realizó empleando un refractómetro Hanna HI96801 (precisión $\pm 0,01$) (AOAC 1980).

La actividad acuosa fue determinada en un equipo Aqualab 3TE (Decagon Devices, Inc., Pullman, Estados Unidos). El equipo se calibró utilizando solución saturada de K_2SO_4 . La saturación ($a_w=1$) fue corroborada usando agua bidestilada. El pH se determinó mediante un peachímetro digital con electrodo de vidrio (TPA-III, Altronix, Argentina).

Tabla 1: Detalle y denominación de las frutas y los tratamientos.

Tratamientos	Denominación
4 h de impregnación con Ca	F1i4
4 h de impregnación con Ca+ congelación en freezer domiciliario	F1i4/FD
Fruta fresca + congelación en freezer domiciliario	F1/FD
8 h de impregnación	F2i8
8 h de impregnación con + congelación en freezer domiciliario	F2i8/FD
Fruta fresca + congelación en freezer domiciliario	F2/FD
4 h de impregnación	F4i4
4 h de impregnación con + congelación en N_2	F4i4/N
Fruta fresca + congelación en N_2	F4/N
8 h de impregnación	F3i8
8 h de impregnación con + congelación en N_2	F3i8/N
Fruta fresca + congelación en N_2	F3/N
4 h de impregnación con + congelación en	F4i4/T

túnel	
Fruta fresca + congelación en túnel	F4/T
8 h de impregnación	F5i8
8 h de impregnación con + congelación en túnel	F5i8/T
Fruta fresca + congelación en túnel	F5/T

Pérdida de líquido por exudado (drip loss)

Las muestras congeladas se colocaron sobre papel absorbente, en frascos cerrados para minimizar las pérdidas por evaporación y se dejaron descongelar a temperatura constante de 20 °C durante 2 h. Se registró el peso inicial, previo a la descongelación, de cada muestra (M_i), el peso del papel seco (w_0) y el peso del papel con el líquido de exudado (w_f). Las pérdidas de líquido por exudado se expresaron en gramos de líquido exudado por 100 gramos de fruta. Se determinó por triplicado.

$$DL = \frac{w_f - w_0}{M_i} * 100 \quad (1)$$

Propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas se realizó en muestras de fruta fresca y pretratada con Ca, antes y después del proceso de congelación-descongelación, utilizando un texturómetro (TA.XT2i, Texture Analyser, Stable Micro Systems, Reino Unido), equipado de una célula de carga 5 N. Se realizó un test de compresión utilizando una sonda de acero

inoxidable (P/75). La velocidad aplicada fue de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$ y la distancia recorrida fue del 70% del espesor de la muestra. Se realizaron 10 medidas por cada condición. En una computadora conectada al texturómetro, se registraron los datos de fuerza (N) y distancia (mm). Estos datos fueron convertidos a los parámetros de tensión (σ) y deformación (ϵ), suponiendo volumen constante durante la compresión. La tensión máxima ($\sigma_{\text{máx}}$) y el módulo de elasticidad (E) fueron determinados como el punto máximo y la pendiente inicial de la curva de tensión-deformación. La firmeza se determinó como la relación entre la tensión máxima y la deformación máxima ($\sigma_{\text{máx}}/\epsilon_{\text{máx}}$) (De Escalada Pla *et al.* 2009).

Color

El color superficial de las muestras se determinó con un colorímetro (Minolta CR-300, Osaka, Japón), obteniéndose los parámetros de cromaticidad a^* (rojo/verde) y b^* (amarillo/azul) y luminosidad L^* . Los valores presentados corresponden a la media de ocho mediciones. Con estos valores se calcularon los parámetros ángulo Hue, Chroma y ΔE a través de las ecuaciones (2), (3) y (4):

$$\text{Hue} = \tan^{-1}(b^*/a^*), \quad (\text{cuando } a^* > 0) \quad (2)$$

$$\text{Chroma} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3)$$

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (4)$$

Los valores ΔL^* , Δa^* y Δb^* fueron calculados como la diferencia entre cada valor de las muestras tratadas y el valor promedio de la fruta fresca correspondiente.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software STATGRAPHICS (Statgraphics 2009). Las diferencias entre las medias fueron consideradas a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Frutas Frescas

Se trabajó con cinco futas de papaya de grado de madurez similar con las características detalladas en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Características de las frutas de papaya utilizadas.

Fruta	pH	Sólidos Solubles (°Brix)	Humedad (g /100 g)	Aw
F1	5,50±0,1 8a	8,38±0,02 ab	91,36±0, 58a	0,993±0, 001a
F2	5,54±0,1 8b	8,13±0,01 a	91,82±0, 38a	0,994±0, 001a
F3	5,65±0,0 1c	8,50±0,01 b	91,62±0, 48a	0,987±0, 001b
F4	5,54±0,0 1a	9,60±0,01 c	87,69±0, 09b	0,994±0, 001a
F5	5,50±0,0 7b	8,45±0,01 b	89,05±1, 35b	0,988±0, 001b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa a $p < 0,05$

Curvas de congelación

El contenido de calcio en las muestras de fruta con 4 y 8 h de inmersión en solución isotónica de lactato de calcio fue $150 \pm 7,43$ y $238 \pm 26,3$ mg/100g, respectivamente.

En la **Tabla 3** se presentan las temperaturas de inicio de congelación (T_{cr}), de subenfriamiento (T_s) y el tiempo de congelación (t_c), los valores reportados son el promedio de los resultados registrados por las termocuplas durante la congelación en túnel.

El t_c se define como el tiempo transcurrido desde el ingreso de las muestras al túnel hasta que alcanzan una temperatura final de -18°C .

Tabla 3: Temperaturas de inicio de congelación, de subenfriamiento y tiempo de congelación

Tratamiento	T_{cr} ($^\circ\text{C}$)	T_s ($^\circ\text{C}$)	t_c (min)
-	-	-	$20,92 \pm 1,06_{ab}$
F4/T	$2,63 \pm 0,80_a$	$4,26 \pm 0,88_a$	$14,63 \pm 0,53_c$
F4i4/T	$4,95 \pm 0,24_b$	$7,74 \pm 0,00_a$	$24,46 \pm 2,53_a$
F5/T	$3,56 \pm 0,26_a$	$6,67 \pm 2,42_a$	$17,46 \pm 0,76_{bc}$
F5i8/T	$6,48 \pm 0,04_c$	$8,13 \pm 1,18_a$	

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa a $p < 0,05$

En la **Figura 2** se observa que se produce un descenso de la T_{cr} debido a la presencia del calcio y que el tiempo de impregnación no modifica el perfil de temperatura. Las curvas

experimentales de congelación también indican que la congelación es sensiblemente más rápida en las muestras impregnadas con Ca. Sin embargo, los valores medios de la conductividad térmica medida tanto en fruta fresca como en fruta pretratada y congelada, no indicaron un efecto significativo del calcio sobre esta propiedad termofísica. Los resultados obtenidos, detallados en la **Tabla 4**, son similares a los datos reportados por Teliset *et al.* 2007 para pulpa de papaya. El coeficiente de transferencia de calor (h) medido en el túnel fue de $5,35 \text{ W/m}^2\text{C}$.

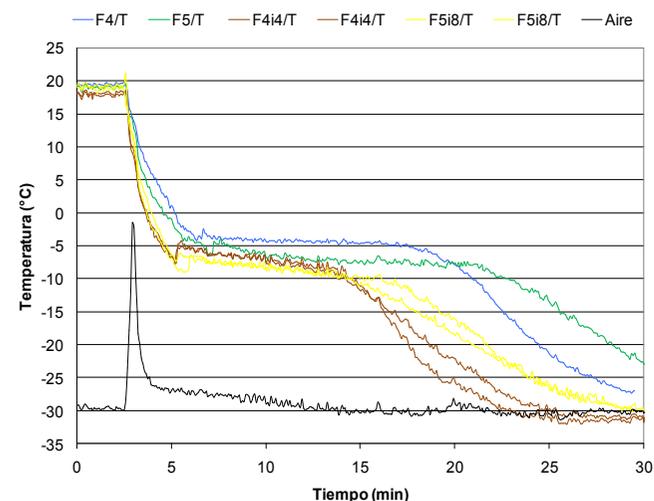


Figura 2: Curva de congelación en túnel de frutas impregnadas durante 4 u 8 h y sin impregnación

Tabla4: Conductividad térmica de muestras de fruta fresca e impregnadas con Ca, a temperatura ambiente y congeladas a -18°C.

	κ (W/m°C)	
	25°C	-20°C
Fruta fresca	0,48±0,01a	1,31±0,25b
Fruta con 4h de impregnación	0,49±0,03a	1,32±0,11b
Fruta con 8h de impregnación	0,51±0,01a	1,28±0,14b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa a $p < 0,05$

Cuantificación del exudado (DL)

Los tratamientos de impregnación con calcio redujeron las pérdidas por exudado en todos los casos, como se observa en la **Figura 3**. No se observó una influencia directa de la velocidad de congelación sobre las pérdidas de líquido, sin embargo al comparar los porcentajes de reducción del exudado de la fruta pretratada con Ca respecto de la fruta sin pretratamiento, se observa que el exudado se reduce en un 55%, 36% y 33% en las frutas congeladas en freezer domiciliario, en túnel y en nitrógeno líquido respectivamente.

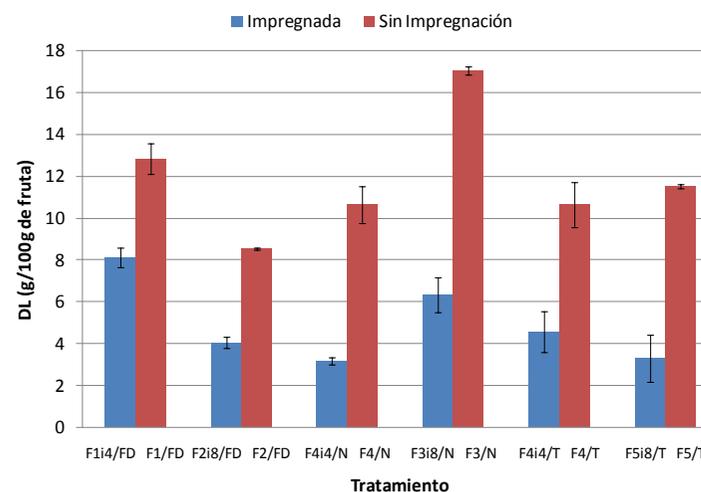


Figura3: Exudado de las muestras congeladas en distintas condiciones.

Propiedades mecánicas

En la **Tabla 5** se presentan las propiedades mecánicas de las frutas frescas, pretratadas (4 u 8 h) y congeladas en túnel y en freezer domiciliario. Durante la congelación en nitrógeno las muestras se fragmentaron, por lo que no pudo realizarse ensayos de compresión.

La congelación tiene un efecto negativo sobre la firmeza de la fruta, que es mayor cuanto más lenta es la congelación (muestras congeladas en freezer domiciliario). El tratamiento de impregnación con Ca contrarresta el efecto nocivo de la congelación sobre este parámetro. Un comportamiento similar puede observarse en el módulo de elasticidad E.

Por otra parte, los resultados muestran que el pretratamiento con Ca genera un aumento de la deformación a la máxima tensión de la fruta ($\epsilon_{m\acute{a}x}$) y que este efecto se incrementa, a su

vez, con el proceso de congelación. De igual manera, la impregnación con Ca provoca un aumento de los valores de la máxima tensión o resistencia a la ruptura de la fruta ($\sigma_{m\acute{a}x}$) y, si bien estos valores disminuyen con el proceso de congelación-descongelación, la fruta impregnada-congelada-descongelada presenta valores de $\sigma_{m\acute{a}x}$ mayores que la fruta fresca, lo que puede observarse como un marcado efecto protector del calcio sobre la firmeza de la fruta. Este efecto protector no fue observado por Siramard y Charoenrein 2014, quienes impregnaron mango con 1% de lactato de calcio como pretratamiento antes de la congelación. Los autores atribuyen este resultado a que durante la impregnación, aunque se pudieron haber formado pectatos de calcio, se produjo un aumento del contenido de humedad de la fruta por migración del agua, lo que se tradujo en una mayor formación de hielo durante la congelación, con su consecuente daño en la textura. En el presente estudio se utilizaron medios de impregnación isotónicos para evitar la transferencia de agua.

Tabla 5: Propiedades mecánicas de las frutas frescas, impregnadas y congeladas en túnel y en freezer domiciliario,

Tratamiento	$\sigma_{m\acute{a}x}$ (Pa)	$\sigma_{m\acute{a}x}$	E (Pa)	Firmeza (Pa)
F1	37,71±2,10 a	0,15±0,0 4a	304,21±80,6 0a	257,929
F1i4	81,78±5,94 b	0,44±0,0 8b	147,22±68,3 9b	186,010
F1i4/FD	63,68±14,9 8b	0,67±0,0 1c	17,10±10,87 c	95,167
F1/FD	3,65±837c	0,35±0,0 8b	3,06±1,31d	10,341

F2	29,10±0,65 a	0,14±0,0 0a	234,36±68,6 2a	208,656
F2i8	127,58±5,2 2b	0,43±0,0 9b	125,45±81,7 6ab	295,518
F2i8/FD	72,61±4,67 c	0,58±0,1 0c	35,56±11,57 b	124,519
F2/FD	5,77±0,33d	0,30±0,0 3d	4,22±0,68c	19,348
F4	50,65±6,30 a	0,20±0,0 1a	285,64±41,1 5a	247,311
F4i4	177,35±7,7 3b	0,52±0,0 9b	262,23±48,7 6a	339,243
F4i4/T	72,01±5,96 c	0,70±0,0 0c	20,13±8,64b	102,927
F4/T	12,39±2,66 d	0,34±0,0 8d	12,23±1,57b	36,270
F5	71,80±3,69 a	0,29±0,0 1a	249,40±36,6 4a	251,387
F5i8	175,22±11, 81b	0,55±0,0 4b	305,27±123, 79 a	317,251
F5i8/T	94,39±4,87 c	0,70±0,0 0c	42,69±11,43 b	134,911
F5/T	47,74±12,2 0d	0,51±0,1 2b	14,73±3,55c	94,428

Letras diferentes en la misma columna y para cada ensayo indican diferencia significativa a $p < 0,05$

Color

En la **Tabla 6** se muestran los resultados de color, estos indican que los tres modos de congelación empleados en este estudio condujeron a resultados similares, la congelación provoca un leve oscurecimiento de la fruta (disminuye L^* , los

parámetros a* y b* - no mostrados en la tabla- también disminuyen, en mayor medida lo hace el parámetro a* y consecuentemente cambia el parámetro Chroma). El cambio total de color, representado por el parámetro ΔE tomando como referencia la muestra fresca, también indica un efecto apreciable de la congelación, este cambio de color es similar en la fruta pretratada que en la fruta congelada sin pretratamiento con Ca.

Tabla 6: Parámetros de color de frutas frescas, impregnadas y congeladas con y sin impregnación.

Tratamiento	L*	Hue (H)	Chroma C	ΔE
F1	65,41± 2,40a	54,05± 2,24a	37,54±1, 33a	
F1i4	64,30± 1,02a	58,67± 2,26b	43,67±4, 78b	7,53±4 ,42a
F1i4/FD	58,53± 2,38b	58,13± 3,78b	52,69±4, 18c	17,46± 3,65b
F1/FD	58,65± 1,73b	53,69± 1,52a	48,60±1, 31d	13,08± 1,77c
F2	64,70± 1,87a	56,30± 1,51a	38,04±2, 90a	
F2i8	58,38± 3,31b	56,25± 2,42a	41,00±1, 94b	7,37±3 ,38a
F2i8/FD	58,53± 1,71b	57,75± 1,96a	50,72±0, 90c	14,29± 1,28b
F2/FD	59,43±	57,09±	49,95±3,	13,44±

	3,00b	2,75a	99c	4,17b
F4	61,24± 5,34a	54,76± 3,24a	34,47±2, 50ab	
F4i4	60,22± 2,45a	56,46± 1,24ab	35,97±2, 93b	4,03±1 ,36a
F4i4/N	54,38± 3,02b	58,28± 3,46bc	32,18±3, 52abc	8,32±3 ,38b
F4/N	51,60± 1,55bc	61,18± 2,30c	30,08±2, 25c	11,45± 1,53c
F4i4/T	50,57± 2,97c	56,52± 4,73ab	34,52±4, 36ab	11,75± 2,99c
F4/T	53,32± 2,88bc	55,24± 4,29ab	33,39±3, 86abc	9,17±2 ,50bc
F3	72,08± 4,11a	59,88± 5,46a	26,68±3, 10ab	
F3i8	68,67± 3,55a	68,20± 4,71b	29,07±2, 84b	7,47±1 ,57a
F3i8/N	56,95± 5,68b	66,61± 6,94b	28,73±2, 99b	16,33± 5,41b
F3/N	56,80± 3,82b	62,50± 4,89ab	25,41±1, 99a	15,73± 3,34b
F5	63,66± 4,12a	56,04± 6,14a	30,69±4, 37a	
F5i8	62,30± 2,35a	60,37± 3,74a	29,29±1, 46a	4,25±1 ,13a
F5i8/T	51,77± 3,57b	62,70± 4,05a	27,12±3, 09a	13,42± 3,24b
F5/T	49,41± 2,55b	57,73± 6,49a	30,15±5, 79a	15,60± 2,45c

Letras diferentes en la misma columna y para cada ensayo indican diferencia significativa a p<0,05

CONCLUSIONES

Los procesos de congelación/descongelación originan pérdidas de líquido por exudado y un marcado descenso en los valores de firmeza del tejido vegetal, efectos que se incrementan con la disminución en la velocidad de congelación. El proceso de impregnación con Ca de fruta madura y trozada, lista para el consumo, de *Carica papaya* tiene un efecto protector sobre las pérdidas por exudado y reducción de la firmeza del tejido vegetal durante la congelación/descongelación de las mismas. Por otra parte, el proceso de congelación/descongelación origina cambios en el color de la fruta, los que no son afectados por la impregnación con Ca ni por las condiciones de la etapa de congelación. Asimismo, las medidas experimentales de temperatura en función del tiempo de congelación señalan que la velocidad de congelación es mayor en las muestras impregnadas con Ca. Este hecho no pudo ser atribuido a cambios en la conductividad térmica del producto por efecto de la ganancia de Ca, puesto que no se registraron diferencias en los valores de esta propiedad termofísica de la fruta sin impregnar e impregnada con Ca. En conclusión, los resultados de este trabajo indican que el proceso de preservación de papaya por congelación de la fruta se ve beneficiado tanto en calidad final como en ahorro energético por un pretratamiento de inmersión en lactato de Ca.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 13thed. Washington. DC:AOAC.
- Chandrika G, Jansz E, Wickramasinghe N, Warnasuriya N. 2003. Carotenoids in yellow- and red-fleshed papaya (*Carica papaya* L). Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(12): 1279-1282.
- Chauhan OP, Shah A, Singh A, Raju PS, Bawa AS. 2009. Modeling of pre-treatment protocols for frozen pineapple slices. LWT - Food Science and Technology, 42: 1283-1288.
- De EscaladaPla MF, Campos CA, Gerschenson LN, Rojas AM. 2009. Pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poiret) mesocarp tissue as a food matrix for supplying iron in a food product. Journal of Food Engineering, 92: 361-369.
- Lovera NN, Buceta NN, Salvadori VO. 2011. Efecto del pretratamiento con sales de calcio sobre las propiedades nutricionales, de textura y color del mamón (*Carica papaya* L.). Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, CYTAL, Buenos Aires, Argentina.
- Pereira T, Gomes de Almeida PS, Goncalves de Azevedo I, Da Cunha M, Goncalves de Oliveira J, Gomes da Silva M, Vargas H. 2009. Gas diffusion in 'Golden' papaya fruit at different maturity stages. Postharvest Biology and Technology, 54: 123-130.
- Galetto CD, Verdini RA, Zorrilla SE, Rubiolo AC. 2010. Freezing of strawberries by immersion in CaCl₂ solutions. FoodChemistry, 123: 243-248.

Garcia-Berbari SA, Nunes-Nogueira J, Da Silva-Campos SD. 1998. Effect of different pre-freezing treatments on the quality of frozen strawberries variety Chandler. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 18: 82–86.

Resende JV, Cal-Vidal J. 2002. Frutos de melão submetidos a pré-tratamentos com hidrocolóides: efeitos do processo de congelamento sobre a microestrutura celular. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 22: 295-304.

Siramard S., Charoenrein, S. 2014. Effect of ripening stage and infusion with calcium lactate and sucrose on the quality and microstructure of frozen mango. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 2136-2141.

Statgraphics. Centurion XV. Statpoint Technologies. Inc. Warrenton VA. USA. 2009.

Suutarinen J, Heiska K, Moss P, Autio K. 2000. The effects of calcium chloride and sucrose prefreezing treatments on the structure of strawberry tissues. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology*, 33: 89–102.

TelisVRN, Telis-Romero J, Sobral PJA, Gabas AL. 2007. Freezing point and thermal conductivity of tropical fruit pulp: mango and papaya. *International Journal of Food Properties*, 10: 73-84.

Agradecimientos

Este trabajo se financió con fondos provenientes de ANPCYT (PICT 2013-1637), UNLP (111183) y CONICET.

EXTRACCIÓN POR PRENSADO DE ACEITE DE NUEZ: OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS Y ESCALADO INDUSTRIAL

Martínez M.L.¹, Minniti A.C.², Viglione Lara M.², Maestri D.M.¹

¹ Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV – CONICET), Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA – FCEfYN – UNC).

² Estudiantes de la carrera de Ingeniería Química – FCEfYN – UNC.

Av. Vélez Sarsfield 1611, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

marcelamartinez78@hotmail.com, mmartinez@efn.uncor.edu

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo optimizar las condiciones de extracción del aceite por prensado en frío para realizar una aproximación al escalado del proceso a nivel industrial. Se utilizaron dos prensas de tornillo (escala piloto e industrial). En base a experiencias realizadas a escala piloto y utilizando un diseño experimental de superficie de respuesta, se seleccionaron las variables contenido de humedad del material (5,5; 7,75; 10)% y diámetro de reducción (10, 12 y 14) mm para el proceso a escala industrial. La temperatura y velocidad de prensado se mantuvieron en 50 °C y (18 – 20) rpm respectivamente. Se evaluaron parámetros de rendimiento (rendimiento de extracción, cantidad de sólidos en el extracto) y de calidad química del aceite (índice de acidez y peróxidos, coeficientes de extinción (K_{232} , K_{270}) y

estabilidad oxidativa). Los rendimientos máximos de extracción a escala piloto e industrial fueron 89,3% (humedad 7,5%, reducción 5 mm) y 77,5% (humedad 7,21%, reducción de 10 mm) respectivamente. Las condiciones de extracción resultaron compatibles con la obtención de aceites de buena calidad química. Las extracciones realizadas indican que, independientemente de la escala del proceso, el nivel de hidratación del material resulta un factor fundamental para lograr la máxima recuperación de aceite.

Palabras clave: Aceite de nuez, Prensado en frío, Optimización, Calidad química, Rendimiento.

ABSTRACT

The objective of this study was to optimize the walnut oil extraction process by cold pressing in order to make an approach to industrial scale process. In pilot scale pressing experiments, a factorial arrangement was conducted in order to study the combined effects of seed moisture content (2.5, 4.5 and 7.5) % and pressing temperature (25, 50 and 70) °C on oil recovery and quality parameters. A 3^2 factorial experimental design was used to study the optimization process by response surface analysis for the industrial scale process. The independent variables considered were seed moisture content (5.5, 7.5, 10) % and restriction die (10, 12 y 14) mm. Screw press speed and barrel temperature were maintained at 20 rpm and 50 °C, respectively. The parameters evaluated were: oil yield, fines content in oil and oil quality. At pilot scale, highest oil recovery (89.3 % oil) was obtained at 7.5 % moisture content, 50 °C and 5 mm restriction die. At industrial scale, the optimal extraction conditions (77.5 % oil) were achieved with 7.21 % moisture content and 10 mm

restriction die. Regardless of the scale process the seed moisture content is the most important factor to maximized oil recovery.

Key words: Walnut Oil, Cold Pressing, Optimization, Chemical Quality, Yield.

INTRODUCCIÓN

El nogal (*Juglans regia* L.) pertenece a la familia *Juglandaceae*, orden Juglandales. Es una especie originaria de Asia central, de la región geográfica comprendida entre los Cárpatos y Afganistán, sur de Rusia y norte de India (Fernández-López *et al.*, 2000).

En Argentina y en la última década, el cultivo de nogal ha experimentado un crecimiento sostenido (aproximadamente del 22 %), principalmente en las provincias de Catamarca y La Rioja que aportan, en forma conjunta, cerca del 68 % de la producción nacional de nuez.

La nuez reúne la doble condición de ser un alimento rico tanto en energía como en proteínas de alta calidad. La semilla del nogal – que representa aproximadamente un tercio del peso del fruto entero – contiene entre un 63 y un 70 % de aceite. El mismo está compuesto fundamentalmente por triglicéridos y una pequeña proporción de ácidos grasos libres, fosfolípidos, material insaponificable y vitaminas liposolubles (Demir y Çetin 1999; Tsamouris *et al.*, 2002; Amaral *et al.*, 2003, 2004; Crews *et al.*, 2005; Ozkan y Koyuncu, 2005; Li *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008). Los ácidos grasos poliinsaturados representan entre el 65 y 75 %, los monoinsaturados entre el 15 y 25 %, mientras que los ácidos saturados no superan el 10 % del total de los ácidos grasos presentes en el aceite. Dos ácidos grasos poliinsaturados esenciales, linoleico y linolénico, están presentes en cantidades relativamente altas: 50 – 58 % y 11 – 19 %, respectivamente. Los ácidos monoinsaturados están representados casi exclusivamente por el oleico.

En Argentina, la producción de aceites comestibles ha mostrado en los últimos años un crecimiento sostenido y en la actualidad es una actividad económica de gran relevancia. Dentro de este gran rubro, la elaboración de aceites no tradicionales, como los de nuez, almendra o avellana, ofrece una oportunidad a ser explotada. Uno de los principales problemas para la producción del aceite de nuez radica en encontrar el método de extracción adecuado. Los rendimientos de extracción y la calidad del aceite obtenido son de suma importancia para determinar la viabilidad de su producción comercial.

En los últimos años, se ha intensificado el interés por la obtención de aceites a través de tecnologías de prensado. En el caso de la obtención de aceites vegetales no tradicionales, el prensado, tanto mediante prensa hidráulica como de tornillo, provee un método sencillo para obtener aceites de pequeños lotes de semillas (Wiesenborn *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003; Martinez *et al.*, 2014, 2013, 2012, 2008). A pesar que los rendimientos en aceite obtenidos mediante esta tecnología son menores que en la extracción por solvente, resulta apropiado para materiales con alto contenido en aceite, requiere instalaciones menos costosas e implica operaciones más seguras y de menor riesgo para el ambiente. El rendimiento en la extracción por prensa de tornillo depende de varios factores, entre ellos, el acondicionamiento del material, que consiste en una serie de operaciones como la limpieza, molienda, calentamiento, secado o humedecimiento hasta alcanzar el contenido de humedad óptimo (Singh y Bargale, 1990; Fils, 2000; Singh y Bargale, 2000; Wiesenborn, 2001; Singh *et al.*, 2002). La aplicación de un tratamiento térmico antes o durante el prensado generalmente mejora la extracción del aceite ya que

influye sobre la viscosidad del fluido y la resistencia mecánica de las partículas (Ward, 1976).

Singh y Bargale (2000), desarrollaron un expeller de dos etapas, en el cual analizaron la influencia de la humedad del material y de la temperatura de prensado sobre la cantidad de aceite extraído, relacionando estos parámetros con el tiempo de prensado y la energía consumida. En concordancia con Singh *et al.* (2002) y Zheng *et al.* (2003), concluyeron que existe un porcentaje de humedad óptimo para lograr la máxima extracción de aceite. Asimismo, observaron que la energía consumida disminuye al aumentar el contenido de humedad, lo cual fue atribuido a una reducción del coeficiente de fricción por efecto de una mayor plasticidad del material.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue optimizar las condiciones de extracción del aceite de nuez por prensado en frío con vistas a realizar una aproximación al escalado del proceso a nivel industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con nueces de la variedad Franquette (contenido de aceite del 74 % (p/p) (Soxhlet, base seca) y humedad inicial del 4 % (p/p) y nueces producto del descarte de la industria confitera (contenido de aceite del 69 % (p/p) (Soxhlet, base seca) y humedad inicial del 3,2% (p/p)), a escala piloto e industrial, respectivamente.

Acondicionamiento de la humedad

La humidificación se llevó a cabo según la metodología propuesta por Singh y Bargale (2000). El agua se agregó a la muestra (material molido) mediante aspersión. Luego se colocó en un recipiente metálico con cierre hermético y se

almacenó durante 48 h hasta alcanzar el equilibrio. El recipiente fue sometido a agitación, a intervalos regulares de tiempo, para asegurar una distribución uniforme de la humedad en el material. Mientras que, para reducir el contenido de humedad del material, las muestras se colocaron en estufa de vacío a 25 °C. Antes de ingresar a la prensa, se determinó el contenido de humedad de cada muestra.

Condiciones de extracción del aceite de nuez

Prensa de tornillo escala piloto (Komet, Modelo CA 59 G).

Se llevó a cabo un diseño experimental compuesto por dos factores: temperatura de extracción (25, 50 y 70)°C y humedad del material (2 - 3, 4 - 5 y 7 - 8 %). El tamaño de partícula (2,4 - 4,8 mm). La velocidad de prensado (20 rpm) y el diámetro de boquilla (5 mm) se establecieron en función de ensayos preliminares. El ajuste de la temperatura de prensado del material se realizó mediante calentamiento en estufa. La temperatura del barral se ajustó a cada una de las temperaturas de trabajo mediante una camisa termostatazada en forma de anillo que envolvía al mismo. Cada ensayo (combinación contenido de humedad del material x temperatura de prensado) se realizó por triplicado.

Prensa de tornillo escala industrial (Doble husillo modelo DD 85)

Se llevó a cabo un diseño experimental factorial aleatorizado compuesto de 3 niveles y 2 factores (3^2). Las variables de proceso estudiadas fueron: humedad del material (5,5; 7,5; 10) % y diámetro de la reducción (10, 12 y 14) mm. El tamaño de partícula (2,4 - 4,8 mm). La temperatura de extracción y la

velocidad de prensado, se mantuvieron en 50 °C y 20 rpm, respectivamente. La temperatura del barral se ajustó a cada una de las temperaturas de trabajo mediante una camisa termostalizada en forma de anillo que envolvía al mismo.

En ambos casos, la purificación (eliminación de sólidos) se realizó mediante filtro prensa.

El esquema de ambas prensas está representado en la **Figura 1**.

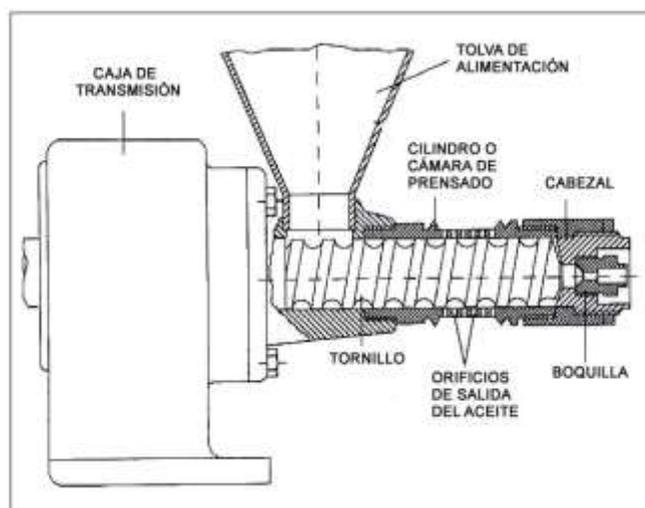


Figura 1: Esquema de la prensa de tornillo helicoidal utilizada para la extracción del aceite.

Cantidad total de aceite extraído (% AE)

Se calculó en base al contenido inicial de aceite en el material de partida (X_i) y al contenido de aceite residual en la torta (X_f). Los mismos se determinaron según el método oficial AOCS Ba 3-38 (AOCS, 2009).

$$AE = \left[\frac{x_i - x_f}{x_i} \right] \times 100$$

Cantidad de sólidos en el extracto (%SE)

Los aceites obtenidos del prensado se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min. Los sólidos precipitados fueron recuperados, lavados con hexano, secados y pesados en balanza analítica (sensibilidad 0.1 mg). El porcentaje de sólidos en el aceite se calculó por diferencia de pesada.

Calidad de los aceites obtenidos

A cada una de las muestras de aceite obtenidos se les determinó los índices generales de calidad en lo relativo al grado de acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específica (k232 y k270) (AOCS, 2009). El tiempo de inducción (h) de los aceites se determinó mediante el método Rancimat (caudal de aire 20 L/h, temperatura 110 °C) (Frankel, 2005).

Análisis estadístico de los resultados

A escala piloto la base informática utilizada fue el programa INFOSTAT versión 2009p. Se realizó análisis de la varianza (ANOVA). En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), se utilizó

un test a posteriori de comparaciones múltiples (LSD). Mientras que a escala industrial, el análisis de las variables de interés se realizó con la metodología de superficie de respuesta utilizando el programa STATGRAPHICS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción Escala Piloto

En la **Tabla 1**, **Figura 2** y **Figura 3** se muestran los porcentajes de aceite extraído (%AE) en las diferentes condiciones de humedad y temperatura. El %AE se incrementó al aumentar el contenido de humedad de la semilla. El ANAVA a dos vías indicó que la humedad del material fue la principal fuente de variabilidad para este parámetro, mientras que la temperatura no fue significativa. La extracción a 50°C y 7,5% de humedad arrojó el porcentaje más alto de AE (89,3 % respecto del total de aceite disponible). Bajo estas condiciones de humedad, un incremento en la temperatura de 50 a 70°C produjo una disminución significativa en AE. Se observó un excesivo endurecimiento del material a la salida de la prensa, producto del calentamiento, la aglutinación y compactación en el interior del dispositivo de prensado, lo que daría origen a una matriz menos porosa y a una menor fluidificación del aceite. A medida que aumentó el % AE se produjo la consecuente disminución del % aceite residual (AR) en la torta; por lo tanto, la extracción a 50 °C y 7,5 % de humedad fue la que arrojó el porcentaje más bajo de AR (10,6 % respecto del total de aceite disponible).

Tabla 1: Efecto de distintos tratamientos sobre los rendimientos de prensado y parámetros de calidad del aceite de nuez a escala piloto.

Parámetros	Tratamientos [contenido de humedad (%) – temperatura de prensado (°C)]								
	2,5% 25°C	2,5% 50°C	2,5% 70°C	4,5% 25°C	4,5% 50°C	4,5% 70°C	7,5% 25°C	7,5% 50°C	7,5% 70°C
AE	61,0 ^a ± 3,9	64,7 ^b ± ±0,5	65,4 ^b ± 1,4	73,0 ^d ± ±2,1	68,7 ^c ± 2,4	87,8 ^g ± ±0,3	83,5 ^f ± 0,2	89,3 ^g ± 0,6	78,3 ^e ± 0,5
AR	389 ^g ± 3,9	35,2 ^f ± 0,5	34,5 ^f ± 1,4	26,9 ^d ± ±2,1	31,2 ^e ± 2,4	12,1 ^a ± 0,3	16,4 ^b ± ±0,2	10,6 ^a ± 0,6	21,6 ^c ± 0,5
SE	13,9 ^e ± 1,2	16,8 ^f ± 1,4	16,7 ^f ± 0,6	13,1 ^e ± ±1,2	11,4 ^d ± 1,00	7,88 ^b ± ±0,5	9,65 ^c ± 1,2	7,87 ^b ± 0,5	5,74 ^a ± 0,2
GA	0,07 ^a ± 0,01	0,07 ^a ± 0,01	0,14 ^d ± 0,01	0,07 ^a ± ±0,01	0,09 ^{bc} ± ±0,01	0,31 ^e ± 0,01	0,09 ^c ± 0,01	0,10 ^c ± 0,01	0,46 ^f ± 0,01
k ₂₃₂	1,02 ^b ± 0,01	1,07 ^d ± ±0,01	1,17 ^e ± 0,02	0,99 ^a ± ±0,01	1,05 ^c ± 0,01	1,17 ^e ± 0,01	1,02 ^b ± ±0,02	1,03 ^{bc} ± ±0,02	1,17 ^e ± 0,01
k ₂₇₀	0,09 ^d ± 0,01	0,09 ^d ± ±0,01	0,09 ^d ± 0,01	0,06 ^a ± ±0,01	0,08 ^{cd} ± ±0,01	0,09 ^d ± ±0,01	0,06 ^a ± 0,01	0,07 ^{bc} ± ±0,01	0,08 ^{cd} ± ±0,01
TI	3,2 ^{bcd} ± ±0,04	3,3 ^{cd} ± 0,06	3,1 ^{abc} ± ±0,04	3,2 ^{bcd} ± ±0,2	3,3 ^{cd} ± 0,14	2,9 ^a ± 0,01	3,3 ^{cd} ± 0,11	3,2 ^{bcd} ± 0,07	3,0 ^{ab} ± 0,09

Abreviaturas y unidades: AE, aceite extraído (%); AR, aceite residual (%); SE, sólidos en el extracto (%); GA, grado de acidez (% ácido oleico); TI, tiempo de inducción (h). Valores medios (n = 3) ± desvío estándar. Valores medios para cada parámetro seguidos por la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre los tratamientos.

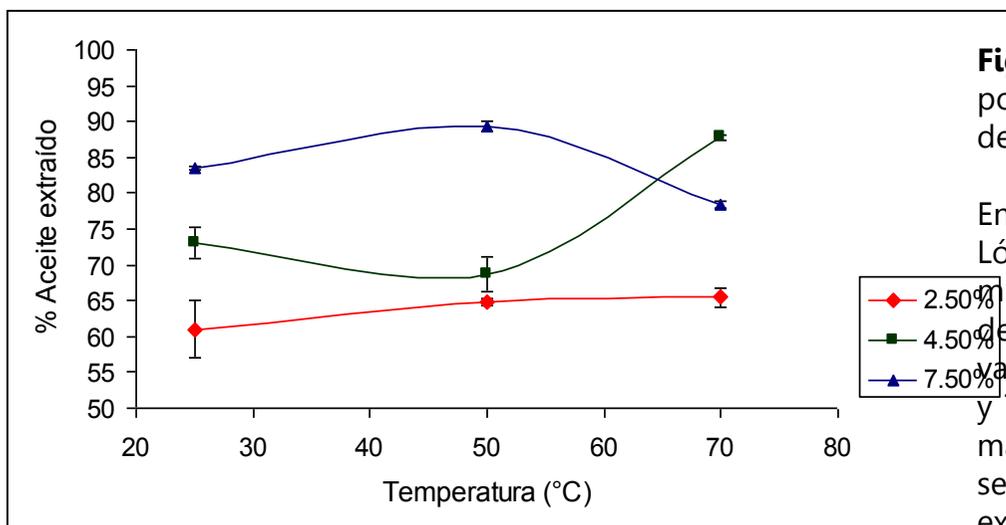


Figura 2: Relación entre el porcentaje de aceite extraído y la temperatura de prensado a diferentes contenidos de humedad.

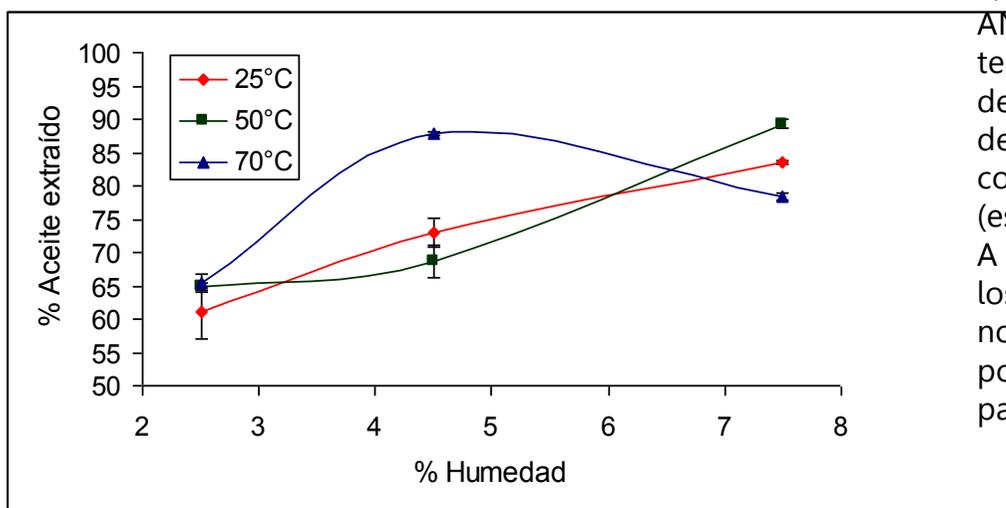


Figura 3: Relación entre el porcentaje de aceite extraído y el porcentaje de humedad del material a diferentes temperaturas de prensado.

En relación al contenido de sólidos (SE) en el extracto, Vargas-López *et al*, (1999) y Singh *et al*, (2002) han observado que el mismo se incrementa al disminuir el contenido de humedad del material (semillas de Crambe). En el presente estudio, SE varió entre 5,7 y 16,8 %. El menor valor fue obtenido a 7,5 % H y 70 °C. Bajo estas condiciones, la torta de prensado se torna más compacta provocando que una menor cantidad de sedimentos atraviesen los orificios del barral y sean co-extraídos con el aceite.

Los aceites obtenidos mediante los distintos tratamientos mostraron variaciones significativas para todos los parámetros químicos evaluados (tabla 1). Se observaron incrementos en valores de acidez (0,08 a 0,30 % ácido oleico) y k_{232} (1,01 a 1,17), con el aumento de la temperatura de prensado. El ANAVA a dos vías permitió confirmar estas tendencias: la temperatura del proceso de extracción fue la principal fuente de variabilidad para los parámetros mencionados. Se detectaron diferencias menores entre los tratamientos en el contenido de trienos conjugados y tiempos de inducción (estabilidad oxidativa).

A juzgar por los resultados obtenidos en el presente trabajo, los aceites de nuez obtenidos por prensado a 25, 50 y 70 °C no presentan mayores diferencias en su composición química por lo que, en principio, esta metodología resulta asequible para la extracción de aceites de buena calidad.

Extracción a escala industrial

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de aceite extraído (%AE) para cada ensayo realizado. El máximo porcentaje obtenido fue de 80,4% para la combinación 7,75% humedad y reducción de 10 mm. Como se observa en la Figura 4, el %AE aumenta al aumentar el contenido de humedad en la semilla hasta un determinado punto, presentando un máximo y luego una disminución en el %AE. Esto puede deberse a que el incremento en el contenido de humedad de la semilla aumenta la plasticidad de la matriz, lo cual mejora los rendimientos extracción hasta un cierto valor de humedad a partir del cual se dificulta el prensado por efectos de empaste y obstrucción de la prensa. Las reducciones más pequeñas generan mayor resistencia y compresión al material, incrementado el % AE. En todos los casos se obtuvieron aceites de calidad química aceptable ya que los parámetros están dentro de los valores aceptables: GA < 0,17 (% ácido oleico), IP < 1 meq de O₂/kg aceite, k₂₃₂ < 2,10, k₂₇₀ < 0,18.

Tabla 2: Efecto de distintos tratamientos sobre los rendimientos de prensado y parámetros de calidad del aceite de nuez a escala industrial.

Tratamientos		Parámetros							
H	B	AE	AR	F	Caudal	IP	IA	k ₂₃₂	k ₂₇₀
7,75	12	62,16	47,84	15,13	0,10	1,090	0,070	2,074	0,174
7,75	10	80,39	29,31	11,52	0,06	0,918	0,073	2,233	0,190
7,75	12	60,37	45,31	16,46	0,12	0,750	0,068	2,086	0,189
7,75	12	63,35	44,79	15,06	0,11	0,849	0,067	2,041	0,176
10	12	60,58	48,00	13,89	0,10	1,042	0,065	2,124	0,179
5,5	10	73,29	40,16	13,06	0,09	0,809	0,059	2,128	0,174
10	10	68,63	40,90	12,81	0,09	1,137	0,081	2,111	0,173

5,5	12	56,30	51,94	14,71	0,17	0,653	0,103	1,947	0,159
7,75	12	63,35	44,79	15,06	0,10	0,849	0,067	2,041	0,176
7,75	14	63,02	46,06	14,16	0,09	0,927	0,166	1,978	0,154
7,75	12	63,35	44,79	15,06	0,10	0,849	0,067	2,041	0,176
10	14	67,76	40,86	13,13	0,06	1,086	0,069	2,100	0,175
5,5	14	55,57	52,64	15,14	0,09	0,936	0,124	1,935	0,164

Abreviaturas y unidades: H, humedad (%); B, diámetro de reducción (mm); AE, aceite extraído (%); AR, aceite residual (%); SE, sólidos en el extracto (%); caudal (kg/h); IP, índice de peróxidos (meq de O₂/kg de aceite); GA, grado de acidez (% ácido oleico).

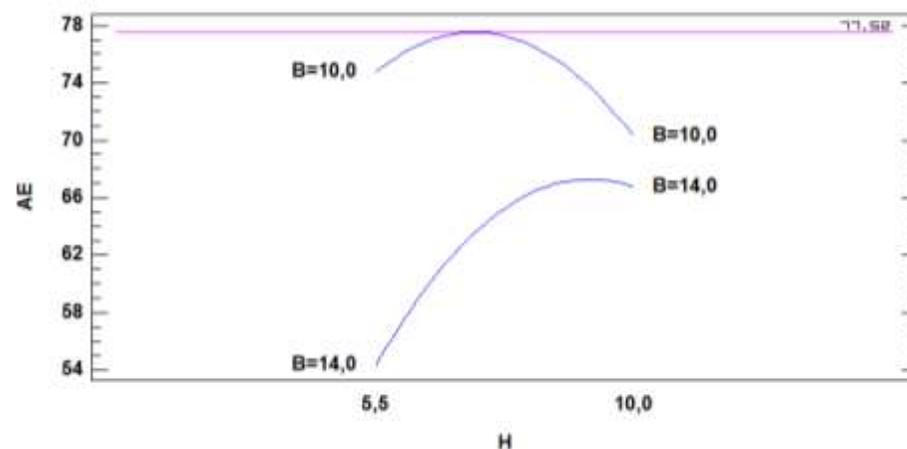


Figura 4: Rendimientos en función del porcentaje de humedad a diámetro de reducción constante.

El análisis estadístico mostró que la humedad de la semilla y la reducción (boquilla) afectaron significativamente el rendimiento de aceite extraído ($p < 0,05$).

La ecuación del modelo ajustado es:

$$AE = 430,864 + 4,06433 \cdot H - 61,5551 \cdot B - 0,930554 \cdot H^2 + 0,936222 \cdot H \cdot B + 2,13764 \cdot B^2$$

El coeficiente de determinación del modelo fue capaz de explicar 94,5 % de la variabilidad de los datos. La humedad de la semilla y la reducción tuvieron un efecto lineal positivo y negativo, respectivamente. Por otro lado, ambos factores presentaron un efecto cuadrático negativo y positivo, respectivamente. A su vez, se observó un efecto cruzado positivo entre humedad y reducción.

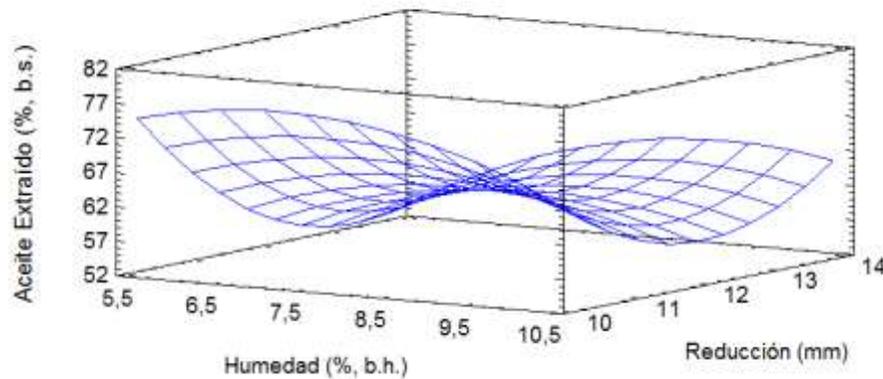


Figura 5: Efectos del contenido de humedad y la reducción sobre el rendimiento de aceite.

La combinación de niveles de los factores que sugiere un máximo en el rendimiento de aceite dentro de los valores

experimentales fue: 7,75 % humedad de la semilla y 10 mm de reducción de la prensa. Esta combinación de factores se llevó a cabo siguiendo los procedimientos mencionados. Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas entre el valor estimado por el modelo (77,5 % AE) y el valor experimental observado (80,4 %AE) lo cual sugiere un buen ajuste del modelo a los datos experimentales.

CONCLUSIONES

La pulpa de nuez por sus cualidades físicas (tamaño y dureza) constituye un material apropiado para la extracción del aceite por prensado, pero debe ser acondicionado previamente para lograr condiciones (tamaño de partícula, contenido de humedad, temperatura) adecuadas que permitan optimizar el proceso, en términos de rendimiento y calidad del producto.

Las experiencias de extracción por prensado a escala piloto permitieron determinar un rango de tamaño de partícula (2,4 – 4,8 mm) óptimo para la alimentación de la prensa. Los tratamientos (contenido de humedad x temperatura) aplicados a la extracción de este material, indicaron que el contenido de agua resulta un factor fundamental para lograr la máxima recuperación de aceite, lográndose rendimientos de casi el 90 % con materiales conteniendo 7,5 % de humedad, extraídos a 50 °C. La influencia de la temperatura es de menor significación. Sin embargo, con el contenido de humedad indicado anteriormente, un aumento de la temperatura de 50 a 70 °C provoca una merma en el rendimiento como consecuencia de la aglutinación y compactación del material en el interior del dispositivo de prensado, lo que daría origen a una matriz menos porosa y a una menor fluidificación del aceite.

El diseño factorial aleatorizado de 3 niveles y 2 factores (3^2) permitió determinar la combinación adecuada de variables para la optimización del proceso de extracción de aceite de

nuez a escala industrial. Los mayores rendimientos de extracción se obtuvieron bajo las siguientes condiciones de proceso: 7,21 % de humedad, 50 °C y 10 mm de reducción de la prensa.

Las experiencias de extracción realizadas indican que, independientemente de la escala del proceso, el nivel de hidratación del material resulta un factor fundamental para lograr la máxima recuperación de aceite.

Finalmente, bajo todas las condiciones extractivas analizadas se obtuvieron aceites cuya composición química resultó dentro de los rangos habituales encontrados en aceites vegetales comestibles.

BIBLIOGRAFÍA

Amaral JS, Casal S, Pereira JA, Seabra RM, Oliveira BPP, 2003, Determination of sterol and fatty acid compositions, oxidative stability, and nutritional value of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars grown in Portugal, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7698-7702.

Amaral JS, Cunha SC, Alves MR, Pereira JA, Seabra RM, Oliveira BPP, 2004, Triacylglycerol composition of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars: Characterization by HPLC-ELSD and chemometrics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7964-7969.

AOCS 2009, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society, Ed, AOCS Press, Champaign, USA.

- Crews C, Hough P, Godward P, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W, 2005, Study of the main constituents of some authentic walnut oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4853-4860.
- Demir C, Cetin M, 1999, Determination of tocopherols, fatty acids and oxidative stability of pecan, walnut and sunflower oils, *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 95 (7): 278-282.
- Fernández-López J, Aleta N, Alía R, 2000, Forest genetic resources conservation of *Juglans regia* L, IPGRI, Rome, Italy.
- Fils JM, 2000, The production of oils, En: *Edible oil processing* (Hamm, W,, Hamilton, R,J,, Eds,), Sheffield Academic Press, Sheffield, England, pp, 47-78.
- Frankel EN, 2005, *Lipid oxidation*, Ed, Barnes & Associates, Bridgwater, England.
- Li L, Tsao R, Yang R, Kramer JKG, Hernández M, 2007, Fatty acid profiles, tocopherol contents, and antioxidant activities of hearnut (*Juglans ailanthifolia* var, *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L,), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1164-1169.
- Martínez ML, Penci MC, Marin MA, Ribotta PD, Maestri DM, 2013, Screw press extraction of almond (*Prunus dulcis* (Miller) D,A, Webb): Oil recovery and oxidative stability, *Journal of Food Engineering*, 119: 40-45.
- Martinez ML, Mattea MA, Maestri DM, 2008, Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil, *Journal of Food Engineering*, 88: 399-404.
- Martínez ML, Marín MA, Salgado Faller CM, Revol J, Penci MC, Ribotta PD, 2012, Chia (*Salvia hispanica* L,) oil extraction: study of processing parameters, *Food Science and Technology*, 47: 78-82.
- Martinez ML, Maestri DM, 2014, Extracción y caracterización de aceite de nuez (*Juglans regia* L,): influencia del cultivar y de factores tecnológicos sobre su composición y estabilidad oxidativa, ISBN-13: 978-3-639-55745-9, Editorial Publicia.
- Ozkan G, Koyuncu MA, 2005, Physical and chemical composition of some walnut (*Juglans regia* L,) genotypes grown in Turkey, *Grasas y Aceites*, 56 (2): 141-146.
- Pereira JA, Oliveira I, Sousa A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, 2008, Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L,) cultivars, *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2103-2111.
- Singh J, Bargale PC, 1990, Mechanical expression of oil from linseed, *Journal of Oilseeds Research*, 7: 106-110.
- Singh J, Bargale PC, 2000, Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression, *Journal of Food Engineering*, 43 (2): 75-82.
- Singh KK, Wiesenborn DP, Tostenson K, Kangas N, 2002, Influence of moisture content and cooking on screw pressing of crambe seed, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79 (2): 165-170.
- Tsamouris G, Hatziantoniou S, Demetzos C, 2002, Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L,), *Z, Naturforsch*, 57: 51-56.
- Vargas-Lopez JM, Wiesenborn D, Tostenson K, Cihacek L, 1999, Processing of crambe for oil and isolation of erucic acid, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76: 801-809.
- Ward JA, 1976, Processing high oil content seeds in continuous press, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 53: 261-264.
- Wiesenborn D, Doddapaneni R, Tostenson K, Kangas N, 2001, Cooking indices to predict screw-press performance for crambe seed, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 78 (5): 467-471.

Zheng Y, Wiesenborn DP, Tostenson K, Kangas N, 2003, Screw pressing of whole and dehulled flaxseed for organic oil, Journal of the American Oil Chemist's Society, 80 (10): 1039-1045.

AGRADECIMIENTOS

Este desarrollo pudo llevarse a cabo gracias a los subsidios otorgados por SECyT-UNC, CONICET, Ministerio de Educación-Secretaría de Políticas Universitarias y a las empresas Aceites del Desierto SRL y Proser SRL.

ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE ORUJOS TINTOS
VARIEDAD MALBEC SOBRE MATRICES
FARINÁCEAS EN ATMÓSFERA CONTROLADA DE
DISTINTAS ACTIVIDADES ACUOSAS

Masciarelli R, Lucero H, Silvester SA, Bonfigli M, Balzarini MF.

Centro de Investigaciones y Desarrollo en Tecnología de los Alimentos (CIDTA). Facultad Regional Rosario. Universidad Tecnológica Nacional. Zeballos 1341, Rosario, Santa Fe, Argentina.

Resumen

Los orujos de vides tintas (variedad malbec) se deshidrataron mediante estufa con recirculación de aire a 60 °C, luego se molieron hasta obtener una harina. Se prepararon galletitas con 20 y 10 % de harina de orujos tintos y galletitas testigos (0 % de harina de orujos tintos) las cuales fueron sometidas a atmosfera controlada con actividades acuosas (A_w) de 80 y 40 % de HR respectivamente. Se evaluaron en el tiempo el contenido de flavonoides totales (CFT), DPPH* residual y el contenido de antocianinas totales (AT). Los mayores valores de CFT en función del tiempo se obtuvieron para las galletitas con 20 % de harina de orujos tintos para la $A_w=80$ % de HR. Con respecto al DPPH* residual, los valores alcanzados para la atmosfera controlada con $A_w=40$ % de HR, estuvieron por encima de la $A_w=80$ % de HR. Con referencia a los valores de AT, al cabo de los 60 días los correspondientes a la atmosfera controlada con $A_w=40$ % de HR, se encontraron por encima de los con $A_w=80$ % de HR.

De acuerdo a los resultados obtenidos la harina de orujos tintos puede emplearse como aditivo para reforzar la calidad nutricional de los alimentos.

Palabras claves: orujos tintos, antioxidantes, DPPH* residual

Abstract

Red grape marc (malbec variety) were dehydrated by recirculating air dry oven at 60 ° C , then ground to obtain a flour. Cookies prepared with 20 and 10% of marc red flour and cookies witnesses (0% of marc red flour) which were subjected to controlled atmosphere with water activities (A_w) of 80 and 40 of RH respectively. Total flavonoid content (TFC), DPPH * residual and total anthocyanins (TA) were evaluated over time. The highest values of TFC in function of time were obtained for the cookies with 20 % of marc red flour to the water activity of 80% of RH. Regarding DPPH* residual, the values obtained for the controlled atmosphere with $A_w=40$ % of RH were above the $A_w=80$ % of RH. With reference to the values of AT, after 60 days corresponding to the atmosphere with $A_w=40$ % were found above with $A_w = 80$ % RH. According to the results obtained marc red flour can be used as an additive to enhance the nutritional quality of food.

Keywords: Red grape marc, antioxidants, DPPH* residual.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 4 billones de personas, alrededor del 80 % de la población mundial, utiliza plantas medicinales para algún aspecto del cuidado primario de su salud. Los alimentos consumidos contienen una gran variedad de fitoquímicos, y a través de la ciencia moderna se han reconocido algunos de ellos como alimentos funcionales o nutraceuticos, como ejemplo de esto se conoce el té verde y la soya. Hoy en día se redescubre la utilidad de las hierbas medicinales como suplementos alimenticios de origen botánico que son potencialmente importantes en los efectos preventivos y medicinales. Todas las plantas contienen familias de compuestos relacionados, llamados metabolitos secundarios, que interactúan y dan como resultado efectos biológicos. (Heber, 2007; Sarker *et al.*, 2006)

El avance de la ciencia y la tecnología han permitido conocer más y mejor la relación entre la dieta humana y la salud. En este sentido, en los últimos años se han estudiado ampliamente los compuestos presentes en la uva (Heber, 2007), siendo las estructuras más reportadas: proantocianidinas monoméricas, diméricas y triméricas así como sus derivados acilados (Ugartondo *et al.*, 2007, Thimothe *et al.*, 2004; Cortell *et al.*, 2007; Kammerer *et al.*, 2004; Llópiz *et al.*, 2004). Así mismo se han evaluado las propiedades biológicas tanto de extractos de uva como de compuestos derivados de ella, encontrándose que poseen actividad antioxidante, citotóxica, antígenotóxica y antiangiogénica (Ugartondo *et al.*, 2007; Llópiz *et al.*, 2004).

Las agroindustrias producen una gran cantidad de subproductos por año, generalmente considerados como residuos pero que pueden llegar a ser fuente de compuestos con actividad biológica. En los últimos años se ha estudiado la posible aplicación de subproductos de la industria agroalimentaria como el orujo de manzana, el cual ha sido utilizado como materia prima para generar enzimas, compuestos aromáticos, etanol, ácidos orgánicos y polisacáridos (Vendruscolo *et al.*, 2009) o como el orujo de oliva, que ha resultado ser un excelente bioabsorbente, removedor de reactivos textiles en agua (Akar *et al.*, 2008), antitrombótico, antiaterosclerótico (Tsantila *et al.*, 2007). Con el objetivo de darle una aplicación a este tipo de residuos se ha trabajado con orujos de arándano, tomate y uva (Khanal *et al.*, 2009). Por otro lado, la industria vitivinícola en general, como parte del proceso de elaboración de vino tinto produce un subproducto sólido llamado "orujo", el cual está constituido por semilla, hollejo y tallos de uva el cual generalmente se desecha o en algunos casos se utiliza como forraje para ganado.

Los orujos de uvas obtenidos luego del prensado en la fabricación de vinos, constituyen una fuente de antioxidantes naturales, constituidos por compuestos polifenólicos que a su vez presentan propiedades anticancerígenas, antitrombóticas y antihepatotóxicas.

Desde hace algunos años, la situación de enfermedades cardiovasculares en Francia llamó la atención mundial, a partir del proyecto denominado MONICA, organizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que se basó en un monitoreo a nivel mundial de enfermedades coronarias, indicaron que Francia a pesar de poseer una dieta alta en la ingesta de grasas saturadas, presentó uno de los menores

índices de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, y que dicha paradoja se podía deber al alto consumo de vino tinto, lo cual derivó en el inicio de una gran cantidad de estudios que finalmente concluyeron que en realidad el efecto benéfico que obtenían del vino tinto eran sus compuestos, de ésta manera se determinó la presencia de polifenoles en el vino, los cuales provenían de la uva, (Renaud and Lorigeril, 1992) iniciando así una variedad de estudios con los polifenoles de la uva. La propiedad preponderante en los compuestos presentes en la uva, ya sea extractos de partes de ésta, vino tinto o el fruto completo, es mayoritariamente antioxidante. Los compuestos polifenólicos de la uva poseen en su estructura química una gran variedad de grupos –OH, lo cual se relaciona con su capacidad antioxidante (Kelm et al., 2005; Guendez et al., 2005; Revilla and Ryan, 2000).

El objetivo de esta investigación es la de determinar la capacidad antioxidante de harinas de orujo sobre galletitas preparadas con distintas proporciones de harinas de orujo y harina de trigo colocadas en sistemas de atmosfera controlada de distintas actividades acuosas.

Materiales y Métodos

Materiales

Los orujos tintos variedad Malbec, cosecha 2010, fueron provistos por la Cátedra de Enología II de la Universidad Nacional de Cuyo, se recibieron en envases de plástico antes de las 24 horas desde su envío, y se almacenaron en freezer a -18 °C hasta su preparación.

Reactivos químicos

Los siguientes reactivos químicos fueron provistos por Sigma comercial Co. (St. Louis, USA): catequina, nitrito de sodio y cloruro de aluminio, ácido clorhídrico, cloruro de potasio, ácido acético y acetato de sodio. Todos los reactivos químicos y solventes usados son de grado reactivo analítico.

Metodología de trabajo

Obtención de la harina de orujo

Los orujos fueron distribuidos en una bandeja de plástico con el fondo perforado, para permitir la circulación del aire, y secados durante 525 minutos en estufa con recirculación de aire a 60°C, hasta un contenido de humedad cercano al 7%. El material seco obtenido fue molido con molino de cuchillas hasta que el material pasó por tamiz malla 40 ASTM; lográndose una harina de orujos tintos.

Preparación de las galletitas

Los ingredientes fueron pesados en balanza granataria y se mezclaron en seco, mediante una amasadora planetaria, durante 10 minutos hasta lograr una uniformidad en la distribución de la harina de orujos. Luego se incorporó el total del agua prevista de manera gradual y se continuó el amasado por 5 minutos más, hasta lograr una masa maleable. De la misma se extrajeron porciones de 2-3 g, que se cortaron mediante un molde de acero inoxidable de 2 cm de diámetro. Las porciones de masa de forma cilíndrica se colocaron en una asadera de cocina sin enmantecar y sin agregado de aceite

vegetal (para evitar la formación de radicales libres antes de colocar las galletitas en el sistema de atmósfera controlada).

Las mismas se hornearon a 160 °C durante 10 minutos, habiéndose previamente ajustado la temperatura del horno mediante una termocupla. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se embolsaron en bolsas herméticas de polietileno de baja densidad y se conservaron en el freezer hasta su utilización. La masa correspondiente a las galletitas de control, se procesó con la misma secuencia operativa pero sin el agregado de harina de orujos.

Las galletitas se prepararon con 20 % y 10 % de harina de orujos, además de galletitas testigo sin el agregado de harina de orujo (0% de harina de orujo). La composición de las galletitas se expone en la Tabla 1.

Ingrediente	Galletitas con 20% de harina de orujos	Galletitas con 10% de harina de orujos	Galletitas sin orujos
Harina de trigo	40.4	50.4	60.4
Azúcar	16.6	16.6	16.6
Huevo	8.25	8.25	8.25
Sal	0.27	0.27	0.27
Polvo de hornear	0.27	0.27	0.27
H. de orujos tintos	20	10	----
Agua	14.12	14.12	14.12

Tabla 1. Composición de las galletitas.

Ensayo en atmósfera controlada

Se tomaron las galletitas conteniendo 20 y 10 % de harina de orujos y las del control se colocaron en una caja de Petri plástica de 3 cm de diámetro, que se introdujo a su vez en un frasco de vidrio hexagonal. Al frasco se le colocó cerrando el frasco mediante tapa metálica a rosca y se dejó en la mesada del laboratorio bajo condiciones de temperatura ambiente. Para los ensayos a atmósfera controlada con actividad acuosa del 80 % ($A_w = 80\%$) se utilizó una solución de NaCl al 20 %, mientras que para la actividad acuosa del 40 % ($A_w = 40\%$) se utilizó una solución de etilenglicol del 85% m/m en etilenglicol.

Los tiempos elegidos para realizar la evaluación de los parámetros estudiados fueron desde 0 a 60 días, durante los cuales, ambas clases de galletitas se sacaron cuidadosamente de la caja de Petri se pesaron, para iniciar la preparación de los extractos.

Preparación de extractos de las galletitas

Con cada galletita se procedió a realizar la siguiente secuencia operativa:

1-Extracción con 25 mL de etanol durante 3 hs en un agitador a vaivén y al abrigo de la luz.

2-Filtración mediante papel Whatman N° 40, se desecha el residuo y el filtrado constituyendo una solución etanólica hubo de filtrarse nuevamente para eliminar precipitados gelatinosos, empleándose para ello filtro ultramicroporo de 0.45 micrones.; se enrasó a 25 ml con etanol; La solución obtenida de esta segunda filtración se guardó en el freezer a -18 °C en frascos de vidrio color caramelo. La secuencia

operativa descrita se repitió para todas las galletitas durante los tiempos señalados anteriormente.

Determinación de humedades

Las humedades de las galletitas extraídas de las atmosferas controladas respectivas en los tiempos previstos, se calcularon según la siguiente expresión:

$$\% \text{ HUM} = ((M_t - M_i) / M_i) \times 100$$

M_t: masa de la galletita en el tiempo t

M_i: masa inicial de la galletita.

Determinaciones analíticas

Contenido de flavonoides totales (CFT)

El contenido de flavonoides totales (CFT) se evaluó con el método de Kim et al. (2003). A 1 mL del extracto etanólico de orujos tintos se le adicionaron 4 mL de agua bidestilada y 0,3 mL de nitrito de sodio, éste es considerado el tiempo cero, a los 5 min se le agregaron 0,3 mL de cloruro de aluminio al 3%; a los 6 minutos, 2 mL de hidróxido de sodio (1 M) e inmediatamente 2,4 mL de agua bidestilada. La absorbancia de la mezcla se mide a 510 nm contra un blanco de reactivo con un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japón). Los CFT son expresados en mg de ácido gálico equivalente (AGE) / mL de solución.

$$\text{CFT (mg de AGE/mL)} = (\text{Abs} - 0.06345) \times 0.2$$

Por otra parte para expresar el CFT referidos a gramos de muestra seca; aplicamos la siguiente expresión:

$$\text{CFT (mg de CE/g de ms)} = ((\text{mg de AGE/mL}) \times 1000 / C') \times 25.$$

Se multiplica por 25 para tener el total de flavonoides presentes en los 5 gramos de muestras sometidas a la extracción.

Antocianinas totales (AT)

El contenido de antocianinas totales se determina por el método por diferencia de pH (Giusti y Wrolstad, 2001), se utilizan dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/acetato de sodio de pH 4,5 (0,4 M). A 2 mL de una muestra diluida (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,100-1,200 a 510 nm) se añaden 1,8 mL de la correspondiente disolución tampón y se mide la absorbancia frente a un blanco a 510 y 700 nm. Se calcula la absorbancia final a partir de:

$$A = (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}10} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$$

La concentración de pigmentos monoméricos en el extracto se expresa en cianidina-3-glucosido.

$$\text{Antocianos monoméricos (mg/100g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l}$$

Dónde: A: Absorbancia; PM: peso molecular; FD: Factor de dilución; ϵ : absortividad molar.

DPPH* residual

Se utilizó el método espectrofotométrico de Shimada et al. (1992) para determinar DPPH*. Se mezcló 1 mL de los extractos con 5 mL de una solución metanólica 0,1 mM de DPPH*. Luego, se midió la absorbancia a 517 nm mediante un espectrofotómetro Jasco Modelo 7800 UV-Vis (Japan

Spectroscopic Co., Tokio, Japón). El estándar catequina se utilizó como comparación. El % DPPH*, se calculó según:

$$\% \text{ DPPH}^* = 1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco de reactivo}} \times 100$$

Mientras que el DPPH* residual se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ DPPH}^* \text{ residual} = 100 - \% \text{ DPPH}^*$$

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó el test de Student para comparar los valores obtenidos. Todos los ensayos se consideraron estadísticamente no significativos con una $P < 0,05$.

Resultados y Discusiones

Determinación de humedades

Las humedades obtenidas en cada tiempo para las galletitas con la atmosfera controlada con $A_w = 80\%$, no mostraron diferencias significativas y oscilaron entre valores cercanos a 18.2 y 18.7 %, para 10 y 20 % de harina de orujos En tanto que para la atmosfera controlada con $A_w = 40\%$ y con los porcentajes de harina de orujos anteriores sus valores resultaron 1.82 Y 1.26 %, no presentando diferencias significativas.

Considerando el diagrama velocidad de deterioro en función de la actividad acuosa, Los valores de humedades alcanzados para las atmosferas controladas con $A_w = 80\%$ y 40%, se

corresponden con los inicios de las zonas del agua libre y del agua débilmente ligada respectivamente. Con respecto a ésta última, los valores bajos de humedad de las galletitas, reduce la movilidad de las moléculas y por ende la de los radicales libres, los flavonoides y las antocianinas (Badui DS, 2006).

Con respecto a las galletitas sin incorporación de harinas de orujos para las atmosferas controladas con $A_w=80$ y 40 % las humedades resultaron de 5.6 y 2.5 % respectivamente.

Contenido de flavonoides totales

En la figura 1 se muestran los valores de CFT en el tiempo para una $A_w = 80\%$; se observa que para 0 y 20 % de harina de orujos, los valores de CFT se redujeron desde 0.71 a 0.074 y 2.57 a 1.43 mg de AGE/g de ms a lo largo de 60 días del ensayo; mientras que para 10 % de harina de orujos el CFT, se mantuvo prácticamente constante en valores cercanos a 1.16-1.23 mg de AGE/ g de ms. Por otra parte en los ensayos bajo atmosfera controlada con $A_w = 40\%$ los valores iniciales de 2.57 -1.28 y 0.71 mg de AGE/g de ms para 20, 10 y 0% de harina de orujos, descendieron a valores cercanos a 0.4 y 0.6 mg de AGE/g de ms, manteniéndose constantes partir de los 12 días. Destacamos que en este tramo el CFT para las galletitas con 20 % de harina de orujos, es inferior en un 50 % al de 10 y 0 % de harina de orujos los que no presentan diferencias significativas entre sí. (Figura 2).

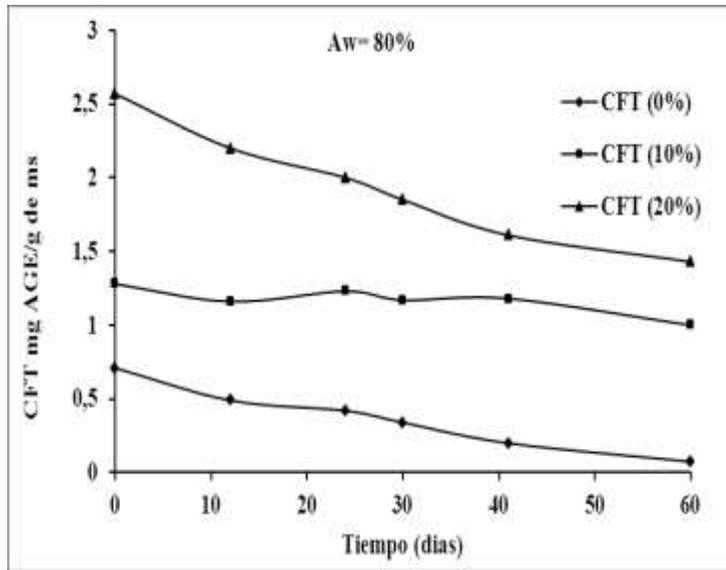


Figura 1. CFT vs Tiempo para Aw=80%

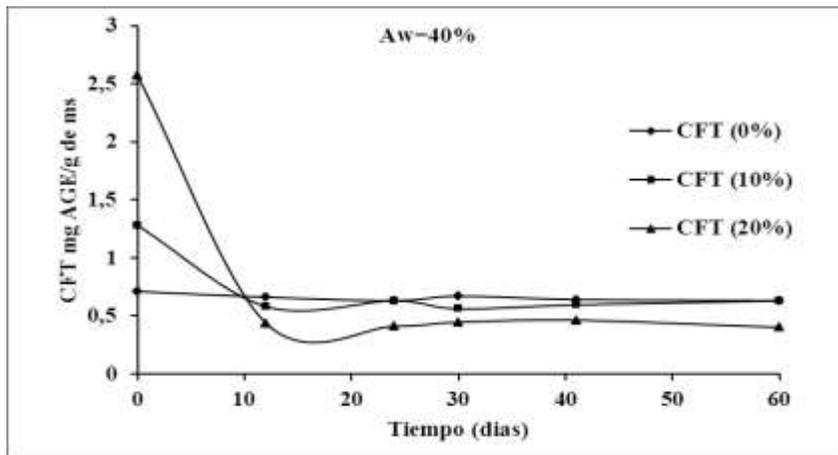


Figura 2. CFT vs Tiempo para Aw=40%

Antocianinas totales

En la figura 3 para una $A_w = 80\%$, en las muestras con 20 y 10 % de harina de orujos, presentaron valores iniciales de 0.1621 mg de malvidina 3 glucosido/g de ms, los que se fueron reduciendo a través del tiempo y al cabo de 60 días resultaron de 0.015 y 0.083 mg de malvidina 3- glucosido/g de ms; mientras que en la atmosfera controlada con $A_w = 40\%$, para 20 y 10 % de harina de orujos incorporada, los valores iniciales de 0.01621 y 0.098 mg de malvidina 3- glucosido/ g de ms descendieron hasta aproximadamente los 12 días a valores cercanos a 0.080 mg de malvidina 3- glucosido/ g de ms; los que se mantuvieron prácticamente constantes hasta los 60 días. (Figura 4)

Cabe destacar que para las muestras con 0 % de harina de orujos, no se reportaron los valores de antocianinas totales, ya que en la misma no se encuentran dichos compuestos.

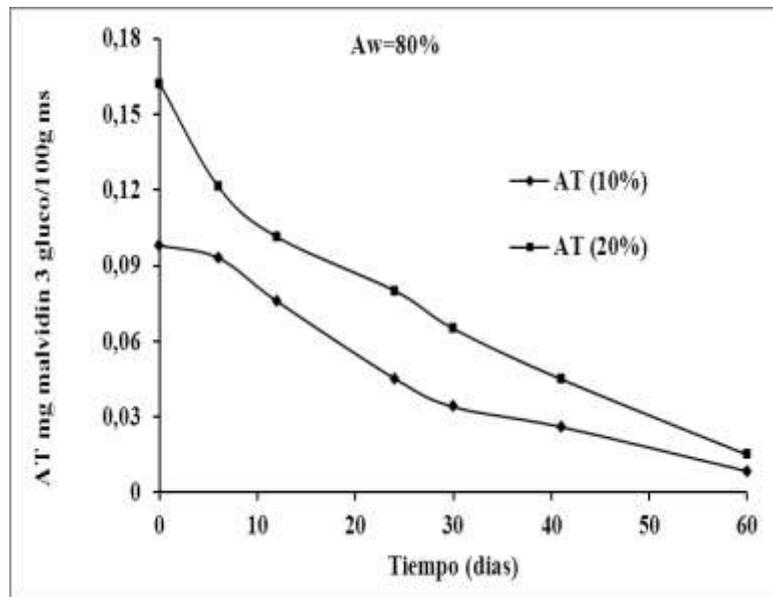


Figura 3. AT vs Tiempo para Aw= 80%

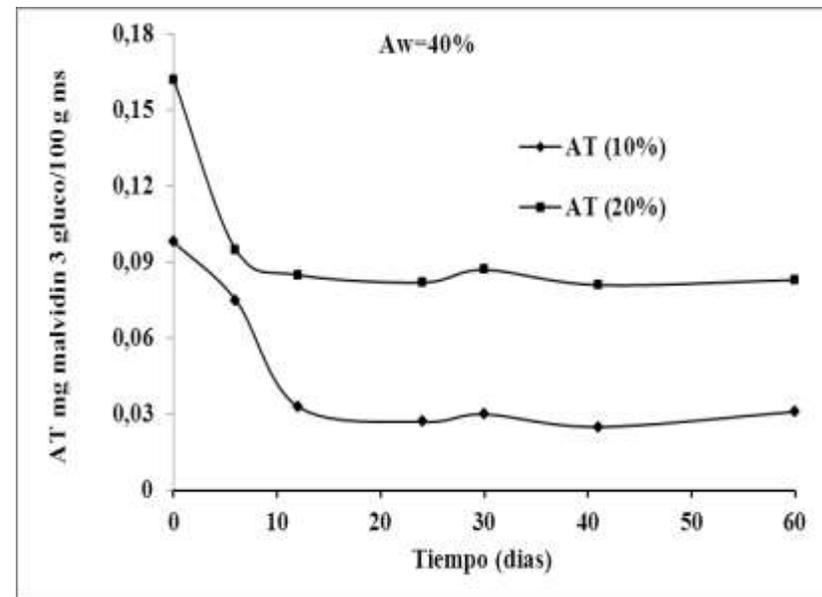


Figura 4. AT vs Tiempo para Aw=40%

DPPH*residual

El DPPH* es un reactivo analítico, en rigor un radical libre capaz de reaccionar con los flavonoides, las antocianinas y con los radicales libres presentes.

En las figuras 5 y 6 se muestra que para Aw = 80 y 40% en las muestras con 0 % de harina de orujos, los valores del DPPH* residual a partir de los 12 días prácticamente no presentaron diferencias significativas oscilaron alrededor del 94 %. Con respecto a una Aw = 80%, las muestras con 10 y 20 % de harina de orujos prácticamente no presentaron diferencias significativas a partir de los 12 días y los valores del DPPH* residual oscilaron entre 34.5 y 35.7 %.; en tanto que para una Aw = 40%, los valores de DPPH* residual con 10 y 20 % de

harinas de orujos , resultaron de 70 y 56.1 % a partir de los 12 días; de esta manera las muestras con 10 % de harina de orujos , superaron en un 25 % al de aquellas con 20 % de la misma harina.

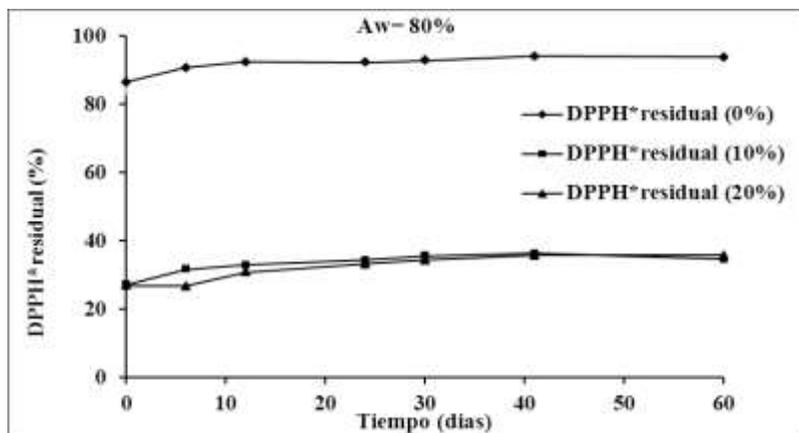


Figura 5. DPPH* residual vs Tiempo para Aw=80%

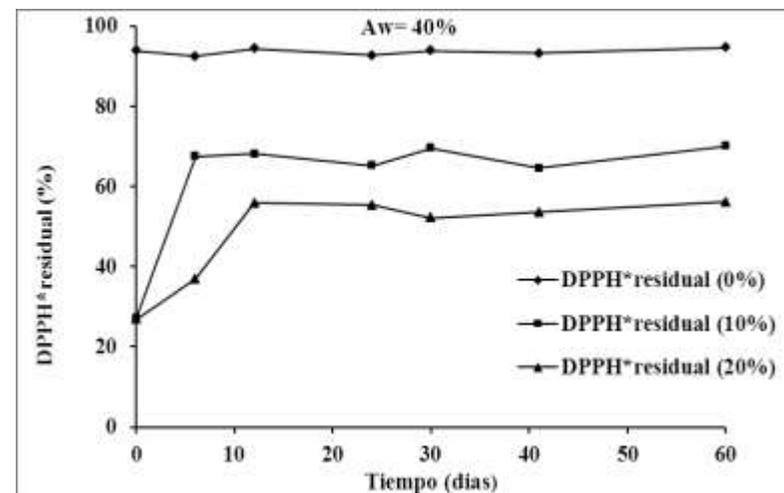


Figura 6. DPPH* residual vs Tiempo para Aw=40%

CONCLUSIONES

Las humedades de las galletitas sometidas a las atmosferas controladas con $A_w = 80$ y 40 %, con incorporación de harina de orujos de 0-10 y 20 % resultaron: 5.6-18.2 - 18.7 % y de 2.5-1.82-1.26 % respectivamente. En todos los casos, las humedades de las galletitas, se mantuvieron prácticamente constantes desde el inicio en los valores mencionados.

En la atmosfera controlada con $A_w = 80$ %, en las galletitas con 20 - 10 % de harina de orujos tintos, los valores de CFT fueron descendiendo durante todo el intervalo de tiempo, alcanzando valores cercanos a 1.43-1 mg de AGE/ g de ms, mientras que para 0% lo hicieron hasta valores cercanos a 0.074 mg de AGE/ g de ms. Con respecto a las AT para 20 y 10 % de harina de orujos, en dicho intervalo, sus valores descendieron a 0.015-0.0085 mg de malvidina-3-glucosido/100 g de ms respectivamente. En tanto que para la atmosfera controlada con $A_w = 40$ % en los porcentajes de harina similares a los anteriores el CFT y AT, a partir de los 12 días, se mantuvieron en valores prácticamente constantes a 0.43-0.6 mg de AGE/g de ms y 0.083-0.031 mg de malvidina-3 glucosido/ 100 g de ms respectivamente. Obviamente para las distintas atmosferas controladas, los mayores valores de CFT y AT se obtuvieron para las galletitas con 20 % de harina de orujos, hasta alrededor de los 12 días de iniciada la experiencia.

Con respecto al DPPH* residual se ha verificado que para las dos atmosferas de control utilizadas, los valores alcanzados para las galletitas conteniendo 0% de harinas de orujos siempre han superado a los correspondientes de las galletitas

con 10 y 20 % de harina de orujos; razón atendible ya que las galletitas con 20 % de harinas de orujos tintos, poseen una mayor proporción de CFT, AT y de radicales libres presentes inicialmente en las harinas empleadas y de aquellos formados a partir del aceite contenido en las semillas, durante el proceso de horneado de las galletitas.

A partir de los 12 días de la experiencia en la atmosfera controlada con $A_w = 40$ % con las galletitas preparadas al 10 y 20 % de harina de orujos tintos, las diferencias porcentuales del DPPH* residual entre las dos clases de galletitas, oscilaron entre 12.3 y 13.9 %. Mientras que en las galletitas sometidas a la atmosfera controlada con $A_w = 80$ % dicha diferencia entre los valores del DPPH* residual, prácticamente no presentaron diferencias significativas. Lo que nos induce a suponer que para dicha atmosfera de control, los valores del DPPH* residual, resultaron independientes del porcentaje de harina de orujos tintos utilizado; por lo tanto nos indicaría un límite en el porcentaje de harina incorporado. Las galletitas con 20 y 10 % de harina de orujos en atmosfera controlada con $A_w = 40$ %, presentaron valores del DPPH* residual de 56.1 y 70 % respectivamente.

Además, los mayores valores obtenidos del DPPH* residual para las galletitas en atmosfera controlada con $A_w = 40$ % con respecto a las de $A_w = 80$ % puede deberse a que en la atmosfera de menor actividad acuosa, existe en el equilibrio un menor porcentaje de humedad del sólido (2.5-1.82 y 1.26 %, en las incorporaciones de 0-10 y 20 % de harina de orujos) y las colocaría con tenores de humedad que corresponderían al mínimo de velocidad de oxidación lipídica. Además para la menor atmosfera de control observamos que a partir de los 12 días los valores de los parámetros de control CFT*-AT y DPPH* residual para las galletitas conteniendo 20 y 10 % de harina de

orujos tintos se mantuvieron prácticamente constantes. Debido probablemente a que la relación CFT/AT ha alcanzado proporciones en que la velocidad de oxidación no se modifica, señalando que los CFT y AT presentes no modificaron sus valores. Aparentemente han equilibrado sus estructuras químicas. Por otra parte para la atmosfera controlada con $A_w = 80\%$, el DPPH* residual a partir de dicho tiempo, también se mantuvo constante en valores cercanos al 35% y aparentemente, el sistema persé ha dejado de generar radicales libres y aquellos que pudieron haber contribuido al descenso de los valores del DPPH* residual desde el inicio, pudieron provenir de los existentes inicialmente en las harinas de orujos o en la de trigo, haberse generado durante el horneado de las galletitas o también por la alta humedad alcanzada por las galletitas en la atmosfera controlada con $A_w = 80\%$, en la que los productos de pardeamiento no enzimático (Productos de Maillard) obtenidos, logran su máxima de velocidad de formación. No debiéndose olvidar que dichos compuestos poseen actividad antioxidante (Badui DS, 2006).

En general a partir del tiempo mencionado, el sistema se mantiene estabilizado, al menos en los parámetros que estudiamos en este trabajo.

Con respecto a la formación de hongos, hemos notado que en la atmosfera controlada con $A_w = 80\%$ la aparición de la flora microbiana se manifestó a partir de los 30 días, lo que es coherente con el mayor % de humedad de las galletitas, mientras que en las galletitas sometidas a una $A_w = 40\%$, hasta los 120 días que mantuvimos las muestras remanentes, no se observaron crecimiento de ninguna clase de flora microbiana.

De acuerdo a los resultados obtenidos la harina de orujos tintos puede emplearse como aditivo para reforzar la calidad nutricional de los alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akar T, Tosun I, Kaynak Z, Ozkara E, Yeni O, Sahin EN, Akar ST. 2008. An attractive agro-industrial by-product in environmental cleanup: Dye biosorption potential of untreated olive pomace. *Journal of Hazardous Materials* 162:1217-1225.
- Badui DS. 2006. Química de los alimentos 4ta edición. Adison Wesley Longman de México S.A. 7: 426-427.
- Cortell JM, Halbleib M, Gallagher AV, Righetti TL, Kennedy JA. 2007. Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) anthocyanins. Anthocyanins and pigmented polymers in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:6585-95.
- Giusti MM, Wrolstad RE. 2001. Antocyanins: Characterization and measurement with UV- Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Unit, F1.2.1-13.
- Guendez R, Kallithraka S, Makris D, Kefalas P. 2005. Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: Correlation with antiradical activity. *Food Chemistry* 89:1-9.
- Herber D. 2007. *Physicains Desk Reference for Herbal Medicines*. 3a. ed. Thomson PDR, NJ, USA, pp. 400-404.
- Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. 2004. Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis*

vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:4360-4367

Khanal RC, Howard LR, Brownmiller CR, Prior RL. 2009. Influence of extrusion processing on procyanidin composition and total anthocyanin contents of blueberry pomace. *Journal of Food Science* 72:H52-8.

Kelm M, Hammerstone J, Schmitz H. 2005. Identification and quantitation of flavonols and proanthocyanidins in foods: How good are the datas?. *Clinical and Developmental Immunology* 12:35-41.

Kim D, Jeoung S, Lee Ch. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 8: 321-326.

Llópiz N, Puiggrós F, Céspedes E, Arola L, Ardévol A, Blandé C, Salvadó J. 2004. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1083-1087.

Renaud S and Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Epidemiology* 339:1523-1526.

Revilla E and Ryan JM. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography* 881:461-469.

Sarker SD, Latif Z, Gray AI. 2006. *Natural products Isolation*. Second edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, pp. 1-5.

Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, and Nakamura T. 1992. Antioxidant properties of xhantan on the antioxidant of soybean oil in cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.

Thimothe J, Bonsi IA, Padilla-Zakour OI, Koo H. 2004. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis interspecific hybrids*) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:10200-10207.

Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S, Demopoulos CA. 2007. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators of Inflammation* 2007:36204.

Ugartondo V, Mitjans M, Touriño S, Torres JL, Vinardell MP. 2007. Comparative antioxidant and cytotoxic effect of procyanidin fractions from grape and pine. *Chemical Research of Toxicology* 20:1543-1548.

Vendruscolo F, da Silva Ribeiro C, Esposito E, Ninow JL. 2009. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 152: 74-87.

CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE POSTRES DE CHOCOLATE A BASE DE PROTEÍNAS DE LACTOSUERO Y ALMIDÓN MODIFICADO

Miccolo M.E.¹, Olivares M.L.¹ y Rubiolo A.C.^{1,2}

¹Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, UNL-CONICET, Ruta Nac.168, Km 461,5, Paraje "El Pozo", Santa Fe, Argentina.

²Instituto de Tecnología de Alimentos, UNL, Santiago del Estero 2829, Santa Fe, Argentina.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue emplear proteínas de suero en la producción de postres para comparar sus propiedades reológicas con aquellas de un postre lácteo comercial. Los postres fueron preparados con concentrado de proteínas de suero, almidón de maíz modificado, sacarosa o sucralosa, cacao, saborizante chocolate y agua. Se prepararon tres formulaciones, 5 y 9, 6 y 8, 2 y 12% p/p, de proteínas y almidón, respectivamente. El contenido de sacarosa y sucralosa permaneció constante, 10% y 2,43% p/p, respectivamente. Las muestras se compararon con un postre comercial bajo en calorías. Todas las muestras exhibieron un comportamiento pseudoplástico a 20°C, las curvas de flujo ajustaron bien al modelo de Carreau. Los espectros mecánicos demostraron propiedades elásticas predominante ($G' > G''$), con características de geles débiles. La dependencia del módulo complejo con la frecuencia se ajustó al modelo de geles débiles para alimentos. La fuerza y el grado de interacción incrementaron con el contenido de almidón, mientras el agregado de endulzantes y cacao demostró

efectos diferentes. Las muestras con mayor contenido en proteínas demostraron menor sinéresis. La adición de azúcares y cacao produjo un incremento en este fenómeno. Por lo tanto, el uso de proteínas de suero es factible en postres lácteos.

Palabras Clave postres lácteos, proteínas de suero, reología

Abstract

The aim of this work was to use whey protein in dessert production and to compare its rheological properties with those of milk-based products. Dairy desserts were prepared with whey protein concentrate, modify corn starch, sweeteners (sucrose or sucralose), cocoa, chocolate flavor, and water. Three formulations with different compositions were prepared: 5 and 9; 6 and 8; 2 and 12% p/p, of protein and corn starch, respectively. The sucrose and sucralose content was kept constant and equal to 10% y 2,43%, respectively. A commercial low-calorie dessert was use as control sample. All sample exhibited shear thinning behavior at 20°C, the flow curves fitting well to the Carreau model. Mechanical spectra showed predominantly elastic properties ($G' > G''$), with characteristics of weak gels. Therefore, frequency dependency of module complex for the samples was fitted by the weak gel model for foods. The strength and the degree of interactions increase with the starch content, while the aggregate of the sweeteners and cocoa showed different effects. It was noted that the samples with higher content of protein showed less syneresis. The added sugars and cocoa produced an increase in of this phenomenon. Therefore, the use of whey proteins in dairy desserts is feasible.

Keywords dairy desserts, whey protein, rheology

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el consumidor se ha vuelto más exigente en cuanto a sus preferencias alimenticias, inclinándose por alimentos saludables, como los reducidos en calorías o aquellos con propiedades nutricionales que permitan disminuir el riesgo a contraer ciertas enfermedades. Por otra parte, a nivel industrial, y debido a la necesidad de reutilizar co-productos con el propósito de mitigar sus efectos sobre el medio ambiente, surge el interés de explorar las propiedades tecnológicas de éstos, lo que deriva en sus potenciales aplicaciones en alimentos formulados. Por lo tanto, y en vista al uso de nuevos ingredientes en remplazos de otros, resulta interesante la utilización de concentrados de proteínas de suero como ingrediente en postres lácteos, productos consumidos por un amplio grupo etario, desde infantes hasta ancianos.

Los postres lácteos son alimentos semisólidos, que se elaboran a partir de azúcares, almidones nativos y/o modificados, hidrocoloides, leche entera y/o descremada, saborizantes y colorantes. La textura final en los mismos resulta de la interacción entre las caseínas de la leche con los hidrocoloides, mientras que el almidón imparte viscosidad. Su textura se puede describir como suave, cremosa a gelificada y firme. Las propiedades reológicas y sensoriales de estos productos son fuertemente influenciadas por las características particulares de algunos ingredientes, y sus interacciones cruzadas (Tárrega y Costell. 2006). La textura constituye un importante parámetro de calidad en alimentos formulados que contienen agentes estructurantes tales como

proteínas y polisacáridos. Los postres lácteos semisólidos muestran un comportamiento de flujo dependiente del tiempo y características pseudoplásticas, como así también propiedades viscoelásticas típicas de geles débiles (Mleko y Gustaw 2002, Tárrega y Costell. 2006).

Existen muchos trabajos de investigación enfocados al uso de las proteínas de suero. El interés por estas proteínas radica en sus propiedades tecnológicas, funcionales y nutricionales. Las proteínas de suero se componen principalmente de β -lactoglobulina y α -lactalbúmina, que son proteínas globulares compactas, con una secuencia de distribución relativamente uniforme de residuos polares, no polares y cargados. Estas proteínas experimentan plegamiento intramolecular como resultado de la formación de enlaces disulfuros entre los residuos de cisteína, los cuales ocultan la mayoría de los residuos hidrofóbicos en el interior de la molécula. Por esta razón, las proteínas de suero en estado nativo no se agregan fuertemente o interactúan con otras proteínas. Las proteínas de suero constituyen cerca del 20% del total de las proteínas de la leche pero son de mayor valor nutricional intrínseco debido a la relativamente elevada abundancia de aminoácidos esenciales y no esenciales, particularmente aminoácidos sulfurados. Las proteínas de suero han demostrado mejorar la pérdida de grasa, síntesis proteica y la respuesta inmune humoral en adultos. Los aminoácidos ramificados en las proteínas de suero estimulan la síntesis de glutaminas, la cual controla las defensas antioxidantes y la función inmune (Chandan y Kilara 2011). Las propiedades funcionales de las proteínas de suero están relacionadas fundamentalmente a sus propiedades físicas, químicas, estructurales y conformacionales. Estas propiedades son alteradas por factores tales como las condiciones de procesado, los factores

ambientales y las interacciones con otros componentes de los alimentos. En la gelificación existe una interacción proteína-proteína lo que produce una matriz firme. Los geles formados por proteínas de suero son capaces de mantener el agua, lípidos y otros componentes, generando a su vez propiedades texturales muy importantes que influyen en la aceptabilidad del consumidor (Jovanović *et al.* 2005).

La mayoría de los trabajos de investigación se basan en el estudio de soluciones de aislados de proteínas de suero (WPI) (>90% de proteínas) los que han demostrado buenas propiedades de gelificación, emulsificación, espumado y buena capacidad de retención de agua bajo condiciones específicas de temperatura, pH, fuerza iónica y concentración (Bryant y McClements. 1998); se los ha estudiado solos o en mezclas con distintos tipos de almidones, (Aguilera y Rojas 1996, Shim y Mulvaney 2001, Ravindra *et al.* 2004,) y polisacáridos (Bryant y McClements 2000, Beaulieu *et al.* 2001, Turgeon y Beaulieu. 2001, Mleko y Gustaw. 2002, Tavares y Lopes da Silva 2003, Li *et al.* 2006, van de Berg *et al.* 2009). Pocos estudios se han realizado con concentrados de proteínas de suero (WPC), estos se presentan en concentraciones desde un 25% a un 80%. Las propiedades de gelificación del WPI son superiores a las del WPC, debido a un mayor contenido en β -lactoglobulina, menor contenido en grasa, lactosa y fosfolípidos (Lorenzen y Schrader 2006). Se los utiliza como sustitutos de grasas junto con gomas, celulosa en gel, celulosa microcristalina, maltodextrinas, caseinato de sodio, como así también proveen cuerpo y textura a los productos. (Chandan y Kilara 2011).

Los geles obtenidos con WPC incluyen interacciones hidrofóbicas, electroestáticas, disulfuros y puente de hidrógeno. Los WPC tienen distintas capacidades de

gelificación. Generalmente, gelifican a 60-90°C en concentraciones de 80-120 g/L. El mecanismo de gelificación está influenciado por la temperatura y tiempo de calentamiento, pH, fuerza iónica, concentraciones de sal, proteínas, azúcares y lípidos (Jovanović *et al.* 2005).

El almidón de maíz modificado es un polisacárido ampliamente utilizado como agente generador de textura. Bajos niveles de almidón generan estructuras menos gelificadas, mientras que altos niveles producen estructuras más firmes. Los almidones modificados por hidrólisis ácida derivan de la reacción con ácido clorhídrico ó sulfúrico, mejorando las propiedades de mouth-feel (Chandan y Kilara 211).

El objetivo de este estudio fue evaluar el reemplazo total de las proteínas de leche en postres lácteos por concentrados de proteínas de suero mediante una caracterización reológica y la capacidad de retención de agua (sinéresis). Las formulaciones se elaboraron con un concentrado de proteínas de suero, almidón de maíz modificado, endulzantes (sacarosa o sucralosa), cacao, saborizante a chocolate y agua.

Materiales y Métodos

Preparación de Muestras

Para la formulación de las mezclas estudiadas se utilizó un WPC con el nombre comercial LACPRODAN®-80 (Arla Food Ingredients S.A., Buenos Aires, Argentina). La composición del WPC provista por el proveedor es 78 ± 2 % p/p de proteínas, 7 ± 2 % p/p de lactosa, 8 % p/p de grasa, 3,5 % p/p de cenizas y 5,5 % p/p de humedad. Asimismo se utilizó almidón de maíz modificado por hidrólisis ácida (Glucovil Argentina S.A., San Luis, Argentina), sacarosa (Ledesma, Jujuy, Argentina),

sucralosa (Glutal S.A., Santa Fe, Argentina) y cacao (El Quillá, Santa Fe, Argentina), saborizante chocolate. Los ingredientes secos se pesaron y se disolvieron en la cantidad de agua destilada suficiente para alcanzar la concentración deseada. Las suspensiones resultantes fueron mantenidas en agitación magnética durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, estas suspensiones fueron tratadas térmicamente a 80°C durante 30 minutos bajo agitación constante. La agitación fue provista por un equipo RW 20n (Ika Labortechnik, Brasilia, Brasil) a una velocidad angular de 60 rev/min. A este agitador se le adaptó un impulsor helicoidal construido específicamente para asegurar una distribución uniforme de la temperatura en toda la masa de la suspensión. Finalizado el tratamiento térmico, las muestras fueron llevadas a una temperatura de 25°C en un baño termostático con agitación durante unos 30 minutos y se refrigeraron toda una noche a 4°C. El comportamiento reológico de las mezclas formuladas se comparó con el de un postre comercial semisólido dietético, sabor chocolate, adquirido en un comercio local, el cual se tomó como referencia en este estudio. Este producto comercial presenta en su composición de 4,2 % p/p de proteínas, 16 % p/p de almidón modificado, 8 % p/p de sacarosa y 0 % p/p de grasa. Todas las muestras se prepararon por duplicado. Las muestras preparadas se muestran codificadas en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de las muestras para postres.

Muestra	Proteínas de Suero (% p/p)	Almidón (%p/p)	Sacarosa (% p/p)	Sucralosa (% p/p)*	Cacao (% p/p)	Agua (% p/p)
P5A9	5	9	--	--	--	86
P5A9-S	5	9	10	--	--	76
P5A9-SI	5	9	--	2,43	--	83,57

P5A9-S-C	5	9	10	--	2	74
P5A9-SI-C	5	9	--	2,43	2	81,57
P6A8	6	8	--	--	--	86
P6A8-S	6	8	10	--	--	76
P6A8-SI	6	8	--	2,43	--	83,57
P6A8-S-C	6	8	10	--	2	74
P6A8-SI-C	6	8	--	2,43	2	81,57
P2A12	2	12	--	--	--	86
P2A12-S	2	12	10	--	--	76
P2A12-SI	2	12	--	2,43	--	83,57
P2A12-S-C	2	12	10	--	2	74
P2A12-SI-C	2	12	--	2,43	2	81,57

(*) Corresponde al equivalente en poder endulzante al 10% p/p de sacarosa.

Reometría

Los ensayos se realizaron en un reómetro Haake RheoStress RS80 (Haake Instruments Inc., Paramus, NJ, U.S.A.) con geometría cono-plato de 60 mm de diámetro y 2° de ángulo del cono. Se realizaron curvas de fluidez desde 1 y hasta 1000s⁻¹ a 20°C. A partir de estas curvas se obtuvo la viscosidad aparente a una velocidad de deformación de 50s⁻¹ (η_{50}), definida como la velocidad de deformación generada durante la degustación en la boca (Bourne 2002). Wood (1968) correlacionó la textura percibida de los hidrocoloides con sus propiedades reológicas de flujo y concluyó que el estímulo asociado con la evaluación oral de la viscosidad fue un esfuerzo de corte desarrollado en la boca a una velocidad de deformación constante de 50s⁻¹, aproximadamente.

Se realizaron barridos de frecuencia de 0,01 a 10 Hz a una amplitud de deformación de 0,005 a 20°C. La región viscoelástica lineal se determinó previamente realizando barridos de deformación de 0,001 a 0,1 a una frecuencia de 10 Hz. Se obtuvieron las dos componentes del módulo complejo

(G^*), el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Caracterización Reológica Modelo de Carreau

Los datos de la viscosidad aparente η_{ap} en función de la velocidad de deformación se ajustaron con el modelo de Carreau:

$$\eta_{ap} = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{[1 + (\dot{\gamma} \gamma_c)^m]} \quad (1)$$

Donde η_0 es la viscosidad a deformación cero [Pa s], η_{∞} es la viscosidad a deformación infinita [Pa s], γ_c es la velocidad de deformación al inicio de la región pseudoplástica [s^{-1}] y m es el parámetro relacionado a la pendiente de la última región.

Modelo de geles débiles

La dependencia del módulo complejo, $|G^*|$ de la frecuencia (ω) se ajustó al modelo de geles débiles para alimentos (Gabriele *et al.* 2001). Este modelo provee una relación directa entre la microestructura del material y sus propiedades reológicas. De acuerdo a este modelo, el modulo complejo queda expresado como:

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} = A_F \omega^{1/z} \quad (2)$$

Donde z es el factor de interacción, número de unidades de flujo que interactúan unas con otras para dar la respuesta al

flujo observada, y A_F es la fuerza de las interacciones entre las unidades de flujo del gel.

Capacidad de retención de agua (sinéresis)

El grado de sinéresis se evaluó mediante un método gravimétrico a partir de la pérdida de peso de la muestra por remoción del agua sobrenadante. Se calculó la pérdida porcentual de agua a los 7 y 14 días de almacenamiento a 4°C. El agua liberada por sinéresis se determinó en términos del agua liberada por acción de la gravedad durante el período de almacenamiento y por centrifugación a 3500 g durante 15 minutos a 20°C después del período de almacenamiento mencionado.

Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y cuando los efectos de los factores fueron significativo ($P < 0,05$) se aplicó el test de Fischer LSD de rango múltiple con un nivel de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado con el programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, U.S.A.).

Resultados y Discusión Caracterización Reológica

A través de las curvas de fluidez se analizó el comportamiento reológico de las muestras sometidas a flujo de corte rotacional. Las mediciones experimentales se muestran en la Figura 1, donde se observa que tanto las mezclas formuladas como el postre comercial presentaron un marcado

comportamiento pseudoplástico a 20°C. Este tipo de respuesta es característica en postres formulados con diferentes mezclas de proteínas y polisacáridos (Mleko 1997, Mleko y Gustaw 2002, Tárrega y Costell 2004, Abu-Jdayil 2003, Tárrega *et al.* 2005, Tárrega y Costell 2006). A partir de los valores de η_{50} que se muestran en la Tabla 2 se puede observar que las muestras P5A9 y P6A8 con agregado de sucralosa fueron similares al postre comercial. Todas las formulaciones con 12% p/p de almidón y 2% p/p de proteínas presentaron los valores más elevados de η_{50} . El agregado de almidón aumentó la viscosidad de las formulaciones. Este comportamiento se condiciona con que el almidón se caracteriza por impartir viscosidad a las mezclas.

Los datos de viscosidad aparente versus velocidad de deformación presentaron un buen ajuste con el modelo de Carreau presentando un error de ajuste máximo de 0,55%. Cuanto mayor es el contenido de almidón, mayor fue la viscosidad presentada a bajas velocidades de deformación (η_0), mientras que el agregado de endulzantes disminuyó este parámetro. El agregado de cacao aumentó η_0 en todas las muestras, debido al espesamiento por el agregado de sólidos. Todas las muestras con matriz P5A9 y P6A8 no presentaron diferencia estadísticamente significativa con el postre comercial en este parámetro, y su resistencia al flujo fue menor que las muestras con mayor contenido en almidón. Las muestras con 12% p/p de almidón presentaron una marcada pseudoplasticidad, siendo γ_c el más pequeño de las muestras. El agregado de azúcares y cacao modificó la pendiente de las curvas de flujo, disminuyendo la pseudoplasticidad. A bajas velocidades de deformación, la región newtoniana fue más amplia para las muestras con 8 y 9 % p/p de almidón, es decir que a bajas velocidades de deformación la viscosidad se

vuelve dependiente de la velocidad de deformación a valores de γ_c superiores a $1,6587 \text{ s}^{-1}$. Del análisis de los valores de m se puede observar que las muestras con 6% p/p de proteínas son menos pseudoplásticas que el resto. El agregado de endulzantes disminuyó la pseudoplasticidad, pero cuando el contenido de almidón fue elevado este comportamiento se revirtió.

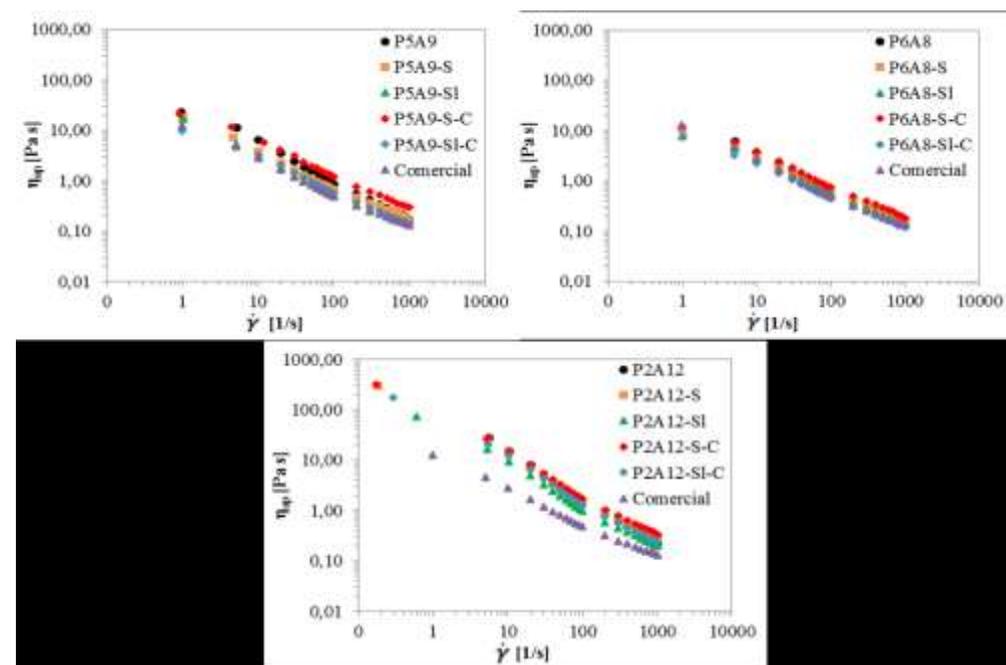


Figura 1: Curvas de Fluidez para las distintas muestras a 20°C

Tabla 2: Parámetros del modelo de Carreau y la viscosidad aparente a $50s^{-1}$ (η_{50}) obtenida teórica y experimentalmente a $20^{\circ}C$.*

Muestra	Parámetros				η_{50} [Pa s]	
	η_0 [Pa s]	η_{∞} [Pa s]	γ_c [s^{-1}]	m	Teórica	Experimental
P5A9	24,5905 ^a	0,0853 ^{ef}	2,4532 ^l	0,4520 ^g	1,6896	1,555 ^f
P5A9-S	16,1584 ^a	0,0797 ^{de}	1,2929 ^{cde}	0,3897 ^{def}	1,0105	0,937 ^c
P5A9-SI	13,7800 ^a	0,0636 ^{bcd}	1,5805 ^{cdef}	0,3869 ^{cd}	1,0102	0,725 ^a
P5A9-S-C	17,9772 ^a	0,0817 ^e	1,8885 ^{efg} _{hi}	0,3878 ^{cde}	1,4909	1,442 ^f
P5A9-SI-C	9,5970 ^a	0,0455 ^{ab}	2,1138 ^{fg} _{hi}	0,3764 ^{bcd}	0,9277	0,927 ^{bc}
P6A8	15,0163 ^a	0,0641 ^{bcd}	2,3557 ^{ghi}	0,4063 ^f	1,3118	1,075 ^d
P6A8-S	10,7968 ^a	0,0747 ^{de}	1,7686 ^{efg} _h	0,3612 ^{ab}	1,0330	1,00 ^{cde}
P6A8-SI	6,95708 ^a	0,0459 ^{ab}	2,5361 ^{hi}	0,3662 ^{abc}	0,8236	0,680 ^a
P6A8-S-C	13,3071 ^a	0,0557 ^{abc}	1,6587 ^{def}	0,3546 ^a	1,2390	1,155 ^e
P6A8-SI-C	8,12066 ^a	0,0409 ^a	1,7419 ^{def} _g	0,3550 ^a	0,7857	0,770 ^a
P2A12	1225,740 00 ^c	0,1162 ^{gh}	0,2208 ^a	0,5435 ⁱ	3,4937	2,742 ⁱ
P2A12-S	295,0300 ab	0,1322 ^h	0,4400 ^{ab}	0,4781 ^h	3,3238	3,165 ^j
P2A12-SI	74,4854 ^a	0,0995 ^{fg}	1,0940 ^{cd}	0,4846 ^h	1,9292	1,890 ^g
P2A12-S-C	502,3790 b	0,1804 ⁱ	0,3505 ^{ab}	0,4825 ^h	4,3685	3,552 ^k
P2A12-SI-C	110,1830 a	0,1169 ^h	1,0988 ^{cd}	0,4872 ^h	2,7831	2,222 ^h
Comercial	18,0024 ^a	0,0686 ^{cde}	0,9957 ^{bc}	0,4054 ^{ef}	0,8175	0,802 ^{ab}

* Los valores promedio con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

De la Figura 2 se puede observar que el comportamiento reológico de las muestras fue similar al del postre comercial. Los espectros mecánicos de todas las formulaciones mostraron propiedades predominantemente elásticas ($G' >$

G''), típico de materiales gelificados. Desde el punto de vista estructural, la representación gráfica del $\ln(G', G'')$ en función del $\ln \omega$ para geles verdaderos muestran curvas con pendiente positiva, donde G' es mayor a G'' en todo el rango de la frecuencia estudiado. En geles débiles existe una mayor dependencia de la frecuencia para los módulos dinámicos, sugiriendo la existencia de procesos de relajación que ocurren a escalas cortas de tiempo, además de una menor diferencia entre los valores de los módulos, lo que indica que se recupera un bajo porcentaje de la energía almacenada (Lopez da Silva y Rao 1999). Por lo tanto, los espectros mecánicos de todas las muestras denotan estructura de geles débiles.

Consecuentemente, los datos del módulo complejo ($|G^*|$) versus la frecuencia se ajustaron con el modelo de geles débiles para alimentos. A partir de los parámetros del modelo (Tabla 3) se observa que las muestras de matriz P5A9 y P6A8 y el postre comercial no mostraron diferencias significativas estadísticamente en el valor de la fuerza de interacción. Mientras que la fuerza del gel y el grado de las interacciones aumentaron con el contenido de almidón, confiriéndole características más sólidas. El agregado de los endulzantes y cacao mostró efectos diferentes. El agregado de endulzantes disminuyó el número de las interacciones en todas las muestras de matriz P5A9 y P6A8, siendo iguales a las del postre comercial. El postre comercial y la muestra P6A8 presentaron un valores de z similares, lo que le confiere características más fluidas. Lo que reafirma lo determinado en los ensayos de fluidez a partir del modelo de Carreau. Los postres con elevados contenido en almidón presentaron un elevado número de interacciones lo que le confiere características más sólidas. El agregado de azúcares en las muestras con 12% de almidón incrementó el carácter elástico.

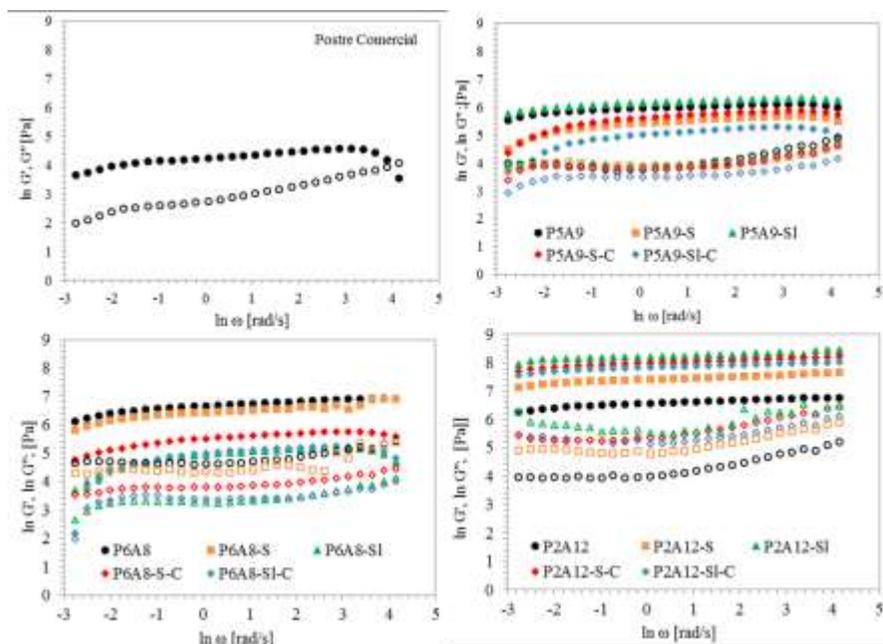


Figura 2: Espectros mecánicos de las distintas muestras a 20°C. Los símbolos llenos corresponden al módulo elástico, G' , y los símbolos vacíos corresponden al módulo viscoso, G'' .

En cuanto a la capacidad de retención de agua por gravedad (Tabla 4) se observó que las muestras con mayor contenido en proteínas presentaron una menor sinéresis. El agregado de azúcares y cacao produjo un aumento de este fenómeno. No obstante, en todos los casos analizados el porcentaje de sinéresis fue menor al 10%. Las muestras P5A9 y P6A8 no presentaron diferencias significativas en lo que se refiere a sinéreis. El agregado de endulzantes aumentó la sinéresis de estas muestras. La sinéresis aumentó en las muestras con mayor contenido en almidón. Aparentemente un mayor

contenido de proteínas mejoró la capacidad de retención de agua. No hubo importantes diferencias en la sinéresis respecto al tiempo de almacenamiento a 4°C. Bajo condiciones de centrifugación hubo una mayor liberación de agua, a ambos tiempos de almacenamiento. El tiempo de almacenado no afectó el grado de sinéresis.

Tabla 3: Parámetros del modelo de geles débiles evaluados a 20°C. *

Muestra	A_F	z
P5A9	370,507 ^{ab}	14,6077 ^{efg}
P5A9-S	181,234 ^{ab}	7,0757 ^{bc}
P5A9-SI	349,618 ^{ab}	12,4628 ^e
P5A9-S-C	238,305 ^{ab}	4,7089 ^a
P5A9-SI-C	430,293 ^{ab}	9,8818 ^d
P6A8	640,646 ^{bc}	8,7341 ^{cd}
P6A8-S	454,789 ^{ab}	6,0127 ^{ab}
P6A8-SI	85,182 ^a	7,1719 ^{bc}
P6A8-S-C	130,982 ^a	7,5710 ^{bcd}
P6A8-SI-C	126,824 ^a	7,3956 ^{bc}
P2A12	1029,910 ^c	13,9008 ^{ef}
P2A12-S	2047,510 ^d	14,9198 ^{fg}
P2A12-SI	2833,510 ^f	16,7204 ^g
P2A12-S-C	2634,600 ^{ef}	14,6758 ^{efg}
P2A12-SI-C	2204,900 ^{de}	16,3526 ^g
Comercial	94,619 ^a	8,4658 ^{bcd}

* Los valores promedio con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

CONCLUSIONES

Se concluye que las proteínas de suero proveen características sólidas a los postres. El comportamiento pseudoplástico de todas las muestras se interpretó satisfactoriamente con el modelo de Carreau. Estos parámetros permiten analizar el comportamiento del material sometido a flujo de corte. El espectro mecánico de todas las muestras estudiadas denotaron estructura de geles débiles. La interpretación de los resultados con el modelo de geles débiles permitió diferenciar la microestructura y la fuerza de interacción entre los componentes.

El mayor contenido de proteínas de suero disminuyó la sinéresis, mientras que el agregado de endulzantes aumentó este defecto.

El comportamiento de las muestras con 5 y 6 % p/p de proteínas fue similar al del postre comercial. Se concluye que es factible el uso de proteínas de suero en postres lácteos, debido a que éstos presentaron similares características texturales a las del postre comercial.

Tabla 4: Sinéresis a los 7 y 14 días de almacenado a 4°C. *

Muestra	Agua eliminada (%) por			
	Gravedad		Centrifugación	
	7 días	14 días	7 días	14 días
P5A9	2,347 ^a	1,947 ^a	8,677 ^a	8,632 ^b
P5A9-S	10,115 ^g	6,842 ^{ef}	25,047 ^{de}	22,840 ^{fg}
P5A9-SI	4,932 ^{bcd}	2,297 ^{ab}	20,890 ^{cd}	15,425 ^{de}
P5A9-S-C	3,675 ^{ab}	3,632 ^{abc}	19,660 ^{bcd}	17,275 ^{de}
P5A9-SI-C	6,130 ^{cde}	6,367 ^{def}	26,797 ^{de}	19,277 ^{ef}
P6A8	2,207 ^a	1,795 ^a	9,912 ^a	1,795 ^a
P6A8-S	6,700 ^{ef}	5,820 ^{cdef}	23,622 ^{de}	18,782 ^{ef}

P6A8-SI	5,505 ^{cde}	4,555 ^{bcde}	22,255 ^d	24,187 ^g
P6A8-S-C	6,540 ^{def}	5,847 ^{cdef}	25,637 ^{de}	24,255 ^g
P6A8-SI-C	8,162 ^f	7,052 ^f	28,954 ^e	31,775 ^h
P2A12	5,192 ^{bcde}	5,042 ^{cdef}	13,412 ^{ab}	12,815 ^{bcd}
P2A12-S	4,777 ^{bc}	4,087 ^{abcd}	10,405 ^a	9,780 ^{bc}
P2A12-SI	4,592 ^{bc}	5,232 ^{cdef}	10,810 ^a	14,052 ^{cd}
P2A12-S-C	3,540 ^{ab}	6,612 ^{ef}	10,453 ^a	10,032 ^{bc}
P2A12-SI-C	6,582 ^{def}	6,620 ^{ef}	14,550 ^{abc}	15,195 ^{cd}

* Los valores promedio con letras diferentes en una columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Jdayil B. 2003. Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 57:97-102.
- Aguilera JM, Rojas E. 1997. Rheological, thermal and microstructural properties of whey protein-cassava starch gels. *Journal of Food Science*, 61:962-966.
- Beaulieu M, Turgeon SL, Doublier JL. 2001. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium. *International Dairy Journal*, 11:961-967.
- Bourne MC. 2002. Physics and texture. En: Bourne MC. *Food Texture and Viscosity: concept and measurement*. 2^a ed. Orlando:Academic Press. pag 59-106
- Bryant CM, McClements DJ. 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, 9:143-151

- Bryant CM, McClements DJ. 2000. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat-denatured whey protein solutions and gels. *Food Hydrocolloids*, 14:383-390.
- Chandan RC, Kilara A. 2011. Dairy ingredients for food processing. Wiley Blackwell. Pag 592.
- Cook DJ, Hollowood TA, Linforth RST, Taylor AJ. 2003. Oral shear stress predicts flavor perception in viscous solutions. *Chemical Senses*, 28:11-23.
- Gabriele, D., B. de Cindio, y P. D'Antona. 2001. A Weak Gel Model for Foods. *Rheologica Acta*, 40: 120-127.
- Jovanović S, Barać M, Maćej O. 2005. Whey proteins-properties and possibility of application. *Mljekarstvo*, 55:215-233.
- Li J, Ould Eleya MM, Gunasekaran S. 2006. Gelation of whey protein and xanthan mixture: Effect of heating rate on rheological properties. *Food Hydrocolloids*, 20:678-686.
- Lorenzen PC, Schrader K. 2006. A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Lait*, 86:259-271.
- Mleko S. 1997. Rheological properties of milk and whey protein desserts. *Milchwissenschaft*, 52:262-266.
- Mleko S, Gustaw W. 2002. Rheological changes due to substitution of total milk proteins by whey proteins in dairy desserts. *Journal of Science and Technology*, 39:170-172.
- Lopez da Silva JA, Rao MA. 1999. Rheological behavior of food gel systems. En: Rao MA. *Rheology of fluid and semisolid foods: principles and applications*. 1º ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. pag 319-356.
- Shim J, Mulvaney S. 2001. Effect of heating temperature, pH, concentration and starch/whey protein ratio on the viscoelastic properties of corn starch/whey protein mixed gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81:706-717.
- Tárrega A, Durán L, Costell E. 2004. Flow behaviour of semi-solid dairy desserts. Effect of temperatura. *International Dairy Journal*, 14:345-353.
- Tárrega A, Durán L, Costell E. 2005. Rheological characterization of semisolid dairy desserts. Effect of temperature. *Food Hydrocolloids*, 19:133-139.
- Tárrega A, Costell E. 2006. Effect of composition on the rheological behaviour and sensory properties of semisolid dairy dessert. *Food Hydrocolloids*, 20:914-922.
- Tavares C, Lopes da Silva JA. 2003. Rheology of galactomannan-whey protein mixed systems. *International Dairy Journal*, 13:699-706.
- Turgeon SL, Beaulieu M. 2001. Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15:583-591.
- van de Berg L, Rosenberg Y, van Boekel MAJS, Rosenberg M, van de Velde Fred. 2009. Microstructural features of composite whey protein/polysaccharide gels characterized at different length scales. *Food Hydrocolloids*, 23:1288-1298.
- Wood FW. 1968. Psychophysical studies on the consistency of liquid foods. En: *SCI Monograph N° 27. Rheology and texture of foodstuffs*. Society of Chemical Industry. London. pag.40.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado con el financiamiento de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina). Los autores agradecen a GLUCOVIL Argentina S.A. por el suministro de almidón modificado.

BIOFENOLES EN LAS CORRIENTES DE PROCESAMIENTO DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Mussio D.F., Ceci L.N., Carelli A.A.

Planta Piloto de Ingeniería Química (PLAPIQUI), Universidad Nacional del Sur-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.
dmussio@plapiqui.edu.ar

Resumen: La distribución de los compuestos fenólicos se analizó en forma cuali y cuantitativa por HPLC-UV en muestras de aceite de oliva virgen extra (COI T.20/Doc.N 29, 2009), en la pasta de aceituna a la salida del molino, de la batidora y en el alperujo en dos cultivares, *Arbequina* (A) y *Frantoio* (F). Los sólidos fueron liofilizados y desgrasados con hexano previamente a la extracción de los biofenoles con solución metanol:agua (80:20,v/v). La mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la pasta de aceituna fueron retenidos en el alperujo pasando al aceite sólo una mínima cantidad. Se detectó una modificación en el perfil fenólico entre las corrientes sólidas atribuible a una transformación de estos compuestos debido a la acción de enzimas endógenas durante el proceso. También se observó un cambio en el perfil entre el alperujo y el aceite extraído indicando que los compuestos fenólicos poseen distintos coeficientes de partición. Cabe destacar, el alto contenido de hidroxitirosol en el alperujo (A= 2222 ± 26, F= 1124 ± 52 mg/kg en base seca y desaceitado). Este compuesto, de gran poder antioxidante y reconocidas propiedades nutraceuticas, convierte al alperujo en una potencial fuente de compuestos de alto valor agregado e interés comercial.

Palabras clave: biofenoles, aceite de oliva virgen, alperujo.

Abstract: The distribution of phenolic compounds was analyzed qualitatively and quantitatively by HPLC -UV in samples of extra virgin olive oil (COI T.20/Doc.N 29, 2009), olive paste at the mill outlet, the malaxator outlet and "alperujo" in two cultivars, *Arbequina* (A) and *Frantoio* (F). Solid samples were lyophilized and defatted previously to the extraction of the biophenols with methanol:water solution (80:20, v/v). Most of the biophenols present in the olive paste are retained in the semisolid waste 'alperujo' passing only a minimal amount to the oil. A change was detected in the phenolic profile between solid streams attributable to the transformation of these compounds due to the action of endogenous enzymes throughout the process. It was also observed a change in the phenolic profile between alperujo and oil indicating that biophenols have different partition coefficients. It is interesting to note the high content of hydroxytyrosol in alperujo (A= 2222 ± 26, F= 1124 ± 52 mg / kg in dry basis and deoiled). This compound, which is a powerful antioxidant with well known nutraceutical properties, makes the alperujo a potential source of high added value compounds and commercial interest.

Keywords: biophenols, virgin olive oil, alperujo

INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es un producto natural muy valorado por su aroma y sabor característico el cual depende directamente del perfil químico. Los compuestos fenólicos son los responsables de su sabor amargo y picante (Tsimidou 1998). Por otro lado, son también los responsables, junto con el perfil de ácidos grasos y otros compuestos minoritarios, de la estabilidad oxidativa del aceite (Ceci y Carelli 2010).

Pese a su complejidad no se han reportado diferencias cualitativas en el perfil fenólico de la aceituna en relación con la variedad y/o la zona de cultivo. Sin embargo, existen notables diferencias cuantitativas dadas por factores de carácter agronómico y tecnológico tanto en la pasta de aceituna como en el aceite. Entre los factores agronómicos se destacan la variedad, los factores ambientales (climatología y tipo de suelo), las prácticas culturales (riego, tratamientos fitosanitarios, sistema de recolección), así como el período de recolección. Como principales factores tecnológicos se destacan el tiempo y condiciones de almacenamiento de la oliva antes de su procesamiento, el sistema de extracción, temperatura y tiempo de batido de la pasta como así también las condiciones de conservación del aceite.

Las clases más importantes de compuestos fenólicos en la pasta de aceituna incluyen ácidos y alcoholes fenólicos, secoiridoides y flavonoides. Los alcoholes fenólicos mayoritarios son el hidroxitirosol y el tirosol mientras la oleuropeína y el ligustrósido son los secoiridoides predominantes y el verbascósido se encuentra entre los derivados secoiridoides. Otro grupo presente lo constituyen

los flavonoides (luteolina, rutina y apigenina) y sus glucósidos (luteolina-7-O-glucósido y apigenina-7-O-glucósido).

En el aceite de oliva los compuestos fenólicos principales identificados pertenecen a cinco clases diferentes: ácidos fenólicos, lignanos (pinoresinol y acetoxipinoresinol), flavonas (luteolina y apigenina), alcoholes fenil-etílicos (hidroxitirosol y tirosol) y secoiridoides (agluconas de la oleuropeína y el ligustrósido) (Artajo *et al.* 2007).

Esta diferencia en el perfil fenólico del aceite se debe a una serie de cambios que se producen a lo largo del proceso de extracción. La molienda ocasiona la destrucción de las células del fruto mientras que el amasado o batido conduce al mezclado del contenido celular. Como consecuencia de estas dos acciones, una cadena de reacciones produce cambios en la estructura molecular de la oleuropeína y el ligustrósido llevando a la formación de derivados secoiridoides (Artajo *et al.* 2007). Finalmente, en la centrífuga horizontal de dos fases, los compuestos fenólicos son particionados de acuerdo a su afinidad por el agua o el aceite; como resultado, casi la totalidad de los compuestos fenólicos presentes en el fruto son retenidos en el alperujo (menos del 2% son transferidos al aceite).

Es generalmente aceptado el hecho que la molienda es el primer paso hacia la activación de las β -glucosidasas endógenas encontradas en el fruto, resultando en un sistema multifásico donde la demetiloleuropeína, derivada de la actividad de las esterasas, podría actuar como un sustrato de las β -glucosidasas permitiendo la formación de agluconas estables (Ryan *et al.* 2002).

En este contexto, el objetivo del trabajo fue estudiar y comparar la distribución de los biofenoles en las diferentes corrientes de procesamiento de la industria del aceite de oliva

de dos cultivares (*Arbequina* y *Frantoio*) producidas en la Provincia de Buenos Aires.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Los frutos de oliva de *Arbequina* y *Frantoio* fueron cultivados en el partido de Coronel Dorrego, provincia de Buenos Aires y cosechados en el año 2013. Las aceitunas fueron procesadas en una PyME mediante un sistema de procesamiento con decantador (centrífuga horizontal) de dos fases, utilizando una temperatura de batido de 28 °C durante 50 min. Se extrajeron muestras de aceite de oliva virgen extra y de corrientes de sólidos obtenidas a la salida del molino (aceituna entera molida), de la batidora y de la centrífuga (alperujo).

Las muestras de aceite fueron mantenidas en frío (4-5 °C) y los sólidos fueron liofilizados y almacenados a -20 °C. Todas las muestras fueron conservadas bajo atmósfera de nitrógeno para evitar su deterioro.

Contenido de agua y aceite en sólidos

La determinación del contenido acuoso se realizó mediante gravimetría antes y después de la liofilización de los sólidos.

El contenido de aceite se determinó mediante extracción con hexano y posterior evaporación del solvente.

Extracción y cuantificación de biofenoles Aceite

La determinación de los biofenoles en el aceite se llevó a cabo siguiendo el método descrito en la norma internacional COI/T.20/DOC.29 (COI 2009). Este método se basa en la

extracción de los biofenoles directamente a partir del aceite de oliva mediante una solución metanólica y su posterior cuantificación por HPLC-UV, utilizando ácido siríngico como patrón interno.

El contenido de derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, lignanos y ácidos fenólicos se detectó a 280 nm y se expresó en mg de tirosol/kg de aceite usando un estándar externo de calibración con tirosol y ácido siríngico.

Los flavonoides fueron cuantificados a 335 nm y expresados en mg/kg de aceite usando curvas de calibrado con estándares de luteolina y apigenina.

Sólidos

Las muestras fueron liofilizadas y tratadas dos veces con hexano para permitir la extracción de pigmentos y la mayor parte de los lípidos. Luego, se procedió a extraer los compuestos fenólicos de la fase sólida desaceitada dos veces con solución metanol:agua (80:20, v/v) conteniendo 400 mg/L de metabisulfito de sodio. Las fases hidrometanólicas se combinaron y se filtraron para luego ser evaporadas a sequedad ($T < 35$ °C, bajo vacío) (Tovar *et al.* 2002, Morelló *et al.* 2005). Finalmente, el residuo se disolvió en 5 mL de solución estándar (ácido siríngico en metanol/agua, 80/20 v/v) de concentración 0,015 mg/mL y se filtró con filtro Millipore PVDF de 0,45 μ m. El análisis cuantitativo se realizó por HPLC-UV identificando los compuestos por comparación con los tiempos de retención de estándares comerciales y datos de la bibliografía (Morelló *et al.* 2005, Obied *et al.* 2005). Los biofenoles individuales fueron evaluados a 280 nm expresando los resultados como mg equivalentes de

tirosol/kg de sólido en base seca y desaceitada. Los flavonoides fueron cuantificados a 335 nm como mg equivalentes de apigenina/kg de sólido seco y desaceitado por el método del estándar externo.

Análisis estadístico

Las determinaciones analíticas fueron realizadas por duplicado. Las muestras independientes fueron procesadas por duplicado para el análisis cromatográfico. Los resultados se expresan como valores medios acompañados por el intervalo de 95% de confianza. Para establecer diferencias significativas entre corrientes de procesamiento y cultivares se utilizó el test t de comparación de medias con un nivel de significación del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de agua y aceite en sólidos

En la **Tabla 1** se muestran los contenidos de humedad y aceite de las corrientes sólidas. En ambas variedades no se observaron diferencias significativas en los contenidos de humedad de las corrientes. Además, para cada corriente sólida el contenido de humedad no difirió significativamente entre varietales.

En cuanto al contenido de aceite, como es de esperar, el alperujo presentó una cantidad significativamente menor que las otras corrientes sólidas presentando la variedad Frantoio una mayor extracción de aceite ($\cong 50\%$) con respecto a Arbequina ($\cong 35\%$).

Tabla 1. Contenido porcentual de agua y aceite de las corrientes sólidas

Corriente	Arbequina			Frantoio		
	Humedad ^d	Aceite ¹	Aceite ²	Humedad	Aceite ¹	Aceite ²
Molino	54,84±0,33 aA	18,48±0,86	40,91±1,91 aA	58,10±1,78 aA	15,81±2,15	37,74±5,13 aA
Batidora	56,68±6,16 aA	19,11±2,3	44,11±5,44 aA	57,53±12,36 aA	18,11±1,68	42,63±3,96 aA
Alperujo	62,05±3,70 aA	10,91±1,64	28,74±4,32 bA	60,11±0,89 aA	8,08±1,54	20,26±3,87 bB

¹ Porcentaje en base húmeda. ² Porcentaje en base seca.

Valores medios de dos réplicas analizadas por duplicado \pm intervalo de confianza (95 %).

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las corrientes (Prueba t, $\alpha = 0,05$).

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre variedades (Prueba t, $\alpha = 0,05$).

Contenido de biofenoles

En la **Tabla 2** se muestran los contenidos de biofenoles totales y de aquellos compuestos más relevantes presentes en las diferentes corrientes del proceso de obtención de aceite de oliva virgen extra de las dos variedades estudiadas.

El contenido de biofenoles totales no presentó diferencias significativas entre corrientes sólidas, pero sí entre varietales siendo mayor en Arbequina. Lo mismo fue observado en el aceite. Es importante destacar la baja concentración de biofenoles en los aceites en comparación con las corrientes

sólidas, lo que confirma el carácter hidrofílico de estos compuestos.

Las clases más importantes de compuestos fenólicos encontrados en las corrientes sólidas incluyeron en orden de magnitud: alcoholes fenólicos, secoiridoides y sus derivados, y flavonoides. Los alcoholes fenólicos principales fueron el hidroxitirosol y el tirosol. Entre los flavonoides se encontraron principalmente luteolina, rutina, apigenina y luteolina-7-glucósido. Por otro lado, los secoiridoides predominantes fueron la oleuropeína, demetiloleuropeína y el derivado verbascósido.

Al comparar varietales, las corrientes sólidas de Arbequina presentaron un mayor contenido de hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina, luteolina-7-glucósido y rutina; mientras Frantoio se destacó por su mayor contenido en tirosol. Analizando el aceite, Arbequina presentó un mayor contenido de hidroxitirosol. En el aceite de Frantoio no fue detectado hidroxitirosol pero sí se observaron cantidades superiores de tirosol.

En las corrientes sólidas se encontró que los compuestos secoiridoides, oleuropeína, demetiloleuropeína y verbascósido tienden a disminuir en promedio durante el batido. Esto es posiblemente debido a la acción de las enzimas endógenas de los frutos (Servili *et al.* 1999). En la variedad Frantoio fue observable un aumento de verbascósido en el alperujo acompañada con una disminución de la oleuropeína. Esto se ha atribuido a una ruta de degradación parcial de la oleuropeína que conduciría a la formación de verbascósido (Artajo *et al.* 2007). En cuanto a los derivados secoiridoides, en las corrientes sólidas de ambas variedades, sólo fue detectado 3,4-DHPEA-EDA (forma dialdehídica del ácido elenólico ligado a hidroxitirosol).

En el aceite no se observaron cantidades detectables de compuestos secoiridoides. Sin embargo, el aceite presentó además de 3,4-DHPEA-EDA los siguientes derivados secoiridoides: pHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA y pHPEA-EA; mostrando un perfil diferente en ambas variedades. Similares resultados fueron observados por Artajo *et al.* (2007) indicando que además de las diferencias en la afinidad relativa de los derivados secoiridoides, ocurren complicadas reacciones de isomerización y de equilibrio en la interfase aceite-agua aún no dilucidadas.

Al considerar los compuestos flavonoides y sus glucósidos, éstos en su conjunto fueron más abundantes en las corrientes sólidas de la variedad Arbequina, permaneciendo prácticamente constantes durante el procesamiento en ambos varietales. En el aceite sólo se observaron bajas cantidades de luteolina y apigenina, no siendo detectables rutina y los glucósidos de flavonoides.

Finalmente, se observaron en el aceite lignanos (pinoresinol y acetoxipinoresinol) que no se encontraron presentes en las corrientes sólidas. Estos compuestos se hallan en el carozo de la aceituna y son de carácter lipofílico por lo que son totalmente extraídos en la fase oleosa. El contenido de estos compuestos fue superior en Frantoio posiblemente debido a su menor relación pulpa/carozo (4,7) respecto a Arbequina (6,6) (INTA, 2009).

CONCLUSIONES

Es posible apreciar que la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en la pasta de oliva fueron retenidos en el alperujo, obteniéndose una baja concentración en el aceite virgen. Este comportamiento se debe al carácter mayormente hidrofílico de estas estructuras.

Cabe destacar el perfil diferente del aceite con respecto a las corrientes sólidas. En el aceite predominaron los liganos y derivados secoiridoides siguiendo en bajas proporciones los flavonoides y alcoholes fenólicos. Así mismo, fue comprobada la influencia del varietal sobre los perfiles fenólicos del aceite y corrientes sólidas. Por otra parte, el hidroxitirosol que es un compuesto de gran poder antioxidante y reconocidas propiedades nutraceuticas se encontró en grandes proporciones en el alperujo convirtiéndolo en una potencial fuente de compuestos de alto valor agregado e interés comercial.

Tabla 2. Contenido biofenólico de las diferentes corrientes de procesamiento

Compuesto	Arbequina				Frantoio			
	Molino ¹	Batidora ¹	Alperujo ¹	Aceite ²	Molino ¹	Batidora ¹	Alperujo ¹	Aceite ²
Biofenoles	7728	7724	7787	293	6266	5776	5714	152±
Totales	±646	±150	±129	±3	±261	±314	±892	4,1 A
	aB	aB	8 aB	B	aA	aA	aA	
Alcoholes fenólicos								
3,4-DHPEA	1804	2442	2222	2,9	1434	1305	1124	n.d. A
(Hidroxitirosol)	±196	±78	±26	±0,	±106	±75	±52	

ol)	aB	cB	bB	2 B	bA	bA	aA	
p-HPEA	114±	139±	163±	1,7	155±	168±	174±	3,0±0,
(Tirosol)	6 aA	3 bA	16 bA	±0,	11 aB	9 aB	10 aA	1 B
				1 A				
Secoiridoides								
es								
Oleuropeína	483±	400±	404±		258±	248±	125±	
	73 aB	8 aB	88 aB		14 bA	1 bA	29 aA	
Demetiloleuropeína	145±	136±	218±		282±	144±	126±	
	1 aA	21	22 bB		30 bB	8 aA	19 aA	
			abA					
Derivados secoiridoides								
es								
3,4-DHPEA-EDA	199±	188±	192±	0,8	225±	165±	150±	2,0±0,
	15 aA	7 aA	57 aA	±0,	14 bB	36 aA	2 aA	1 B
				0 A				
pHPEA-EDA				15,8				7,5±0,
				±0,				5 A
				6 B				
3,4DHPEA-EA				35,3				13,1 ±
				±0,				1,0 A
				5 B				
pHPEA-EA				12,8				5,6±0,
				±0,				5 A
				3 B				
Verbascósido	235±	157±	149±		287±	147±	420±	
	40 bA	10	36 aA		77 bA	33 aA	39 bB	
			abA					
Lignanos								
Pinoresinol+acetoxipinoresinol				44,6				67,5±
				±0,				1,8 B
				2 A				
Flavonoides								
Luteolina	381±	321±	348±	10,0	250±	224±	221±	3,0±0,
	31 aB	3 aB	58 aB	±0,	32 aA	20 aA	9 aA	0 A
				1 B				
Apigenina	22±3	18±3	19±2	2,0	16±1	21±1	17±1	1,0±0,
	aB	aA	aA	±0,	aA	bA	aA	0 A
				1 B				
Luteolina-7-	48±1	40±7	41±7		17±2	11±0	12±1	

O-glucósido	aB	aB	aB	cA	aA	bA
Rutina	123±15	98±1	94±1	55±1	59±6	51±4
Apigenina-	4±0	4±1	4±0	aA	aA	aA
7-O-	aA	abA	bA	8±2	10±1	9±2
glucósido				aB	aB	aB

¹Los resultados están expresados en mg/kg de sólido en base seca desaceitada. ²Los resultados están expresados en mg/kg de aceite. Valores medios ± IC (95%) de dos réplicas inyectadas dos veces en el cromatógrafo.

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las corrientes (Prueba t, $\alpha = 0,05$).

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre variedades (Prueba t, $\alpha = 0,05$).

BIBLIOGRAFÍA

Artajo LS, Romero MP, Suárez M, Motilva MJ. 2007. Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research Technology*, 225:617–625.

Ceci LN, Carelli AA. 2010. Relation between oxidative stability and composition in Argentinian olive oils. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 87: 1189-1197.

COI, Consejo Oleícola Internacional. 2009. Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC, COI/T.20/Doc. N° 29.

INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Centro Regional Mendoza-San Juan. 2009. Catálogo de variedades de olivo presentes en la colección de la EEA Junín. <http://www.inta.gov.ar>. Último acceso noviembre 2014.

Morelló J, Vuorela S, Romero M, Motilva M, Heinonen M. 2005. Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2002-2008.

Obied H, Allen M, Bedgood D, Prenzler P, Robards K. 2005. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9911-9920.

Ryan D, Antolovich M, Prenzler P, Robards K, and Lavee S. 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92: 147–176.

Servili M, Baldioli M, Selvaggini R, Miniati E, Macchioni A, Montedoro J. 1999. High-Performance Liquid Chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-Nuclear Magnetic Resonance characterization. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 76: 873-882.

Tovar MJ, Romero MP, Girona J, Motilva MJ. 2002. L-phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv. Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 892-898.

Tsimidou M. 1998. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 10: 99-116.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por el CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica) y la UNS (Universidad Nacional del Sur).

CINÉTICA DE SECADO DE *Pleurotus Ostreatus* **CONGELADO**

Ohaco E. H.¹, Valiente L.¹, Ichiyama B.¹, De Michelis, A.²

1 Universidad Nacional del Comahue - FATA- 25 de Mayo y Reconquista- (8336) Villa Regina, Río Negro, Argentina. ohacoelizabeth@hotmail.com

2 CONICET-INTA AER El Bolsón.

Resumen: El secado de gírgolas (*Pleurotus ostreatus*) previamente congelados, fue evaluado para las temperaturas: 50, 60 y 70°C, velocidad de aire de 2 m/s y 5 % de humedad relativa. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar distintos modelos matemáticos que represente la variación del contenido de humedad de los hongos, para seleccionar el que mejor se ajuste a los datos experimentales. El error estándar residual y la función de información de Akaike fueron los dos estadísticos utilizados como criterio de bondad de ajuste, para la selección y comparación de modelos. Los modelos de Page y Midilli *et al.* resultaron ser los más apropiados. El coeficiente de difusividad efectiva (D_{eff}) y la energía de activación (E_a) fueron calculados para las condiciones del trabajo. El D_{eff} varió entre $6,64 \times 10^{-10}$ y $1,024 \times 10^{-08}$ en el rango de temperaturas estudiado y la E_a obtenida fue de $23,02 \text{ KJ.mol}^{-1}$.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, deshidratado, modelado

Abstract: Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) drying, previously frozen, was evaluated. Air temperatures of 50, 60 and 70°C, at 2 m/s and 5 % humidity were used for the drying

experiments. This work aimed to study different mathematical models that represent the drying kinetics of mushroom and select the best model for the drying curves. The residual standard error and the Akaike's An Information Criterion were the statistics used for comparison and selection of models. The best models were Midilli *et al.* and Page. The effective diffusivity coefficient (D_{eff}) and the activation energy (E_a) were calculated for the work conditions. The D_{eff} ranged from $6,64 \times 10^{-10}$ to $1,024 \times 10^{-08}$ for the studied temperature range. The E_a for the diffusion water was $23,02 \text{ KJ.mol}^{-1}$.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, drying kinetics, modeling

INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos comestibles es una industria biotecnológica en continuo proceso de expansión y que, poco a poco, ha ido cobrando mayor importancia en el ámbito económico de muchos países. Comúnmente conocidas como gírgolas, son apreciadas, no sólo por su textura y flavor sino también por sus propiedades terapéuticas. Sin embargo, en vista de su elevado contenido de humedad y corta vida útil, la producción de hongos a escala comercial es una tarea difícil. La aplicación de mejores técnicas post-cosecha para prolongar la vida útil y mantener la calidad de los hongos, juega un rol importante al momento de su comercialización (Elmastas *et al.* 2007). Dentro de las posibilidades de procesar materia prima lo más importante es evaluar la estabilidad del hongo durante el proceso de secado. Para prolongar lo máximo posible el período de secado de materia prima, que es limitado ya que está asociado a la aparición del producto fresco, resulta de interés evaluar el comportamiento del hongo congelado durante la deshidratación.

La mayor parte de los alimentos son materiales porosos-capilar-coloidales en los cuales el transporte líquido-vapor se puede dar simultáneamente. La mayor parte de la deshidratación de alimentos sólidos tiene lugar en el período de velocidad decreciente de secado. Durante este período, la velocidad de secado normalmente es gobernada por factores que afectan el movimiento de humedad dentro del alimento. Para poder estudiar el fenómeno de secado en el período de velocidad decreciente se han propuesto varios modelos matemáticos, algunos empíricos y otros basados en la

hipótesis de que prevalece un mecanismo particular de movimiento de humedad dentro del sólido. De estas hipótesis, la más conocida es la basada en la suposición de que el agua migra dentro del sólido por difusión, debido a una diferencia de concentraciones entre la superficie y el interior del mismo, y que se cumple la segunda ley de Fick de la difusión para este movimiento. Muchas de las soluciones propuestas para esta ley asumen que el valor de la difusividad del líquido es constante durante todo el período de velocidad decreciente (Márquez *et al.* 2006). De la bibliografía consultada se puede afirmar que en la mayoría de los estudios se ha utilizado deshidratación isotérmica para evaluar y modelar la variación de la humedad adimensional del alimento en función del tiempo para distintas condiciones operativas del aire: temperatura, velocidad y humedad relativa, y se han relacionado los parámetros cinéticos con dichas variables, aunque en muchas de las contribuciones se han relacionado solamente con la temperatura de bulbo seco del aire de secado (Márquez, 2003). En las gírgolas se ha comprobado que la temperatura de las mismas alcanza la del aire de secado en menos de 10 minutos, tiempo que se puede considerar despreciable frente al tiempo total, que en todos los casos es mayor a 3 horas (Márquez 2003; Pirone *et al.* 2008; Márquez *et al.* 2006). El secado convectivo es un proceso simultáneo de transferencia de calor y materia. Los modelos matemáticos son muy útiles para diseñar y analizar estos procesos de transferencia durante el secado. Es por esto que el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la temperatura del aire de secado, a través de distintos modelos matemáticos, sobre la cinética de secado de *Pleurotus ostreatus* (gírgolas) congelados, y seleccionar el que mejor ajuste a los datos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se utilizaron fructificaciones de *Pleurotus ostreatus* (gírgolas) cosechadas en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Las muestras fueron congeladas a -18°C hasta el momento de la deshidratación.

Procedimiento de secado

Los hongos se deshidrataron con flujo de aire caliente ascendente, perpendicular a la bandeja de secado, en un equipo experimental de secado de ciclo cerrado, con aire forzado, descrito en detalle por Ohaco Domínguez (2013), que permitía regular las variables operativas del aire de secado. Se realizaron distintas experiencias en función de la temperatura de secado (50, 60 y 70°C), con una velocidad (2 m/s) y humedad relativa (5%) del aire constantes. Se colocaron rectángulos de 2 x 4 cm de gírgolas frescas congeladas previamente pesados y distribuidos en monocapa dentro de la cesta perforada (diámetro: 22,5 cm., altura: 10 cm.) del equipo de secado. Una vez puesto en régimen el equipo, se colocó la cesta perforada con la muestra previamente pesada, y a partir de ese momento, se comenzó a registrar el tiempo de secado y la pérdida de peso de la muestra, cada 15 minutos durante las primeras 2 horas de secado; y a partir de este punto cada 30 minutos, hasta que se alcanzó peso constante. Una vez que el producto deshidratado se enfrió hasta temperatura ambiente en un ambiente seco, se colocó en frascos de vidrio cerrados herméticamente, previamente identificados, y se

almacenó a temperatura de congelación (-18°C). Las experiencias se efectuaron por duplicado.

Medida de las pérdidas de peso y del peso seco de las muestras

Las pérdidas de peso de las muestras parcialmente deshidratadas se obtenían por pesada discontinua con una balanza analítica digital OHAUS (Ontario, Canadá, con una precisión: $\pm 0,001\text{g}$). El peso seco de cada muestra se determinó secándola hasta peso constante en una estufa de aire forzado a 102°C, con la balanza antes indicada.

Modelización de la cinética de secado

La humedad adimensional (X_R) durante las diferentes temperaturas del aire de secado, fue calculada utilizando los datos experimentales mediante la **Ec. 1**:

$$X_R = \frac{x - x_e}{x_0 - x_e} \quad (1)$$

donde: x es el contenido de humedad en el tiempo t (kg agua/kg sólido seco), x_0 es el contenido de humedad inicial y x_e es el contenido de humedad de equilibrio.

En la **Tabla 1** se presentan los modelos que se utilizaron para estimar el contenido de humedad adimensional (X_R) de las muestras de hongos deshidratadas a distintas temperaturas del aire de secado (50, 60, 70°C).

Determinación de la bondad de los ajustes

El ajuste de los datos a los modelos teóricos se realizó mediante regresión no lineal en el software R. El error estándar residual (s) y la función de información de Akaike (AIC) (Burnham y Anderson 2002) son los dos estadísticos utilizados como criterio de bondad de ajuste, para la selección y comparación de modelos.

Tabla 1. Modelos seleccionados para estimar los datos experimentales

Referencia	X_R
Lewis(1921)	e^{-kt}
Henderson and Pabis (1961)	$a \cdot e^{-kt}$
Logaritmico (Karathanos 1999)	$a \cdot e^{-kt} + c$
Wang and Singh (1978)	$1 + a \cdot t + b \cdot t^2$
Midilli <i>et al.</i> (2002)	$a \cdot e^{-kt^n} + b \cdot t$
Henderson and Henderson (1968)	$C \cdot \left[e^{-kt} + \frac{1}{9} e^{-9kt} \right]$
Page (1949)	e^{-kt^d}

Error Estándar residual (s):

El error estándar residual es una medida de la distancia entre los datos experimentales y la curva estimada basada en el modelo utilizado, La relación entre la variable predictora "x" y

la respuesta "y" puede ser formulada mediante el modelo de regresión no lineal **Ec. 2:**

$$y = f(x, \beta) + \varepsilon_i \quad (2)$$

donde ε_i es el término del error para la observación i y β_1, \dots, β_p los p parámetros a ser estimados.

Para los parámetros hallados, la estimación de la variancia residual σ^2 es obtenida como **Ec. 3:**

$$s^2 = \frac{RSS}{n-p} \quad (3)$$

Donde RSS **Ec. 4:**

$$RSS = \sum_{i=1}^n (XR_{exp_i} - XR_{pre_i})^2 \quad (4)$$

XR_{exp_i} es el valor experimental, XR_{pre_i} es el predicho, $n - p$ son los grados de libertad, n es el número de datos y p la cantidad de parámetros estimados. El error estándar residual (RSE) es luego, s .

La función de probabilidad fuertemente relacionada con **Ec. 5:**

$$RSS(\beta) = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i, \beta))^2 \quad (5)$$

se define como **Ec. 6:**

$$L(\beta, \sigma^2) = \frac{1}{(2\pi\sigma^2)^{n/2}} \exp \left[-\frac{RSS(\beta)}{2\sigma^2} \right] \quad (6)$$

Los parámetros estimados $\hat{\beta}$ son los parámetros que maximizan L respecto a β , lo que equivale a minimizar RSS como función de β . El resultado del máximo valor para la función de probabilidad es **Ec. 7:**

$$L(\hat{\beta}, \hat{\sigma}^2) = \frac{1}{\left(\frac{2\pi RSS(\hat{\beta})}{n}\right)^{n/2}} \exp\left(-\frac{n}{2}\right) \quad (7)$$

donde se usó el estimador **Ec. 8**:

$$\hat{\sigma}^2 = \frac{n-p}{n} s^2 \quad (8)$$

Función de información de Akaike (AIC):

Se puede considerar como un estimador de la distancia entre el modelo utilizado y el verdadero aunque desconocido modelo producido por los datos. Se define como **Ec. 9**:

$$-2 \cdot \ln(L(\hat{\beta}, \hat{\sigma}^2)) + 2(p+1) = n \cdot \ln(2\pi) + n \cdot \ln\left(\frac{RSS(\hat{\beta})}{n}\right) + n + 2(p+1) \quad (9)$$

Para modelos de regresión no lineal, *AIC* es una función de la suma de cuadrados de residuales, el número de observaciones y el número de parámetros (Burnham y Anderson 2002). Por definición, el *AIC* incluye una penalización para el número de parámetros usados (el término $2(p+1)$ en la Ec. 9)

Coefficiente de Difusividad Efectivo (D_{eff})

El coeficiente de difusividad efectiva (D_{eff}) fue obtenido de la integración de la ecuación de la segunda ley de Fick para una placa infinita sin resistencia externa para la transferencia de masa, suponiendo que la difusividad efectiva es constante, el deshidratado es isotérmico y el sólido no sufre encogimiento (Crank 1975), mediante la **Ec. 10**:

$$XR = \frac{X-X_e}{X_0-X_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left\{-\frac{D_{eff}(2n+1)^2\pi^2 t}{4l^2}\right\}$$

(10)

donde X_R es la humedad adimensional de la muestra, X es el contenido de humedad a un tiempo determinado (kg agua/kg sólido seco), X_0 es el contenido de humedad inicial (kg agua/kg sólido seco) y X_e es el contenido de humedad de equilibrio de la muestra (kg agua/kg sólido seco); D_{eff} es el coeficiente de difusión efectivo ($m^2 s^{-1}$); t es el tiempo (s) y l (m) es la mitad del espesor de la muestra.

Efecto de la temperatura

Para evaluar la dependencia de los coeficientes de difusión efectivos con la temperatura del aire de secado se utilizó la ecuación de Arrhenius (**Ec. 11**) donde E_a es la energía de activación (kJ/mol), D_0 es el factor pre-exponencial (m^2/s), R es la constante universal de los gases y T es la temperatura (K).

$$D_{eff} = D_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (11)$$

La E_a se obtuvo a partir de la pendiente de la gráfica de Arrhenius, $\ln(D_{eff})$ vs. $1/T$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la bondad de los ajustes de los modelos

Los resultados de la evaluación de bondad de ajuste de los siete modelos estudiados, para cada temperatura del aire de secado se muestran en la **Tabla 2**.

Los resultados presentados en la **Tabla 2** para el error estándar y la función de información de Akaike para los siete modelos y para todas las temperaturas de deshidratación, se pueden apreciar en las **Figuras 1 y 2**, donde se destaca la comparación entre modelos.

De acuerdo a los resultados que se muestran en las **Figuras 1 y 2**, para todos los modelos matemáticos, el error estándar residual es inferior a 0,07 para todas las temperaturas, excepto el modelo de Wang y Singh (para las temperaturas de 50 y 60°C). En base a lo observado, los mejores modelos son el de Page (2 parámetros) y el de Midilli *et al.* (4 parámetros).

En las **Figuras 3 y 4** se representan los valores experimentales y las curvas obtenidas por regresión no lineal con el software R, de los modelos de Page y Midilli *et al.*, respectivamente. No se observa el período de velocidad de secado constante en las curvas experimentales de secado de *P. ostreatus*. Sólo período de velocidad de secado decreciente, esto indica que la difusión es el mecanismo físico que gobierna el movimiento de agua dentro de las gírgolas. Estos resultados son consistentes con los observados por Tulek (2011) en *P. ostreatus*.

Tabla 2. Constantes y estadísticos de los diferentes modelos, para cada temperatura del aire de secado

Modelo	50°	60°	70°
Lewis (1921) e^{-kt}	$k=0,0246275$ $s=0,03352$ $AIC=-64,23283$	$k=0,0269520$ $s=0,02055$ $AIC=-66,079$	$k=0,033639$ $s=0,04969$ $AIC=-25,5543$
Page (1949) e^{-kt^n}	$k=0,009381$ $n=1,255761$ $s=0,01708$ $AIC=-86,2519$	$k=0,01679$ $n=1,12951$ $s=0,01329$ $AIC=-77,4001$	$k=0,0095930$ $n=1,3605531$ $s=0,007735$ $AIC=-58,2379$
Henderson and Pabis (1961) $a \cdot e^{-kt}$	$a=1,052964$ $k=0,025971$ $s=0,03012$ $AIC=-66,9716$	$a=1,0285070$ $k=0,0278004$ $s=0,01896$ $AIC=-67,4617$	$a=1,051237$ $k=0,035313$ $s=0,04809$ $AIC=-25,3443$
Logarithmic (Karathanos, 1999) $a \cdot e^{-kt} + c$	$a=1,049731$ $k=0,026322$ $c=0,004886$ $s=0,03099$ $AIC=-65,1798$	$a=1,022781$ $k=0,028413$ $c=0,008200$ $s=0,01894$ $AIC=-66,7$	$a=1,106930$ $k=0,030060$ $c=-0,070465$ $s=0,03882$ $AIC=-28,6646$
Wang and Singh (1978) $1 + a \cdot t + b \cdot t^2$	$a=-0,01194$ $b=0,0000311$ $s=0,1378$ $AIC=-15,2608$	$a=-0,01326$ $b=0,00003817$ $s=0,1436$ $AIC=-10,7772$	$a=-0,02280$ $b=0,0001234$ $s=0,03999$ $AIC=-28,6646$
Midilli <i>et al.</i> (2002) $a \cdot e^{-kt^n} + b \cdot t$	$a=1,001$ $k=0,008328$ $n=1,294$ $b=0,0001050$ $s=0,007119$ $AIC=-114,444$	$a=1,004$ $k=0,01587$ $n=1,151$ $b=0,00008777$ $s=0,005693$ $AIC=-99,6992$	$a=0,9958$ $k=0,009575$ $n=1,357$ $b=-0,00005253$ $s=0,008166$ $AIC=-56,2893$
Henderson and Henderson (1968) $C \cdot \left[e^{-kt} + \frac{1}{9} e^{-9kt} \right]$	$C=0,973169$ $k=0,023968$ $s=0,04268$ $AIC=-55,1221$	$C=0,948409$ $k=0,025457$ $s=0,03213$ $AIC=-52,692$	$C=0,964779$ $k=0,032486$ $s=0,06466$ $AIC=-20,0172$

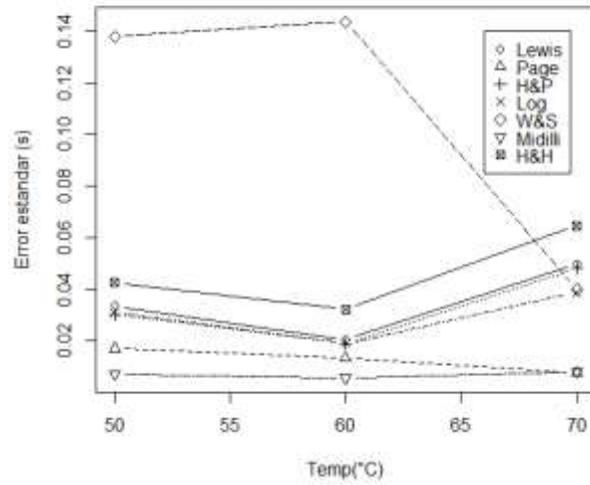


Figura 1. Error estándar del modelo (s) en función de la temperatura

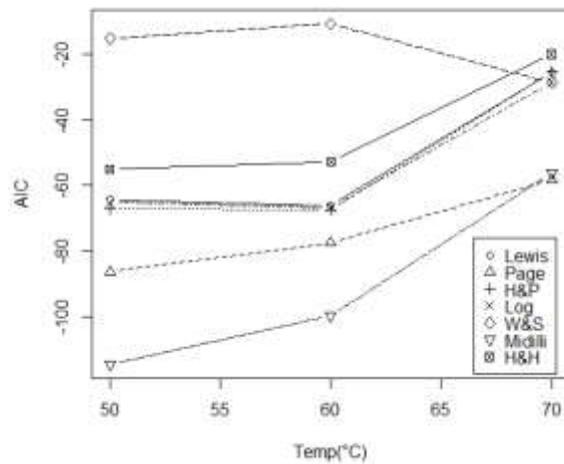


Figura 2. Función de información de Akaike (AIC) en función de la temperatura.

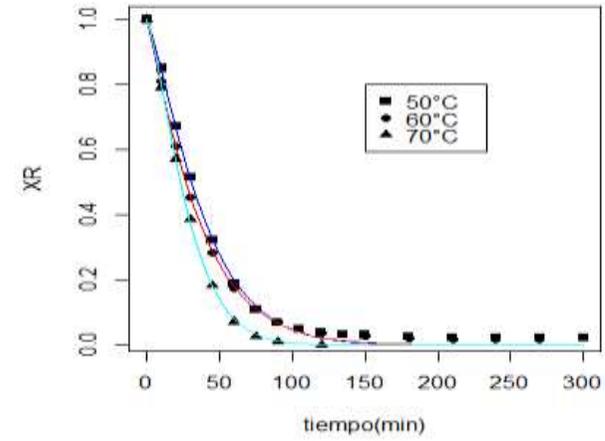


Figura 3. Variación de la humedad adimensional experimental y estimada con el modelo de Page para gírgolas deshidratadas a diferentes temperaturas del aire de secado.

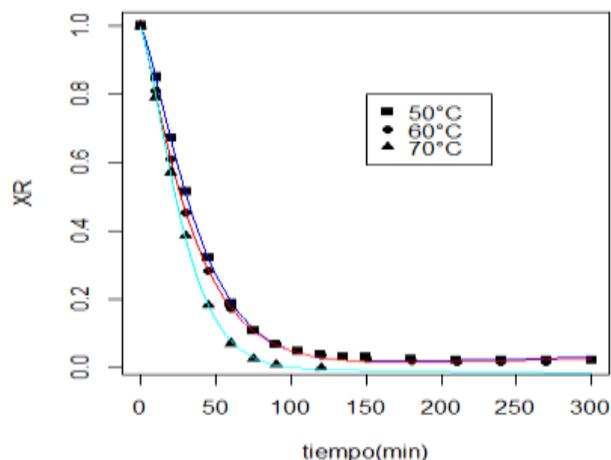


Figura 4. Variación de la humedad adimensional experimental y estimada con el modelo de Midilli *et al.* para gírgolas deshidratadas a diferentes temperaturas del aire de secado.

Coefficientes de difusividad efectivos (D_{eff})

Los D_{eff} obtenidos para gírgolas deshidratadas en función de la temperatura del aire de secado para la estimación con la solución analítica se encuentran en la **Tabla 3**. Estos valores están comprendidos dentro los rangos reportados por varios autores para distintos productos frutícolas (Doymaz 2009, Mujumdar 1995, Srikiatden y Roberts 2006, Tulek 2011).

Tabla 3. Coeficientes de difusividad efectivos (D_{eff}) para las temperaturas bajo estudio

Temperatura (°C)	D_{eff} ($m^2 s^{-1}$)
50	$6,64 \times 10^{-10}$
60	$3,96 \times 10^{-9}$
70	$1,024 \times 10^{-8}$

Se observa que los D_{eff} aumentan con la temperatura, en concordancia con investigaciones realizadas sobre zapallo y banana (Fernando *et al.* 2011), pasas de uva (Roberts *et al.* 2008), cacao (Hii *et al.* 2009), papa (Hassini *et al.* 2007).

Correlación de los D_{eff} obtenidos con la temperatura

Se utilizó la ecuación de Arrhenius para evaluar la dependencia de los D_{eff} con la temperatura (Roberts *et al.* 2008, Doymaz 2004, Doymaz y Pala 2003, Kashaninejad *et al.* 2007, Hii *et al.* 2009). En la **Figura 5**, se presentan los resultados del modelo bajo estudio, con la forma logarítmica de la **Ec. 11**, para gírgolas deshidratadas.

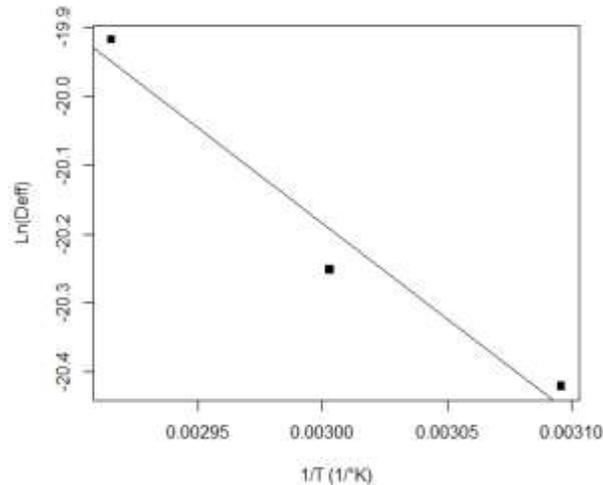


Figura 5. Dependencia del D_{eff} con la temperatura

Se observa una línea recta en el rango de temperaturas investigado, y esto confirma la relación tipo Arrhenius propuesta entre los D_{eff} y la temperatura. Muchos investigadores han reportado para distintos alimentos la misma conclusión: maíz (Doymaz y Pala 2003), zanahorias (Doymaz 2004), pistachos (Kashaninejad *et al.* 2007), cacao (Hii *et al.* 2009), *P. ostreatus* (Tulek 2011). La energía de activación es el umbral de energía que se debe superar para activar la difusión de la humedad, y aunque es beneficioso utilizar altas temperaturas con el fin de aumentar la velocidad de secado, aumentando la difusión de la humedad, es recomendable evaluar conjuntamente qué componentes guía se afectan, con el objeto de obtener la mejor calidad final posible del producto deshidratado (Kashaninejad *et al.* 2007, Hii *et al.* 2009). Se obtuvo la E_a que es de 23,02 kJ/mol, con un coeficiente de correlación r^2 de 0,98, lo que indica un buen

ajuste del modelo a los datos experimentales. Este valor concuerda con el reportado para distintos productos alimenticios (Kashaninejad *et al.* 2007), y en particular con el reportado por Tulek (2011) para *P. ostreatus*.

CONCLUSIONES

De todos los modelos evaluados, se selecciona como mejor modelo el de Page, por su simplicidad y buen ajuste de los datos experimentales. Los D_{eff} variaron entre $6,64 \times 10^{-10}$ y $1,024 \times 10^{-8}$ de acuerdo a la temperatura del aire de secado, y la E_a obtenida es de 23,02 kJ/mol. Valores similares han sido reportados por otros autores.

BIBLIOGRAFÍA

- Burnham K., Anderson D. 2002. Model Selection and Multimodel Inference. Second Edition. Editorial Springer. Pág. 488.
- Crank J. 1975. The mathematics of diffusion. Oxford University Press, London, England.
- Doymaz I. 2004. Drying kinetics of white mulberry. J. of Food Eng. 61, 341-346.
- Doymaz I. 2009. An experimental study on drying of green apples. Drying Technology. 27, 478-485.
- Doymaz I., Pala M. 2003. The thin-layer drying characteristics of corn. J. of Food Eng. 60, 125-130.
- Elmastas M., Isildak O., Turkekul I., Temur N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis, 20: 337-345.
- Fernando W.J.N., Low H.C., Ahmad A.L. 2011. Dependence of the effective diffusion coefficient of moisture with thickness and temperature in convective drying of sliced materials. A study on slices of banana, cassava and pumpkin. J. of Food Eng. 102, 310-316.
- Hassini L., Azzouz S., Peczalski R., Belghith A. 2007. Estimation of potato moisture diffusivity from convective drying kinetics with correction for shrinkage. J. of Food Eng. 79, 47-56.
- Hii C.L., Law C.L., Cloke M. 2009. Modelling using a new thin layer model and product quality of cocoa. J. of Food Eng. 90, 191-198.

- Henderson, J. M., Henderson, S. M. 1968. A computational procedure for deep-bed drying analysis. *J. Agric. Eng. Res.* 13: 87.
- Henderson, S. M., Pabis, S. 1961. Grain drying theory. Temperature effect on drying coefficient. *J. Agric. Eng. Res.* 6: 169-174.
- Karathanos, V. T. 1999. Determination of water content of dried fruits by drying kinetics. *J. Food Eng.* 39: 337-344.
- Kashaninejad M., Mortazavi A., Safekordi A., Tabil L.G. 2007. Thin-layer drying characteristics and modelling of pistachio nuts. *J. of Food Eng.* 78, 98-108.
- Lewis, W. K. 1921. The rate of drying of solid materials. *Industrial Engineering Chemistry.* 13: 427.
- Midilli, H., Kucuk, J., Yapar, Z. 2002. A new model for single-layer drying. *Drying Technol.* 20: 1503-1513.
- Márquez C.A. 2003. Deshidratación de frutos no tradicionales: Rosa Mosqueta (*Rose Hips*). Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Márquez C.A., De Michelis A., Giner S.A. (2006). Drying kinetics of rose hip fruits. *Journal of Food Engineering*, 77: 566-574.
- Midilli A., Kucuk H., Yapar Z. 2002. A new model for single layer drying. *Dry Technol* 20 (7):1503-1513.
- Mujumdar A.S., Menon, A.S. 1995. Drying of solids: principles, clasification and selection of dryers. En: *Handbook of Industrial Drying*, Ed. Mujumdar, A.S., Marcel Dekker, New York, EEUU.
- Ohaco Domínguez E. H. (2013). Secado convectivo de frutos de rosa mosqueta. Modelos del producto para optimizar equipos de secado. Editorial EAE de AV Akademikerverlag GmbH and Co. KG. Saarbrucken – Alemania. ISBN N° 978-3-659-06919-2. Pág. 259.
- Page, G. E. 1949. Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers. MSc Thesis, Purdue University, West Lafayette, IN.
- Pirone, B.N.; M.B. Vulliod; M.R. Ochoa; A.G. Kessler; C.A. Márquez, De Michelis A. 2008. Cambios de Volumen, Área Superficial y Factor de Forma de Heywood durante la Deshidratación de Cerezas (*Prunus avium*). *Ciencia e Tecnología de Alimentos – Campinas*, 28(2): 317-321.
- Roberts J., Kidd D., Padilla-Zakour O. 2008. Drying kinetics of grape seeds. *J. of Food Eng.* 89, 460-465.
- Srikiatden J., Roberts J. 2006. Measuring moisture diffusivity of potato and carrot (core and cortex) during convective hot air and isothermal drying. *J. of Food Eng.* 74, 143-152.
- Tulek, Y. 2011. Drying kinetics of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in a convective hot air dryer. *J. Agr. Sci. Tech.* 13: 655-664
- Wang, C. N., Singh, R. P. 1978. A single layer drying equation for rough rice. *ASAE Paper N° 3001*.

MODELADO MATEMÁTICO DE UN SISTEMA DE HIDROFLUIDIZACIÓN USANDO ESFERAS MÓVILES. I. TRANSFERENCIA DE MOMENTO

Oroná J.D., Zorrilla S.E., Peralta J.M.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
(UNL-CONICET). Santa Fe, Argentina
jorona@fiq.unl.edu.ar

Resumen. Se estudió el efecto de las principales variables operativas sobre los campos de flujo y los perfiles de velocidad en un sistema de hidrofuidización teniendo en cuenta el movimiento del alimento. Los balances de momento y materia en el líquido se plantearon usando dinámica de fluidos computacional. El movimiento del alimento se estimó mediante métodos de fase y elementos discretos. El sistema estudiado fue un recipiente cilíndrico con una placa con orificios en su base conteniendo esferas de papa. Las variables estudiadas fueron la distancia entre los centros geométricos de los orificios (S), el número de esferas (E), la velocidad promedio del líquido en los orificios (V) y la temperatura del líquido (T). El modelo se validó con datos extraídos de bibliografía. Se estudiaron los campos de velocidad y líneas de corriente del fluido, el comportamiento de las esferas dentro del dominio, y los perfiles de velocidad absoluta y relativa de las esferas. Los resultados mostraron que tanto S como V afectaron a los campos de velocidad y líneas de corriente. Por otro lado, el movimiento de las esferas dentro del dominio y sus perfiles de velocidad fueron función de E , S y V .

Palabras Clave: Hidrofuidización, Transferencia de Momento, CFD, DEM, DPM.

Abstract. The effect of the main operative variables on the flow field and the velocity profiles in a hydrofluidization system with mobile food was studied. Momentum and mass balances in the liquid domain through CFD were used. The movement of the food samples were estimated using a discrete phase method and a discrete element method. A cylindrical vessel with a plate with orifices at the bottom containing potato spheres was the studied system. The studied variables were the distance between the geometrical centers of the orifices (S), the number of the spheres (E), the area-averaged liquid velocity at the orifices (V) and the liquid temperature (T). The mathematical model was validated using data obtained from literature. Representative variables such as velocity contours and streamlines of the liquid, sphere behavior and absolute and relative velocity profiles of the spheres were analysed. Results showed that S and V affected the velocity contours and the streamlines. Finally, the sphere behaviour and the velocity profiles of the spheres were mainly affected by E , S and V .

Keywords: Hydrofluidization, Momentum transfer, CFD, DEM, DPM.

INTRODUCCIÓN

La hidrofluidización (HF) es un método que se basa en el bombeo de un líquido refrigerante en dirección ascendente por medio de orificios o boquillas hacia el interior de un recipiente ocupado por líquido refrigerante, generando chorros de líquido y obteniéndose un medio altamente turbulento en contacto directo con el alimento, además de altos coeficientes de transferencia superficial (**Figura 1**) (Fikiin, 1992; Peralta *et al.*, 2012). Esta tecnología presenta algunas ventajas interesantes tales como la congelación rápida, separación de los productos, reducida contaminación, posibilidad de que nuevos productos puedan ser formulados incluyendo los antioxidantes apropiados, aromas y macronutrientes para extender la vida útil de los productos y para mejorar su valor nutricional y sus propiedades sensoriales (Fikiin, 1992). Por sus características, la HF es muy atractiva para procesar alimentos de tamaño pequeño tal como frutas finas (i.e. frutillas, cerezas, etc.), arvejas, choclo, trozos de zanahorias y papa, y productos elaborados tales como frutas glaseadas, hortalizas saladas, productos congelados y osmóticamente deshidratados, etc.

A pesar de las ventajas comparativas que presenta la HF, su relativa juventud la posiciona como una tecnología en desarrollo. Existen varios estudios relacionados con HF empleando diferentes configuraciones de variables operativas y geométricas usando técnicas experimentales (Verboven *et al.*, 2003; Peralta *et al.*,

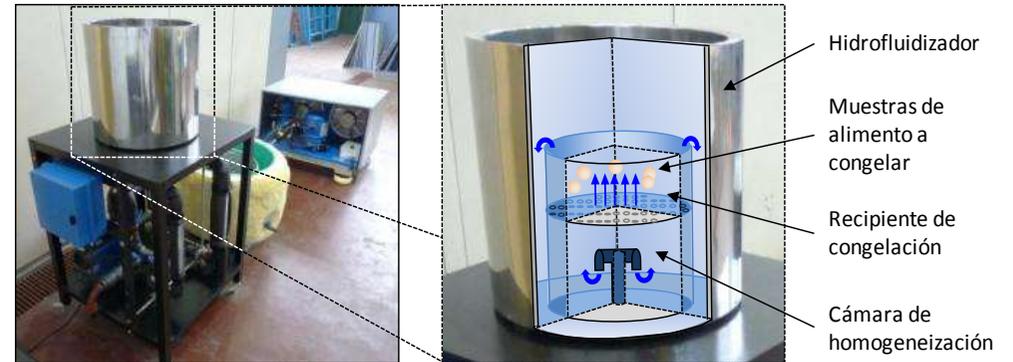


Figura 1. Sistema de hidrofluidización (batch) a escala planta piloto (Peralta *et al.*, 2009).

2009) y herramientas teóricas (Peralta *et al.*, 2010 y 2012). Hasta la fecha, se realizaron estudios del efecto del caudal y temperatura del líquido refrigerante y el efecto del número de orificios, arreglo de orificios y separación muestras–orificios y muestras–muestras (Peralta *et al.*, 2012; Belis *et al.*, 2012; 2013 y 2014) sobre las transferencias de energía, materia y momento dentro del sistema. Estos estudios posibilitaron mejorar el entendimiento de cómo se relacionan estas variables en sistemas de HF simples. Sin embargo, en estos trabajos se supone que las muestras de alimento son esferas que se encuentran en todo momento estáticas. Esto es debido a que los costos de los recursos para poder simular la interacción fluido–estructura son prohibitivos. Esta exigencia produce una limitación en la descripción del sistema HF y consecuentemente en el estudio del efecto de las variables sobre las transferencias. La resolución de este problema puede ser encarada en forma experimental y/o teórica. Desde el punto de vista teórico, existen varios métodos que pueden

emplearse, desde la resolución completa de la interacción fluido–estructura usando dinámica de fluidos computacional (CFD) hasta estrategias de simulación menos complejas, pero más prácticas, usando CFD en combinación con métodos de fase discreta y de elementos discretos (Fluent, 2011).

El modelo de fase discreta (*Discrete Phase Model* – DPM) es una herramienta computacional que permite modelar la dinámica de sistemas multifásicos, en la que la fase fluida es tratada como un medio continuo y se resuelve mediante la ecuación de Navier–Stokes, mientras que la fase discreta es resuelta mediante la aplicación de balances de momento para las partículas que se mueven a través del campo de flujo continuo. La aplicación de este método supone un ahorro de tiempo computacional muy significativo en comparación con la resolución completa de los balances usando interacción fluido–estructura con deformación de malla (Fluent, 2011). La principal limitación que presenta este método es que no resuelve el campo de flujo alrededor de las partículas (capa límite), no resuelve las interacciones partícula–partícula y sólo es aplicable en sistemas en que la fracción de volumen ocupada por la fase discreta es pequeña (menor a 10–12%) de modo que las interacciones entre las partículas no resulten significativas. En un sistema HF se espera que exista interacción entre las muestras de alimento. Esta interacción puede ser estimada combinando el DPM con el método de elementos discretos (*Discrete Element Method* – DEM). Este método utiliza balances de momento entre las partículas teniendo en cuenta las interacciones partícula–partícula compuestas por efectos elásticos, viscosos y de fricción (Fluent, 2011). Las interacciones propiamente dichas son calculadas mediante la deformación y la superposición que sufren las partículas.

La relación entre DPM y DEM se puede establecer mediante la ecuación de Navier–Stokes, debido a que el DPM calcula la trayectoria de las partículas utilizando esta ecuación y el DEM calcula las fuerzas generadas durante las interacciones de las partículas que luego deben ser tenidas en cuenta en la fase continua (Fluent, 2011).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de las principales variables geométricas y operativas sobre los campos de flujo y los perfiles de velocidad en un sistema de HF teniendo en cuenta el movimiento del alimento usando una combinación de CFD + DPM + DEM. La transferencia de energía, los niveles de turbulencia y los niveles de dispersión fueron estudiados en un trabajo complementario como Parte II (Oroná *et al.*, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema estudiado, arreglos geométricos y condiciones operativas estudiadas

El sistema de HF estudiado consistió en un recipiente cilíndrico (recipiente de congelación) de 100 mm de diámetro por 100 mm de altura con una placa con diferentes arreglos de orificios circulares de 3 mm de diámetro (d) en su base (**Figura 2**). Se usó un arreglo cuadrado de esferas estáticas de 10 mm de diámetro (D) ubicadas inicialmente a una altura (H_0) de 5 cm. En las esferas se usaron las propiedades de la papa (*Solanum tuberosum* L.) para modelar las transferencias en el alimento. El líquido refrigerante se consideró como una solución acuosa de NaCl 0.231 kg kg^{-1} (p/p) (Peralta *et al.*, 2012).

Se estudiaron dos arreglos cuadrados de orificios circulares separados a dos distancias diferentes entre los centros de los orificios ($S = 1$ cm, $S = 2$ cm), junto con tres arreglos de esferas ($E = 21$, $E = 29$, $E = 61$) (**Figura 2**). Las condiciones operativas estudiadas fueron: temperatura del refrigerante ($T = -5^\circ\text{C}$, $T = -10^\circ\text{C}$) y velocidad promedio del fluido en cada orificio ($V = 0.30$ m s⁻¹, $V = 0.59$ m s⁻¹, $V = 1.18$ m s⁻¹). Se estudiaron un total de 36 condiciones. Las mismas fueron codificadas como: $TaaVbbbScEdd$, donde por ejemplo, el código T10V059S2E29 corresponde a la condición con $T = -10^\circ\text{C}$, $V = 0.59$ m s⁻¹, $S = 2$ cm y $E = 29$.

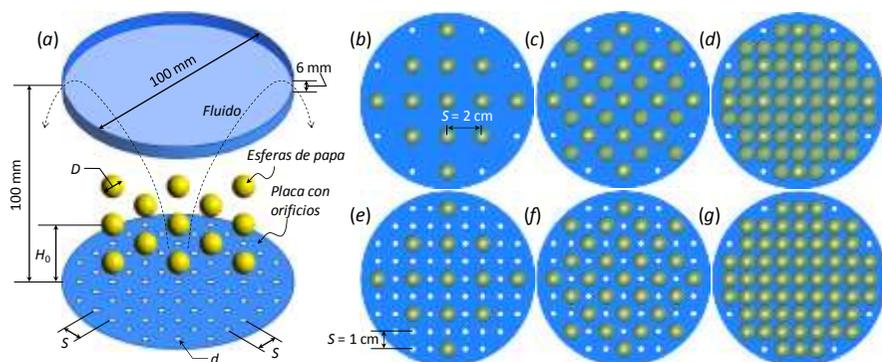


Figura 2. Esquemas (a) del sistema completo de HF estudiado (dominio físico) y vista en planta de los arreglos de orificios y esferas (inicial) usados: (b) $S = 2$ cm (21 orificios) y $E = 13$, (c) $S = 2$ cm y $E = 29$, (d) $S = 2$ cm y $E = 61$, (e) $S = 1$ cm (69 orificios) y $E = 13$, (f) $S = 1$ cm y $E = 29$, (g) $S = 1$ cm y $E = 61$.

Modelado matemático

El movimiento del fluido refrigerante en el dominio se estimó mediante un balance de momento (Navier–Stokes) y materia

(continuidad) usando CFD (Fluent, 2011). El efecto de la turbulencia se tuvo en cuenta mediante el uso del modelo de dos parámetros κ - ω *Shear Stress Transport* (SST) (Fluent, 2011).

Se consideró que las esferas pueden moverse dentro del sistema HF teniendo en cuenta las interacciones con el fluido refrigerante, con otras esferas y con las paredes. Estas interacciones se modelaron en base a balances de momento e información estructural del alimento. La interacción fluido–alimento se estimó por DPM, mientras que la interacción alimento–alimento fue incluida con el uso de DEM. Las colisiones fueron estimadas teniendo en cuenta efectos elásticos, viscosos y de fricción (Fluent, 2011). El vector velocidad de la esfera ρ (\underline{v}_p) se estimó mediante:

$$\frac{d\underline{v}_p}{dt} = \frac{18\mu C_D \text{Re}}{\rho_p D^2} (\underline{v}_f - \underline{v}_p) + \frac{(\rho_p - \rho)}{\rho_p} \underline{g} + [K\delta + \gamma(\underline{v}_{p-p'} \cdot \underline{e}_{p-p'})] \underline{e}_{p-p'} \quad (1)$$

donde \underline{v}_f es el vector velocidad local del fluido [m s⁻¹] calculado por CFD, ρ_p es la densidad de la esfera ρ [kg m⁻³], ρ es la densidad del líquido [kg m⁻³], \underline{g} es el vector aceleración de la gravedad [m s⁻²], μ es la viscosidad del líquido [Pa s], D es el diámetro de la esfera ρ [m], C_D es el coeficiente de fricción [adim.] estimado mediante el modelo de Wen–Yu (Fluent, 2011), Re es el número de Reynolds basado en D y K es la constante del resorte entre las esferas ρ y ρ' [adim.], δ es el solapamiento entre las esferas ρ y ρ' [adim.] cuando chocan, γ es el coeficiente de amortiguación [adim.], $\underline{v}_{p-p'}$ es el vector velocidad relativa entre las esferas ρ y ρ' [m s⁻¹] y $\underline{e}_{p-p'}$ es el vector normal unitario entre las esferas ρ y ρ' [adim.]. En la Ec. (1), los términos corresponden a las contribuciones por

fricción, flotación e interacciones entre las esferas, respectivamente.

Dominio computacional y variables analizadas

El dominio computacional en estudio fue similar al dominio físico, con una ranura de 6 mm de altura ubicada en la parte superior de la pared cilíndrica, considerada como la salida del líquido (**Figura 2**) (Peralta *et al.*, 2010). Las paredes sólidas fueron asumidas como adiabáticas y la presión del sistema de 0.1 MPa. El perfil de velocidad del fluido en cada orificio fue modelado mediante una expresión del tipo $1/7^{\text{mo}}$ y la intensidad de la turbulencia en cada orificio fue de 5% (Peralta *et al.*, 2010).

Para la discretización del dominio computacional se utilizó una malla compuesta por tetraedros, la cual fue más densa en la zona de los orificios.

El tiempo simulado en cada condición fue de 8 s. En los primeros 3 s se simuló solamente el fluido para permitir el desarrollo del mismo en el dominio y poder considerarlo en estado estacionario, y luego, en los 5 s posteriores fueron simuladas las esferas y sus interacciones.

Para la resolución de las ecuaciones de balance de momento (Navier–Stokes, DPM y DEM) se usó el paquete ANSYS–ICEM–CFD 14.1 y ANSYS–FLUENT 14.0 (ANSYS Inc., Canonsburg, USA). Las simulaciones fueron realizadas con una PC Intel core i7 3930 de 3.2 GHz con 16 GB de memoria RAM (DDR3 1600 MHz). Cada simulación demoró aproximadamente 90 h en converger.

Para obtener mayor representatividad del sistema en estudio, se seleccionaron variables promediadas en lugar de variables referidas a cada esfera tales como las velocidades promedio

de las esferas ($\langle v_p \rangle$) y relativas al fluido ($\langle v_{slip} \rangle$). Además, se obtuvieron contornos de velocidad y líneas de corriente para las condiciones estudiadas. Las velocidades se determinaron como:

$$\langle v_p \rangle = \frac{1}{V_T} \int_{V_T} |v_p| dV \quad (2)$$

$$\langle v_{slip} \rangle = \frac{1}{V_T} \int_{V_T} |v_p - v_f| dV \quad (3)$$

donde: $|v_p|$ es la magnitud v_p [m s^{-1}] y V_T es el volumen del dominio (incluyendo líquido y esferas) [m^3].

Validación

El modelo matemático fue validado usando datos de variables representativas de las transferencias. En este trabajo, se usó la velocidad de una esfera moviéndose por acción de la gravedad en un líquido estanco. Los datos fueron extraídos del modelo planteado por Nouri *et al.* (2014). Las transferencias de energía fueron validadas en la Parte II (Oroná *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Test de independencia de la malla y validación

La independencia de la composición de la malla con las variables estudiadas se verificó teniendo en cuenta los valores locales de $\langle v_p \rangle$, la velocidad promedio del fluido ($\langle v_f \rangle$) evaluada a $t = 3$ s para la condición T5V118S1E13, la cual se estimó como la más favorable para las transferencias. En base a este procedimiento y teniendo en cuenta variables de transferencias de energía e intensidad de turbulencia

verificadas en la Parte II (Oroná *et al.*, 2014), se evaluaron 6 composiciones de malla (desde 86296 y hasta 170770 elementos). Se seleccionó una malla compuesta por 170770 tetraedros. Además, se tuvo en cuenta que el tamaño de las esferas sea igual o menor que el tamaño de los elementos de la malla para minimizar problemas de convergencia en las simulaciones (Fluent, 2011). La **Figura 3** muestra los perfiles de las variables estudiadas en el procedimiento en función de las mallas elegidas.

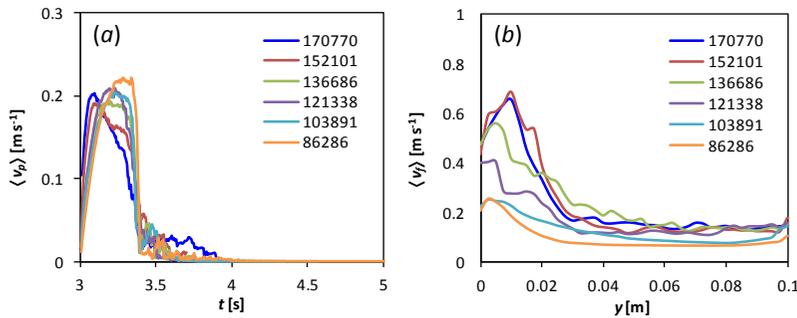


Figura 3. Independencia de la malla. Valores locales de (a) $\langle v_p \rangle$ en función del tiempo y (b) $\langle v_p \rangle$ en función de la posición axial para diferentes composiciones de malla.

La **Figura 4** muestra una comparación entre los valores de v_p y y_p obtenidos de simulaciones a partir del modelo planteado en este trabajo y los obtenidos por Nouri *et al.* (2014) para una esfera de $D = 1$ cm con $H_0 = 10$ cm moviéndose en un líquido estanco y para dos valores de ρ_p . Se obtuvo un error promedio porcentual menor al 1.5%, el cual se consideró excelente.

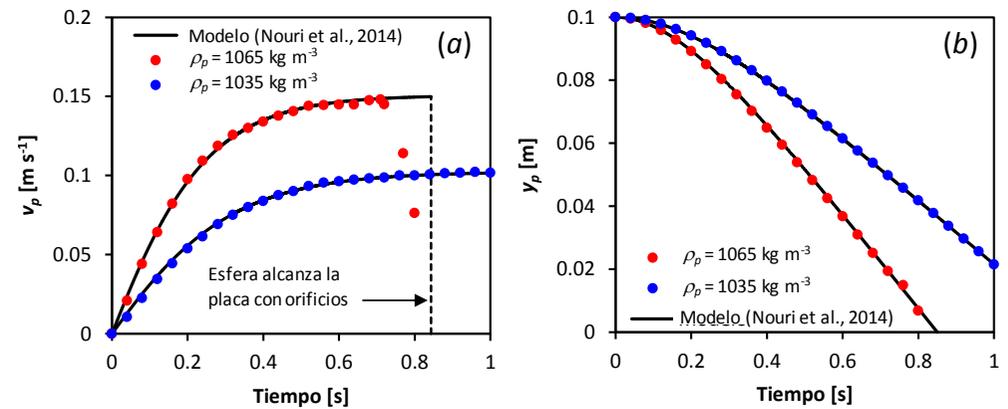


Figura 4. Comparación entre los valores de (a) v_p y (b) y_p obtenidos por CFD+DPM+DEM (círculos) y por Nouri *et al.* (2014) (línea) para una esfera usando dos valores de ρ_p .

Contornos de velocidad y líneas de corriente

Los contornos de velocidad, junto a sus correspondientes campos de líneas de corriente, para las diferentes condiciones estudiadas y $T = -10^\circ\text{C}$ se muestran en la **Figura 5**. Éstas se seleccionaron debido a la similitud de las mismas a diferentes valores de T . Los contornos y líneas de corriente mostrados están evaluados a $t = 3$ s (inmediatamente antes de la inyección de las esferas) y pertenecen a un corte en un plano arbitrario del dominio para que la información sea más fácilmente observable.

En general, los contornos de velocidad presentaron características similares a los observados por Belis *et al.* (2012) para sistemas similares de HF. En base a esto, un mayor S produjo mayores velocidades locales. Este incremento se hace más notable en la zona donde los jets se desarrollan. Las

líneas de corriente muestran que a menor S se produjeron grandes zonas de interacción entre los jets y grandes zonas de recirculación, siendo los jets más afectados los situados más cerca del centro geométrico del dominio. Estos comportamientos pueden deberse a que para un mayor S se produce un núcleo de jets que generan altas velocidades locales de fluido produciendo una corriente menos perturbable. Un menor S , produce una corriente de líquido menos.

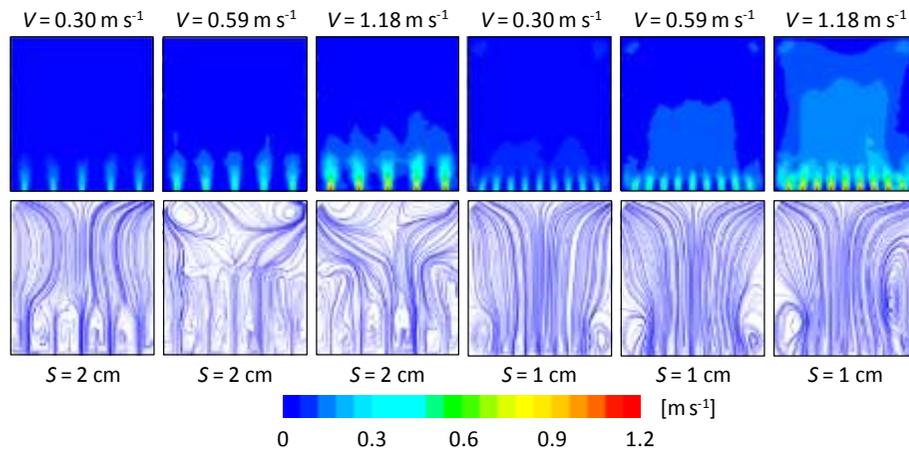


Figura 5. Contornos de velocidad y líneas de corriente para condiciones con $T = -10^\circ\text{C}$ evaluadas a $t = 3$ s.

intensa y más cíclica (aparición y desaparición de remolinos en forma periódica) debido a la interacción entre jets.

Comportamiento general de las esferas

La **Figura 6** muestra el comportamiento y las trayectorias de las esferas luego de ser inyectadas en el dominio para $T = -10^\circ\text{C}$ (debido a que T no presentó un efecto apreciable) en función del tiempo de inyección (Δt).

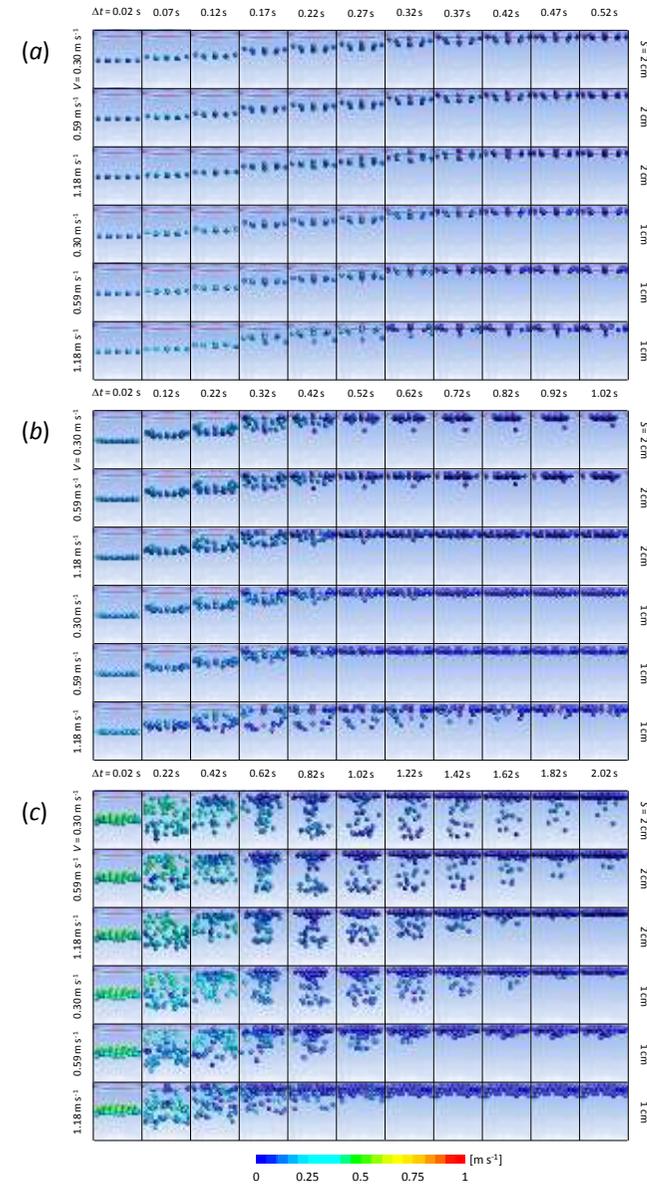
En general, se observó que las esferas, luego de ser inyectadas en el dominio, comienzan a ascender a diferentes velocidades de acuerdo a su posición radial inicial. En los casos de 13 y 29 esferas, estas trayectorias fueron siempre ascendentes. En general, la velocidad relativa de las esferas se correlacionó con las líneas de corriente para cada caso (**Figura 5**). Es decir, en los casos en donde se presentó principalmente un flujo primario ($S = 1$ cm), las esferas más rápidas resultaron las que fueron inyectadas en la zona central del dominio, en concordancia con la distribución de velocidades del fluido. Las esferas que se inyectaron en la periferia fueron más lentas y en algunos casos se observó el efecto de un flujo descendente de fluido debido a la presencia de remolinos. En los casos en donde se observó inicialmente flujo secundario ($S = 2$ cm), las esferas inyectadas en la periferia pudieron ascender más rápidamente en concordancia con las canalizaciones de fluido observadas en las líneas de corriente (**Figura 5**). Este comportamiento, denota que para los casos donde $E = 13$ y $E = 29$, las esferas no perturbaron apreciablemente el campo de flujo existente antes de inyectar las mismas al dominio. Todas las esferas terminaron en la interfaz líquido-aire en un lapso de tiempo menor a 1 s distribuyéndose aproximadamente de acuerdo al arreglo original en la inyección. En el caso de $E = 61$, la cercanía inicial de las esferas produce un rápido aumento local de la velocidad del fluido al pasar por los intersticios que dejan las esferas en el arreglo inicial

(Figura 2). Por la rapidez de este aumento y la constancia que tiene el caudal, se genera una fuerza que aumenta el área de paso del fluido para poder compensar el caudal. Este fenómeno provoca la dispersión de las esferas tanto en dirección axial como radial. Luego y en general, las esferas suben más rápidamente cerca de las paredes del recipiente y logran alcanzar la interfaz líquido–aire ($t = 0.42$ s). En este caso, debido a la gran cantidad de esferas que se acumulan en la zona de salida del líquido en el dominio, el fluido tiende a trasladarlas hacia el centro del dominio. La cantidad de esferas y la constancia de este flujo hacia el centro del dominio provocan un flujo axial secundario de líquido y esferas en el eje del dominio y en sentido descendente ($t = 0.62$ s). Este flujo secundario se mantiene hasta que se encuentra con el flujo principal del fluido en la zona cercana a los orificios, provocando el cambio de dirección de las esferas y su consecuente ascenso ($t > 0.82$ s). En general, un aumento en V y una disminución en S provocaron una aceleración en los fenómenos descritos anteriormente. El efecto de S sobre la velocidad de los eventos fue mayor que el de V .

Figura 6. Comportamiento de las esferas en el dominio con (a) 13 esferas, (b) 29 esferas y (c) 61 esferas, para $T = -10^\circ\text{C}$. El color de las esferas representa su velocidad.

Perfiles de velocidad absoluta de las esferas

En la **Figura 7** se puede observar los perfiles de $\langle v_p \rangle$ en función del tiempo para las condiciones.



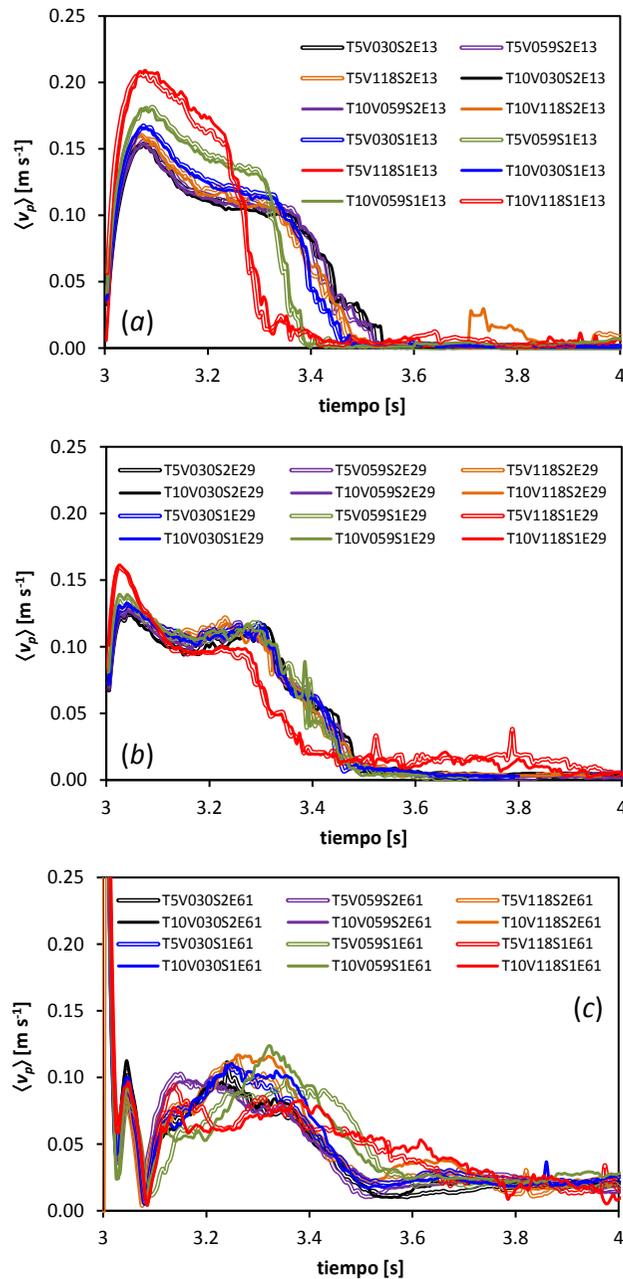


Figura 7. Perfiles de velocidad promedio de las esferas en función del tiempo para las condiciones estudiadas. (a) $E = 13$, (b) $E = 29$ y (c) $E = 61$.

Estudiadas (luego de ser inyectadas en el dominio). En general, los perfiles de $\langle v_p \rangle$ para las condiciones $E = 13$ y $E = 29$, presentaron un aumento inicial hasta alcanzar un máximo debido a la aceleración inicial producida por el contacto de las esferas con el fluido. Luego, los valores disminuyeron hasta alcanzar un descenso relativamente constante (o una meseta) en la mayoría de los casos, para finalmente volver a descender hasta hacerse cero cuando las esferas llegan a la interfaz líquido-aire.

El efecto de las variables operativas y geométricas sobre los perfiles de $\langle v_p \rangle$ fue más pronunciado para los casos donde $E = 13$. Los mismos fueron influenciados principalmente por S , V y marginalmente por T . En general, a menor S y a mayor V y T , se obtienen mayores valores de $\langle v_p \rangle$. Valores de S menores producen más zonas con velocidades altas de fluido reflejándose en perfiles con el máximo de velocidad más alto y el posterior descenso menos marcado. Un aumento en V produce un leve ascenso en el máximo y un periodo de velocidad constante más corto debido al menor tiempo de residencia. Es importante recordar que también la posición inicial de las esferas afectó su velocidad durante su ascenso. En concordancia con lo presentado en la **Figura 5**, las esferas ubicadas en la sección central del dominio presentaron valores más altos de $\langle v_p \rangle$ en comparación con las esferas que inicialmente se ubicaron cerca de las paredes.

En las simulaciones con $E = 29$, la mayoría de los perfiles fueron similares (con excepción de las condiciones con $S = 1$ cm y $V = 1.18$ m s⁻¹). Esto indica que en general el movimiento

de las esferas a través del dominio no fue afectado apreciablemente por las variables operativas y geométricas (**Figura 6b**). En los casos con $S = 1 \text{ cm}$ y $V = 1.18 \text{ m s}^{-1}$, el efecto sinérgico del número de orificios y la velocidad del fluido, produjo un pico más alto en los perfiles de $\langle v_p \rangle$. Debido a que el ascenso fue relativamente vertical, la distancia recorrida por las esferas fue en todos los casos aprox. 0.05 m. Esta constancia provoca que el área bajo los perfiles de $\langle v_p \rangle$ tienda a ser similar y que los perfiles de velocidad con $S = 1 \text{ cm}$ y $V = 1.18 \text{ m s}^{-1}$ disminuyan más rápidamente que los demás perfiles con $E = 29$. Finalmente, en los casos cuando $E = 61$, el efecto de las variables operativas y geométricas sobre $\langle v_p \rangle$ fue menos apreciable.

Perfiles de velocidad relativa (*slip*) de las esferas

Los perfiles de velocidad promedio relativa de las esferas ($\langle v_{slip} \rangle$) en función del tiempo se presentan en la **Figura 8**. Para los casos con $E = 13$ y $E = 29$, los perfiles en general presentaron evoluciones en las que inicialmente adquirieron un valor máximo igual a la velocidad del fluido en el punto donde las esferas son inyectadas. Luego, se observó un descenso debido a que las mismas comenzaron a desplazarse en forma ascendente (**Figura 6 a, b**), mientras que la velocidad del fluido disminuía en forma menos pronunciada, hasta alcanzar un valor mínimo correspondiente al momento en que las velocidades y la velocidad del fluido en la posición de las esferas se igualan. Posteriormente, se observó un segundo máximo en donde las esferas adquieren su máxima velocidad absoluta (**Figura 7 a, b**). A partir de ese punto, se observó un descenso hasta formar en general una meseta y luego un nuevo descenso aprox. constante hasta que las

esferas llegan a la cercanías de la interfaz líquido–aire. Finalmente se observa un marcado descenso hasta llegar a un valor final para los perfiles con $E = 13$ y un descenso menos marcado para los perfiles con $E = 29$. En el caso de $E = 13$, las esferas adoptaron las posiciones finales en la interfaz líquido–aire y en el caso de $E = 29$, las esferas siguen acomodándose en la interfaz líquido–aire.

En los casos con $E = 61$, si bien se observan los dos máximos en $\langle v_{slip} \rangle$, el descenso observado luego del segundo máximo es debido a la dispersión de las esferas dentro del dominio (*i.e.* más cantidad de esferas se ubican en zonas con velocidades de fluido más bajas). Luego se observa una meseta relacionada con el ascenso de las esferas principalmente en la zona cercana a las paredes del recipiente (**Figura 6c**). Finalmente, los perfiles de $\langle v_{slip} \rangle$ presentan un descenso monótono durante el flujo secundario de esferas en sentido descendente (**Figura 6c**) y su posterior reagrupación en la interfaz líquido–aire.

Para las condiciones con $V = 1.18 \text{ m s}^{-1}$ y $S = 1 \text{ cm}$, los perfiles de $\langle v_{slip} \rangle$ presentaron inicialmente características similares a los demás perfiles, aunque los valores finales de $\langle v_{slip} \rangle$ fueron mucho más altos y no se observó un descenso de velocidad luego del periodo de meseta observado para las otras condiciones.

El efecto de las variables operativas y geométricas sobre los valores de $\langle v_{slip} \rangle$ fue similar al observado para los perfiles de $\langle v_p \rangle$. Para $E = 13$, en general se observó que un descenso en S y un aumento en V y T (efecto marginal), producen mayores valores de $\langle v_{slip} \rangle$. Estos efectos fueron menos apreciables para los casos con $E = 29$ y casi despreciables para $E = 61$.

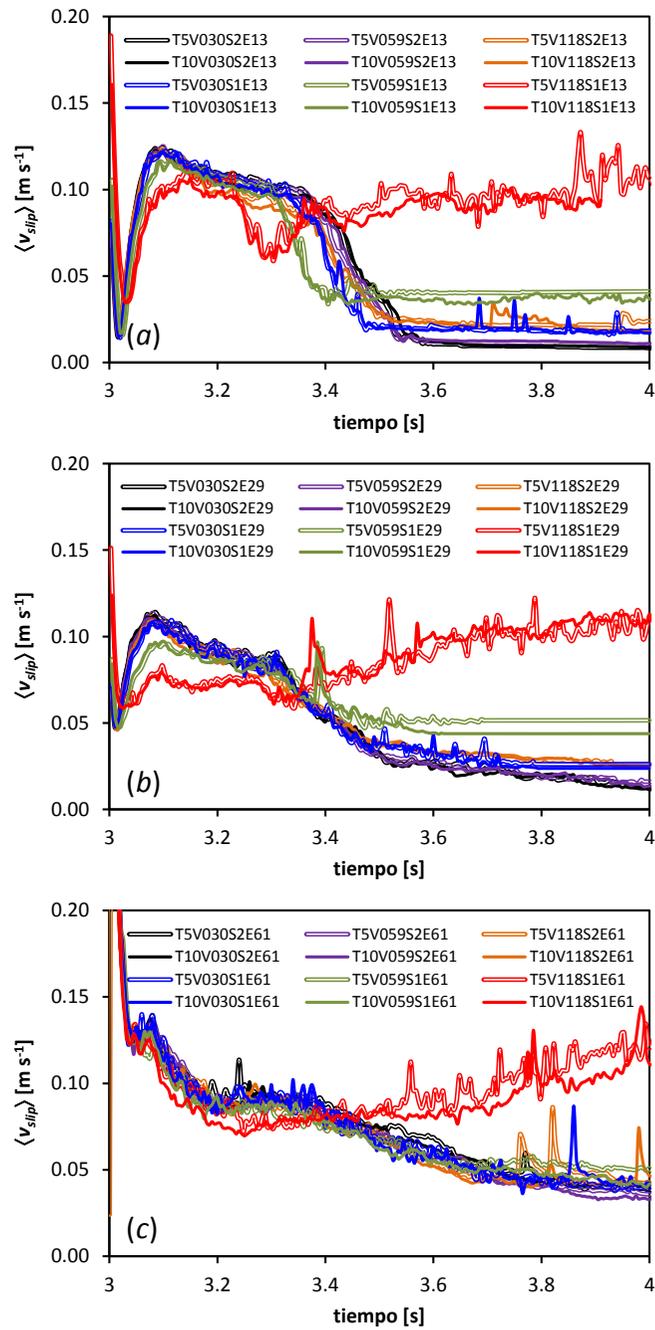


Figura 8. Perfiles de $\langle v_{slip} \rangle$ vs. el tiempo para todas las condiciones. (a) $E = 13$, (b) $E = 29$ y (c) $E = 61$.

CONCLUSIONES

Se realizó un estudio del efecto de las variables operativas (caudal y temperatura) y el número de orificios y muestras de alimento sobre las transferencias de momento y materia que tienen lugar en un proceso de congelación por hidrofuidización entre esferas móviles de alimento y el refrigerante. El trabajo consistió en modelar matemáticamente las transferencias separando el estudio de los fenómenos que ocurren en el refrigerante y en el alimento. En el caso del modelado en el dominio del fluido refrigerante, se resolvieron los balances de momento (Navier–Stokes) y continuidad usando la dinámica de fluidos computacional. En el caso del alimento, el efecto de las interacciones esfera–esfera, esfera–contorno y esfera–refrigerante fueron modeladas mediante la combinación de los métodos de fase discreta y elementos discretos. Se estudiaron variables representativas de las transferencias tales como las velocidades locales y relativas de las esferas, el comportamiento de las mismas, los contornos de velocidad y las líneas de corriente del refrigerante. Se verificó que tanto S como V afectaron a los campos de velocidad y líneas de corriente y que el movimiento de las esferas dentro del dominio y sus perfiles de velocidad fueron modificados por E , S y V .

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en su complementario (Parte II), se puede afirmar que este estudio produce una mejora sustancial en el entendimiento y desarrollo de la tecnología HF y métodos similares tales como la congelación de alimentos por inmersión. La combinación de CFD con DPM y DEM permite estudiar condiciones reales de

procesamiento en forma relativamente fácil, económica y con excelente precisión en los resultados. Estas características confieren a la herramienta desarrollada en este trabajo la capacidad de ser usada para estudiar, diseñar y eventualmente optimizar cualquier sistema que involucre flujo de un fluido que interactúe con piezas de alimento tales como frutas finas, arvejas, choclo, trozos de zanahorias y papa, y productos elaborados tales como frutas glaseadas, hortalizas saladas, productos congelados y osmóticamente deshidratados, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Belis EE, Zorrilla SE, Peralta JM. 2012. Fenómenos de transporte en un sistema de hidrofuidización afectado por el número de orificios y las variables operativas. En IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 14-16 de Noviembre. Córdoba. Argentina.
- Belis EE, Zorrilla SE, Peralta JM. 2013. Efecto del número de esferas estáticas de alimento y de orificios en la transferencia de energía en un sistema de hidrofuidización. En XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 23-25 de Octubre. Rosario. Argentina.
- Belis EE, Zorrilla SE, Peralta JM. 2014. Heat and mass transfer in a hydrofluidization system with multiple spheres. En IFT14 Annual meeting and food expo, 21-24 de Junio. New Orleans. USA.
- Fikiin AG. 1992. New method and fluidized water system for intensive chilling and freezing of fish. *Food Control*, 3(3): 153–160.

Fluent. 2011. Theory guide. ANSYS–FLUENT 14.1. Canonsburg: ANSYS Inc.

Nouri R, Ganji DD, Hatami M. 2014. Unsteady sedimentation analysis of spherical particles in Newtonian fluid media using analytical methods. *Propulsion and Power Research*, 3(2): 96–105.

Oroná, JD, Zorrilla SE, Peralta JM. 2014. Modelado matemático de un sistema de hidrofuidización usando esferas móviles II. Transferencia de energía, niveles turbulencia y dispersión. En Libro de Actas del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 17-19 de Noviembre. Córdoba. Argentina.

Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE. 2009. Design and construction of a hydrofluidization system. Study of the heat transfer on a stationary sphere. *Journal of Food Engineering*, 90(3): 358–364.

Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE. 2010. Mathematical modeling of the heat transfer and flow field of liquid refrigerants in a hydrofluidization system with a stationary sphere. *Journal of Food Engineering*, 99(3): 303–313.

Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE. 2012. Mathematical modeling of the heat and mass transfer in a stationary potato sphere impinged by a single round liquid jet in a hydrofluidization system. *Journal of Food Engineering*, 109(3): 501–512.

Verboven P, Scheerlinck N, Nicolai BM. 2003. Surface heat transfer coefficients to stationary spherical particles in an experimental unit for hydrofluidisation freezing of individual foods. *International Journal of Refrigeration*, 26(3): 328–336.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional del Litoral (UNL), y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, de la Argentina.

MODELADO MATEMÁTICO DE UN SISTEMA DE HIDROFLUIDIZACIÓN USANDO ESFERAS MÓVILES. II. TRANSFERENCIA DE ENERGÍA, NIVELES DE TURBULENCIA Y DISPERSIÓN

Oroná J.D., Zorrilla S.E., Peralta J.M.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química
(UNL-CONICET). Santa Fe, Argentina
jorona@fiq.unl.edu.ar

Resumen. Se estudió el efecto de las principales variables geométricas y operativas sobre la transferencia de energía, los niveles de turbulencia y de dispersión de las esferas en un sistema de hidrofuidización (HF) teniendo en cuenta el movimiento del alimento. Los balances de momento y materia en el líquido se plantearon usando dinámica de fluidos computacional. El movimiento del alimento se estimó mediante métodos de fase y elementos discretos. El sistema de HF estudiado, junto con los parámetros, las variables operativas usadas y su discretización computacional, fue el descrito en la Parte I del presente trabajo. El modelo se validó parcialmente con datos de transferencia de energía y se usó para estudiar los coeficientes locales y promedio de transferencia superficial de energía, los niveles de turbulencia y de dispersión de las esferas. Los resultados mostraron que el número de esferas, el número de orificios y la velocidad de fluido en los orificios afectaron apreciablemente todas las variables estudiadas.

Palabras Clave: Hidrofuidización, Transferencia de Energía, CFD, DEM, DPM.

Abstract. The effect of the main operative variables on the heat transfer, turbulence levels and dispersion levels of the food samples in a hydrofluidization (HF) system was studied. Momentum and mass balances were estimated using computational fluid dynamics and the velocity of the food samples was calculated using a combination of a discrete phase method and a discrete element method. The studied HF system and the main parameters and operative variables and its computational discretization were described in Part I of this work. The mathematical model, that was partially validated using heat transfer data, was used to estimate local and area-averaged surface heat transfer coefficient, turbulence levels and dispersion levels of the spheres. Results showed that the number of the spheres and orifices, and the area-averaged fluid velocity on the orifices, affected all the studied variables.

Keywords: Hydrofluidization, Heat transfer, CFD, DEM, DPM.

INTRODUCCIÓN

La hidrofuidización (HF) es un método que se basa en el bombeo de un líquido refrigerante en dirección ascendente por medio de orificios o boquillas hacia el interior de un recipiente ocupado por líquido refrigerante, generando chorros de líquido y obteniéndose un medio altamente turbulento en contacto directo con el alimento, además de altos coeficientes de transferencia superficial (Fikiin, 1992; Peralta *et al.*, 2012). Esta tecnología presenta algunas ventajas interesantes tales como la congelación rápida, separación de los productos, reducida contaminación, posibilidad de que nuevos productos puedan ser formulados incluyendo los antioxidantes apropiados, aromas y macronutrientes para extender la vida útil de los productos y para mejorar su valor nutricional y sus propiedades sensoriales (Fikiin, 1992). Por sus características, la HF es muy atractiva para procesar alimentos de tamaño pequeño tal como frutas finas (frutillas, cerezas, etc.), arvejas, choclo, trozos de zanahorias y papa, y productos elaborados tales como frutas glaseadas, hortalizas saladas, etc. Sin embargo, su relativa juventud la posiciona como una tecnología en desarrollo.

Así como se indicó en la Parte I (Oroná *et al.*, 2014), existen varios estudios de sistemas de HF teóricos y experimentales empleando diferentes configuraciones de variables operativas y geométricas. Sin embargo, y aunque en los mismos se hayan obtenido valiosa información del efecto de las variables operativas sobre las transferencias de energía, materia y momento, las configuraciones usadas fueron simplificadas y las muestras de alimento se asumieron estáticas. Estas

simplificaciones redundaron en una descripción limitada del problema en estudio y por lo tanto nuevos estudios usando múltiples muestras de alimento en movimiento son necesarios.

Una estrategia para minimizar el alto costo computacional de modelar objetos en movimiento en el seno de un fluido es combinar la dinámica de fluidos computacional (CFD) con métodos de fase discreta (DPM) y elementos discretos (DEM) (Fluent, 2011). El uso de DPM y DEM consiste en aplicar balances de momento a cada partícula del dominio para estimar su velocidad y posición. Estos balances tienen en cuenta las fuerzas de interacción partícula-partícula, partícula-fluido y partícula-pared.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de las principales variables geométricas y operativas sobre la transferencia de energía, los niveles de turbulencia y de dispersión de las esferas en un sistema de hidrofuidización teniendo en cuenta el movimiento del alimento. Los campos de flujo, líneas de corriente, velocidades absolutas y relativas de las esferas y comportamiento de las mismas fueron estudiados en un trabajo complementario presentado como Parte I (Oroná *et al.*, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema estudiado, arreglos geométricos y condiciones operativas estudiadas

El sistema de hidrofuidización y las condiciones estudiadas fueron las usadas en la Parte I de este trabajo (Oroná *et al.*, 2014).

Modelado matemático

Los campos de flujo y las velocidades absolutas y relativas de las esferas fueron modeladas en la Parte I de este trabajo (Oroná *et al.*, 2014) mediante la resolución de los balances de masa (continuidad) y momento (Navier–Stokes) en el líquido refrigerante y con balances de momento usando un método de fases discretas (DPM) y un método de elementos discretos (DEM) para las esferas. El efecto de la turbulencia fue estimado mediante el modelo de dos parámetros κ - ω *Shear Stress Transport* (SST) (Fluent, 2011).

La transferencia de energía entre el fluido refrigerante y las esferas fue estimada mediante la Ec. (4), la cual es una correlación empírica de Nusselt en base a números adimensionales representativos del flujo (Re y Pr) (Green y Perry, 2008; Fluent, 2011).

$$Nu_D = 2 + (0.4 Re_D^{1/2} + 0.06 Re_D^{2/3}) Pr^{0.4} \left(\frac{\mu}{\mu_s} \right)^{1/4} \quad (4)$$

donde: Nu_D es el número de Nusselt basado en el diámetro de las esferas ($h_c D/k$) [adim.], Re_D es el número de Reynolds basado en el diámetro de las esferas ($\rho D v_{slip}/\mu$) [adim.], Pr es el número de Prandtl ($C_p \mu/k$) [adim.], μ es la viscosidad del refrigerante a la temperatura del refrigerante [Pa s], μ_s viscosidad del refrigerante a la temperatura de la esfera [Pa s], h_c es el coeficiente de transferencia superficial de energía de cada esfera [$W m^{-2} K^{-1}$], D es el diámetro de las esferas [m], k es la conductividad térmica del refrigerante [$W m^{-1} K^{-1}$], ρ es la densidad del refrigerante [$kg m^{-3}$], v_{slip} es la magnitud de la velocidad local relativa de las esferas con respecto a la velocidad local del fluido [$m s^{-1}$] y C_p es la capacidad calorífica

del refrigerante [$J kg^{-1} K^{-1}$]. La Ec. (4) es válida para $0.7 < Pr < 380$, $3.5 < Re_D < 8 \times 10^4$ y $1 < \mu/\mu_s < 3.2$ (Green y Perry, 2008). Es importante mencionar que la temperatura de la esfera usada para estimar μ_s fue calculada como el promedio entre la temperatura del refrigerante y la temperatura inicial de la esfera.

Dominio computacional y variables analizadas

El dominio computacional, las condiciones de contorno, la naturaleza de la malla, los tiempos de simulación y el software numérico para resolver los balances planteados fueron presentados en la Parte I (Oroná *et al.*, 2014).

Se estudiaron variables representativas de las transferencias de energía y niveles de turbulencia y dispersión. Esas variables fueron los niveles promedio de turbulencia ($\langle Tu \rangle$) para todo el dominio y los coeficientes de transferencia superficial de energía promediados en el volumen ($\langle h_c \rangle$) y en el tiempo ($\langle\langle h_c \rangle\rangle$). Para obtener un grado de representatividad mayor del sistema en estudio, se seleccionaron variables promediadas en lugar de variables referidas a cada esfera. Las variables estudiadas fueron determinadas en base a las siguientes expresiones:

$$\langle Tu \rangle = \frac{1}{V_T} \int_{V_T} Tu dV \quad (5)$$

$$\langle h_c \rangle = \frac{1}{V_T} \int_{V_T} h_c dV \quad (6)$$

$$\langle\langle h_c \rangle\rangle = \frac{1}{t_{Res} - t_{Res}} \int_{t_{Res}} \langle h_c \rangle dt \quad (7)$$

donde: Tu es el nivel de turbulencia local [adim.], V_T es el volumen del dominio (incluyendo líquido y esferas) [m³] y t_{Res} es el tiempo de residencia total de las esferas dentro del dominio [s].

Finalmente, el grado de separación entre las esferas (importante indicador para estimar la probabilidad aglutinamiento en el producto final congelado) fue evaluado mediante el grado de dispersión de las esferas dentro del dominio usando el parámetro de distancia mínima media adimensional ($\langle d \rangle_t$) (Clark y Evans, 1954; Illian *et al.*, 2008; O'Sullivan y Unwin, 2010):

$$\langle d \rangle_t = \langle d_{\min} \rangle_t / \langle d_{\min} \rangle_0 = \left\{ \sum_{i=1}^n \min_{i \neq j} \{d_{ij}(t)\}_{j=1}^n \right\} / \left\{ \sum_{i=1}^n \min_{i \neq j} \{d_{ij}(0)\}_{j=1}^n \right\} \quad (8)$$

donde: $\min_{i \neq j} \{d_{ij}\}_{j=1}^n$ es el valor mínimo de d_{ij} en el conjunto de distancias Euclidianas (Deza y Deza, 2013) entre todas las esferas $\{d_{i1}, d_{i2}, d_{i3}, \dots, d_{in}\}$ sin tener en cuenta las distancias $d_{i=j}$ (*i.e.* las distancias a sus mismos centros geométricos).

Validación

El modelo matemático fue parcialmente validado usando datos de variables representativas de las transferencias. En este trabajo, se usaron datos de transferencia de energía obtenidos de Belis *et al.* (2012) para un sistema similar de HF con esferas estáticas (considerado como referencia debido a que los valores de h_c se obtuvieron de datos de capa límite). Además, las transferencias de momento fueron validadas usando datos de velocidad de una esfera moviéndose por acción de la gravedad en un líquido estanco (Nouri *et al.*,

2014). Esta última validación es presentada en la Parte I (Oroná *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Test de Independencia de la malla y validación

El procedimiento de comprobación de independencia de la composición de la malla fue el mismo que el usado en la Parte I (Oroná *et al.*, 2014). También se usaron los niveles de turbulencia promedio en todo el dominio ($\langle Tu \rangle$) evaluado a $t = 3$ s y el coeficiente de transferencia superficial de energía promedio para todas las esferas ($\langle h_c \rangle$) evaluado a $t = 3$ s para la condición T5V118S1E13, la cual se estimó como la más favorable para las transferencias. Se seleccionó la misma malla que la usada en la Parte I (Oroná *et al.*, 2014). La **Figura 1** muestra los perfiles de las variables estudiadas en el procedimiento en función de las mallas elegidas.

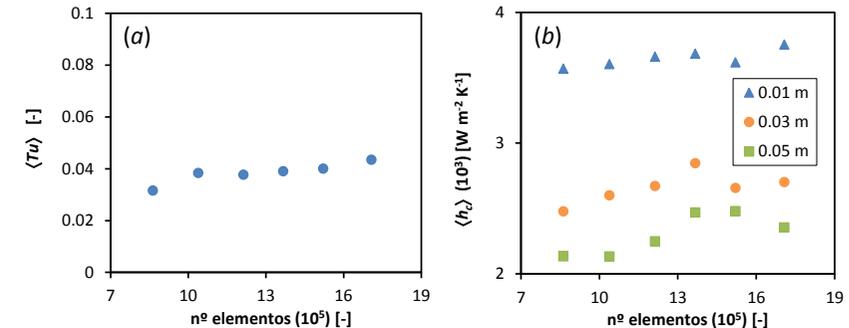


Figura 1. Independencia de la malla. Valores locales de (a) $\langle Tu \rangle$ y (b) $\langle h_c \rangle$ en función del número de elementos. La condición usada fue T5V118S1E13

Se validó el modelo planteado comparando los valores del coeficiente promedio de transferencia superficial de energía con los correspondientes obtenidos por Belis *et al.* (2012) usando un arreglo cuadrado de 13 esferas de 2 cm de diámetro separadas 2 cm entre sus centros geométricos y a una distancia entre la placa de orificios y los puntos de estancamiento de 1 cm y 5 cm. Se usó el tiempo inicial de inyección de las esferas. En total se compararon 8 condiciones en un rango de $1000 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1} < h_c < 5000 \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-1}$. Se obtuvo un error promedio porcentual del 13%, el cual se consideró muy bueno. La **Figura 2** muestra la comparación entre los valores de h_c predichos en este trabajo y los correspondientes de Belis *et al.* (2012).

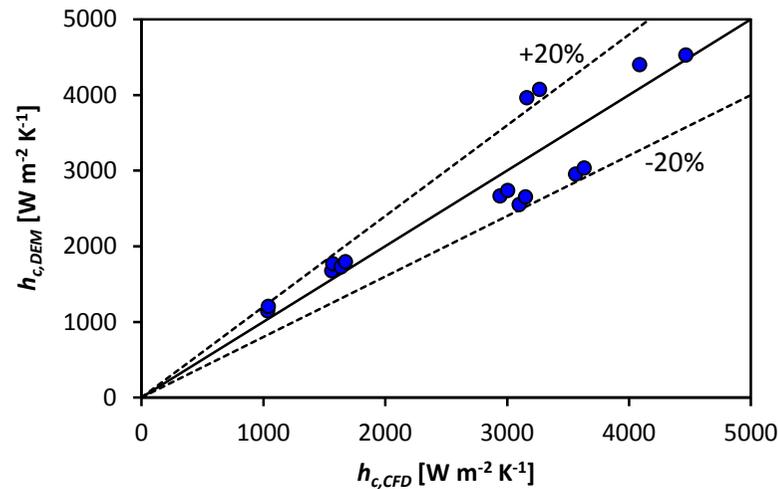


Figura 2. Comparación entre los valores de h_c predichos en este trabajo ($h_{c,DEM}$) y los correspondientes de Belis *et al.* (2012) ($h_{c,CFD}$). Las líneas a trazos representan un error promedio porcentual de $\pm 20\%$.

Niveles de turbulencia

El efecto de las variables operativas sobre los niveles de turbulencia en el dominio fue estudiado mediante el nivel de turbulencia relativa evaluado a $t = 4 \text{ s}$ ($\langle Tu \rangle_{rel}$). Este parámetro fue determinado mediante la relación $\langle Tu \rangle / \langle Tu \rangle_{ref}$, donde $\langle Tu \rangle_{ref}$ es el nivel de turbulencia $\langle Tu \rangle$ evaluado para la condición con el menor valor a $t = 4 \text{ s}$. En la **Figura 3** se observan los valores de $\langle Tu \rangle_{rel}$ para las condiciones estudiadas. Se adoptó como condición de referencia a T5V030S2E13.

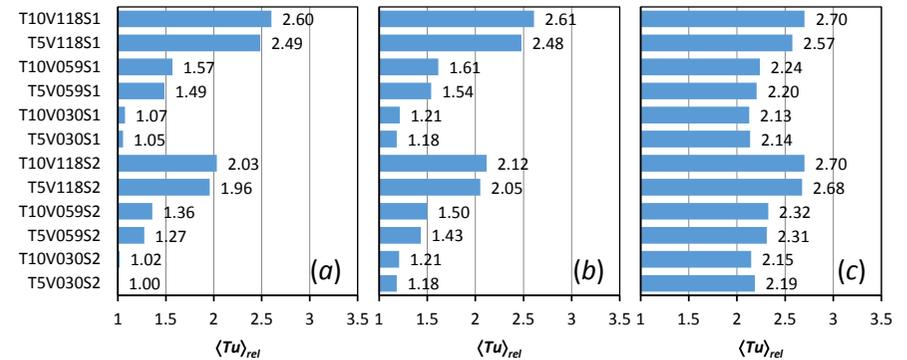


Figura 3. Valores de $\langle Tu \rangle_{rel}$ para todas las condiciones estudiadas. (a) $E = 13$, (b) $E = 29$ y (c) $E = 61$.

En general, la variable que más afectó a los valores de $\langle Tu \rangle_{rel}$ fue V , seguida de S y por último T . Un aumento en V y una disminución en S y T provocaron un aumento en $\langle Tu \rangle_{rel}$. Para los casos con $E = 13$ y $E = 29$, se observó que $\langle Tu \rangle_{rel} \approx 0.4 V / V_{min}$, $\langle Tu \rangle_{rel} \approx -1.35 S / S_{min}$ y $\langle Tu \rangle_{rel} \approx -0.39 T / T_{min}$. El efecto del número de esferas no se observó entre los casos con $E = 13$ y $E = 29$, debido a que las esferas no habrían conseguido modificar el campo de flujo apreciablemente (Oroná *et al.*,

2014). En los casos con $E = 61$, los valores de $\langle Tu \rangle_{rel}$ resultaron mayores debido a que un mayor número de esferas habría afectado apreciablemente al campo de flujo, produciendo un mayor número de remolinos en el dominio.

Niveles de dispersión de las esferas

La **Figura 4** muestra los perfiles del coeficiente de dispersión $\langle d \rangle_t$ en función del tiempo para todas las condiciones estudiadas. En general, se observa un incremento inicial de los valores de $\langle d \rangle_t$ hasta alcanzar un máximo o una zona de máximos para $3.2 < t < 3.4$. Este incremento inicial se debería a la interacción de las esferas con el fluido provocando una separación axial, además de la separación radial que poseen las esferas

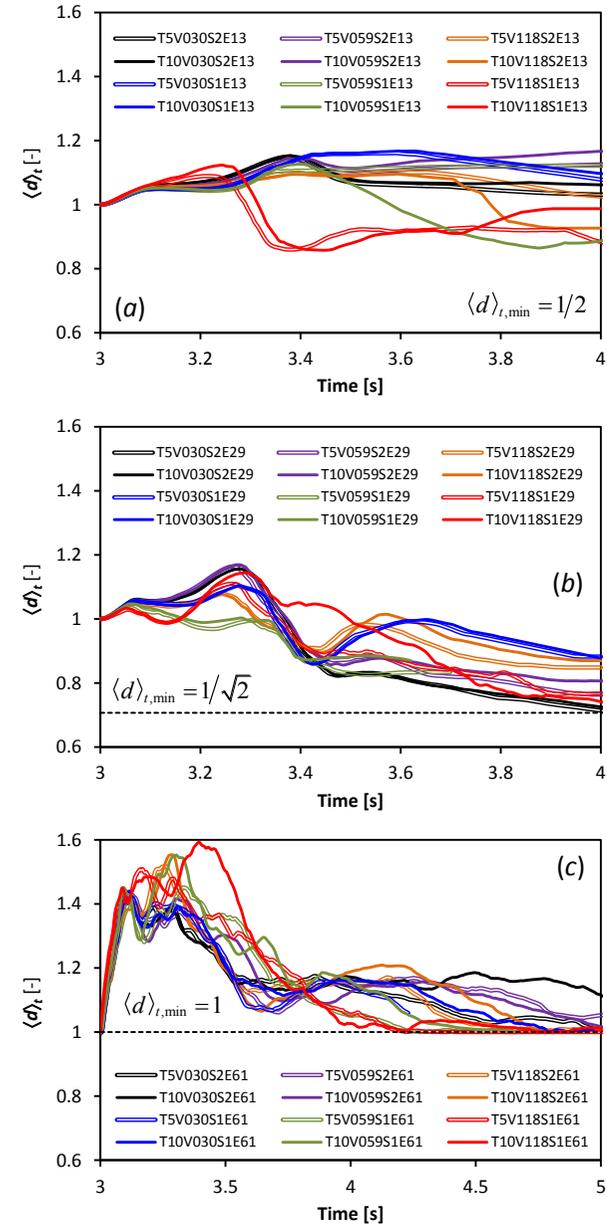


Figura 4. Valores de $\langle d \rangle_t$ para todas las condiciones estudiadas. (a) $E = 13$, (b) $E = 29$ y (c) $E = 61$.

inicialmente. Luego, se observa una disminución producida por la agrupación de las esferas al desplazarse por el dominio hasta llegar a la interfaz líquido–aire.

En los casos cuando $E = 13$ (**Figura 4a**), se observa que para $S = 2$ cm y valores bajos de V , el fluido transporta a las esferas casi sin perturbar su posición radial inicial (Oroná *et al.*, 2014). Esto produce que los valores de $\langle d \rangle_t$ permanezcan casi constantes en el tiempo. Para valores de $S = 1$ cm, a medida que V aumenta, los valores de $\langle d \rangle_t$ disminuyen más rápidamente. Esta disminución se podría deber a que el mayor caudal del fluido transporta más rápidamente a las esferas provocando que se agrupen más fácilmente cuando llegan a la interfaz líquido–aire. Es importante mencionar que los perfiles de $\langle d \rangle_t$ no disminuyen hasta alcanzar su valor mínimo de $\langle d \rangle_{t_{\min}} = 1/2$ (*i.e.* cuando las esferas se tocan).

Cuando $E = 29$ (**Figura 4b**), todas las condiciones exhiben una disminución de $\langle d \rangle_t$ luego de alcanzar la zona de máximos. En este caso se observa que para $S = 2$ cm, un aumento de V produce una menor agrupación de las esferas a medida que suben por el dominio (Oroná *et al.*, 2014). Este fenómeno no se observa para $S = 1$ cm. En general, todos los perfiles tienden al valor mínimo de $\langle d \rangle_{t_{\min}} = 1/\sqrt{2}$ a diferentes velocidades.

Finalmente, cuando $E = 61$ (**Figura 4c**), los perfiles de $\langle d \rangle_t$ presentan la particularidad de una segunda zona de máximos. Esto se debe a que el flujo secundario de esferas y líquido para los tiempos $t > 3.62$ (Oroná *et al.*, 2014) permite que las esferas se agrupen en esta corriente y presentando un mínimo en los valores de $\langle d \rangle_t$. Luego, al subir las esferas en el flujo primario, los valores de $\langle d \rangle_t$ aumentan por el efecto del líquido

que separa las esferas mientras suben hasta llegar a la interfaz líquido–aire. Los perfiles, tienden al valor mínimo de $\langle d \rangle_{t_{\min}} = 1$. Es importante mencionar que los máximos observados para $t < 3.5$, son mayores para las condiciones con $S = 1$ cm. Además, para estas condiciones, el efecto de V es mayor. Esto puede observarse en la distribución de las esferas (Oroná *et al.*, 2014).

Se observa que el incremento inicial de $\langle d \rangle_t$ es mayor para un mayor valor de E debido a que las esferas inicialmente se encuentran más cercanas entre sí y cualquier movimiento produce un aumento relativo. En general, se observa que T no presentó un efecto apreciable sobre los perfiles de $\langle d \rangle_t$.

Coefficiente de transferencia superficial de energía promedio

La **Figura 5** muestra los perfiles de $\langle h_c \rangle$ en función del tiempo para todas las condiciones estudiadas y para un rango de $3 \text{ s} < t < 4 \text{ s}$. En la misma se puede observar que los perfiles presentaron un formato similar al observado para las velocidades relativas de las esferas ($\langle v_{slip} \rangle$) (Oroná *et al.*, 2014). Además, el efecto de las variables operativas sobre $\langle h_c \rangle$ fue similar al encontrado en $\langle v_{slip} \rangle$. Esto es debido a que la Ec. (4) no produciría un cambio significativo en la forma en que el efecto de las variables transfieren información desde $\langle v_{slip} \rangle$ a $\langle h_c \rangle$.

Para observar un efecto más representativo del proceso global sobre la transferencia de energía, los valores de $\langle h_c \rangle$ fueron promediados en el tiempo para obtener $\langle\langle h_c \rangle\rangle$ mediante la Ec. (7), donde $t_{Res} = t_f - t_0 = 5 \text{ s}$. En la **Tabla 1** se resumen los valores de $\langle\langle h_c \rangle\rangle$ para todas las condiciones estudiadas. En la misma se observa que un aumento de E y V y una disminución

en S produjeron un aumento en $\langle\langle h_c \rangle\rangle$. El efecto de T sobre $\langle\langle h_c \rangle\rangle$ fue despreciable. En general, las variaciones usadas en las variables operativas produjeron $\langle\langle h_c \rangle\rangle / \langle\langle h_c \rangle\rangle_{\min} \approx 0.035 E/E_{\min}$, $\langle\langle h_c \rangle\rangle / \langle\langle h_c \rangle\rangle_{\min} \approx 0.2 V/V_{\min}$, $\langle\langle h_c \rangle\rangle / \langle\langle h_c \rangle\rangle_{\min} \approx -1.7 S/S_{\min}$.

Tabla 1. Valores de $\langle\langle h_c \rangle\rangle$ para las condiciones estudiadas.

Condición	$\langle\langle h_c \rangle\rangle$ [W m ⁻² K ⁻¹]	Condición	$\langle\langle h_c \rangle\rangle$ [W m ⁻² K ⁻¹]	Condición	$\langle\langle h_c \rangle\rangle$ [W m ⁻² K ⁻¹]
T5V030S1E13	1009	T5V059S1E13	1395	T5V118S1E13	2152
T5V030S1E29	1159	T5V059S1E29	1539	T5V118S1E29	2189
T5V030S1E61	1226	T5V059S1E61	1385	T5V118S1E61	2276
T5V030S2E13	780	T5V059S2E13	831	T5V118S2E13	1116
T5V030S2E29	875	T5V059S2E29	964	T5V118S2E29	1150
T5V030S2E61	1060	T5V059S2E61	1093	T5V118S2E61	1177
T10V030S1E13	962	T10V059S1E13	1291	T10V118S1E13	1987
T10V030S1E29	1090	T10V059S1E29	1402	T10V118S1E29	2120
T10V030S1E61	1131	T10V059S1E61	1179	T10V118S1E61	2243
T10V030S2E13	776	T10V059S2E13	824	T10V118S2E13	1000
T10V030S2E29	850	T10V059S2E29	890	T10V118S2E29	1111
T10V030S2E61	1057	T10V059S2E61	1053	T10V118S2E61	1164

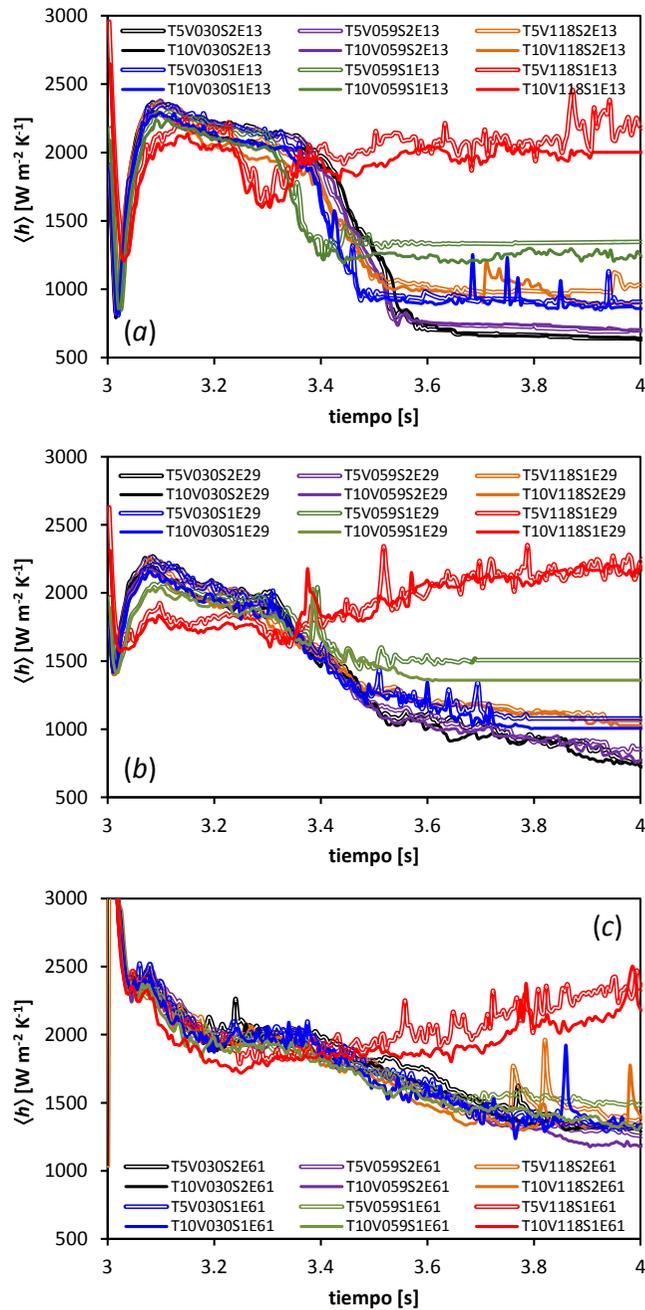


Figura 5. Perfiles de $\langle h \rangle$ en función del tiempo para las condiciones estudiadas. (a) $E = 13$, (b) $E = 29$ y (c) $E = 61$.

CONCLUSIONES

Se realizó un estudio del efecto de las variables operativas (caudal y temperatura) y el número de orificios sobre las transferencias de momento, energía y materia que tienen lugar en un proceso de congelación por hidrofuidización entre esferas móviles de alimento y el refrigerante. El trabajo consistió en modelar matemáticamente las transferencias y se llevó a cabo separando el estudio de los fenómenos que ocurren en el refrigerante y dentro del alimento. Esto fue posible debido a la diferencia de órdenes de magnitud entre las transferencias de momento en el refrigerante (medio con altas velocidades de fluido y altos niveles de turbulencia) y las transferencias de energía y materia.

En el caso del modelado en el dominio del fluido refrigerante, se resolvieron los balances de momento (Navier–Stokes) y continuidad usando la dinámica de fluidos computacional (CFD). El efecto de las interacciones esfera–esfera, esfera–contorno y esfera–refrigerante fueron modeladas mediante la combinación de los métodos de fase discreta (DPM) y elementos discretos (DEM). Se estudiaron variables representativas de las transferencias tales como los promediados del coeficiente de transferencia de energía superficial, las velocidades locales y relativas de las esferas, los niveles de turbulencia promedio, los contornos de velocidad y las líneas de corriente.

En general, la variable que más influyó sobre la velocidad promedio y relativa de las esferas y los coeficientes promedio de transferencia superficial de energía fueron el número de esferas, la separación entre orificios y la velocidad promedio

del fluido en los orificios. La temperatura del refrigerante tuvo un efecto marginal. Por otro lado, la transferencia de energía dentro de las esferas fue afectada por E , S , V y T .

En base a los resultados obtenidos en este trabajo y en su complementario (Parte I), se puede vislumbrar que este estudio produce una mejora sustancial en el entendimiento y desarrollo de la tecnología HF y métodos similares tales como la congelación de alimentos por inmersión. La combinación de CFD con DPM y DEM permite estudiar condiciones reales de procesamiento en forma relativamente fácil, económica y sin perder precisión en los resultados. Estas características confieren a la herramienta desarrollada en este trabajo la capacidad de ser usada para estudiar, diseñar y eventualmente optimizar cualquier sistema que involucre flujo de un fluido que interactúe con piezas de alimento tales como frutas finas, arvejas, choclo, trozos de zanahorias y papa, y productos elaborados tales como frutas glaseadas, hortalizas saladas, productos congelados y osmóticamente deshidratados, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- Belis EE, Zorrilla SE, Peralta JM. 2012. Fenómenos de transporte en un sistema de hidrofuidización afectado por el número de orificios y las variables operativas. En IV Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 14 al 16 de Noviembre. Córdoba. Argentina.
- Clark PJ, Evans FC. 1954. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. *Ecology*, 35(4): 445–453.

- Deza, M. M., Deza, E. 2013. Encyclopedia of distances. 2da ed. Springer: Springer Verlag.
- Fikiin AG, 1992. New method and fluidized water system for intensive chilling and freezing of fish. Food Control, 3(3): 153–160.
- Fluent. 2011. Theory guide. ANSYS–FLUENT 14.1. Canonsburg: ANSYS Inc.
- Green D, Perry R. 2008. Perry's chemical engineers' handbook. 8va ed. New York: McGraw–Hill.
- Illian J, Penttinen A, Stoyan H, Stoyan D. 2008. Statistical analysis and modelling of spatial point patterns. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Nouri R, Ganji DD, Hatami M. 2014. Unsteady sedimentation analysis of spherical particles in Newtonian fluid media using analytical methods. Propulsion and Power Research, 3(2): 96–105.
- Oroná, JD, Zorrilla SE, Peralta JM. 2014. Modelado matemático de un sistema de hidrofuidización usando esferas móviles I. Transferencia de momento. En Libro de Actas del V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTAC 2014), 17 al 19 de Noviembre. Córdoba. Argentina.
- O'Sullivan D, Unwin DJ. 2010. Geographic information analysis. 2da ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE, 2010. Mathematical modeling of the heat transfer and flow field of liquid refrigerants in a hydrofluidization system with a stationary sphere. Journal of Food Engineering, 99(3): 303–313.
- Peralta JM, Rubiolo AC, Zorrilla SE, 2012. Mathematical modeling of the heat and mass transfer in a stationary potato sphere impinged by a single round liquid jet in a hydrofluidization system. Journal of Food Engineering, 109(3): 501–512.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional del Litoral (UNL), y por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, de la Argentina.

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA AL FLUJO DE AIRE DE GRANOS DE CHÍA (*Salvia hispanica* L.)

Provensal C.³, Sologubik C.A.^{1,2,3}, Gely M.C.^{2,3}, Pagano A.M.^{2,3}

1: CONICET

2: TECSE - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN)

3: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN), Olavarría, Argentina.

apagano@fio.unicen.edu.ar

Resumen: Se estudió la resistencia al flujo de aire en lecho profundo de granos de chía de producción argentina bajo diferentes condiciones considerando los factores velocidad de flujo de aire (V), profundidad del lecho (H), humedad del grano (M) y tipo de empaque (T), con vistas a estimar la potencia de ventilación necesaria para operaciones de post-cosecha (aireación/secado). La muestra original fue acondicionada a humedades de 8,7, 11,56 y 15,03% b.s. (base seca). El silo piloto fue llenado mediante dos métodos para obtener diferentes empaques (rango 360,7-437,2 kg/m³). La pérdida de carga unitaria (DPu) se evaluó en el rango 0,036-0,178 m³/(s·m²) para profundidades de 0,14 y 0,44 m. DPu resultó entre 490 Pa/m (15,04% bs, 0,14 m, 0,036 m³/(s·m²), empaque flojo 360,7 kg/m³) y 5250 Pa/m (8,72% bs, 0,14 m, 0,178 m³/(s·m²), empaque denso 437,2 kg/m³). Los resultados se analizaron por ANOVA para evaluar la influencia de los parámetros sobre DPu. Se encontró efecto significativo ($p < 0,05$) de los factores V, M, H y T sobre DPu, así como de las interacciones (M×V), (V×H), (M×T), (M×H), (V×T) y (H×T),

además de otras. Los modelos de Shedd y Hukill-Ives resultaron apropiados para describir la resistencia al flujo de aire de granos de chía.

Palabras Clave: chía, pérdida de carga, lecho profundo, aireación/secado, post-cosecha.

Abstract: The pressure-drop across a column of chía grains of argentine production was studied under different conditions, considering the factors airflow rate (V), bed depth (H), grain moisture (M) and packing type (T), with the aim of estimate the power ventilation needed for post-harvest operations (aeration/drying). The original sample was conditioned at moistures of 8.7, 11.56 and 15.03% db (dry basis). Pilot silo was filled by two methods to obtain different packing (range 360.7-437.2 kg/m³). Pressure-drop per unit bed depth (DPu) was evaluated in the range 0.036-0.178 m³/(s·m²) for bed depths of 0.14 and 0.44 m. DPu resulted between 490 Pa/m (15.04% bs, 0.14 m, 0.036 m³/(s·m²), loose fill 360.7 kg/m³) and 5250 Pa/m (8.72% bs, 0.14 m, 0.178 m³/(s·m²), dense fill 437.2 kg/m³). Results were analyzed by ANOVA in order to evaluate the influence of the parameters on the DPu. Significant effect ($p < 0.05$) of V, M, H, T, and interactions (M×V), (V×H), (M×T), (M×H), (V×T) and (H×T), between others, were found. Models of Shedd and Hukill-Ives were appropriated for description of the airflow resistance of chía grains.

Keywords: chía, pressure-drop, deep bed, aeration/drying, post-harvest.

INTRODUCCIÓN

El grano de chía (*Salvia hispanica* L.) es producido por una planta herbácea anual originaria de México y Guatemala cultivada en épocas de las culturas precolombinas. Es una semilla pequeña rica en aceite (30-38%) compuesto principalmente por ácidos grasos insaturados Ω -3 (destacándose el alfa-linolénico representando un 64%); además el grano tiene elevado contenido de proteínas (19-23%), fibra y antioxidantes (Romero-Manilla *et al.* 2006, Capitani *et al.* 2012, Bushway *et al.* 1981, Taga *et al.* 1984, Ixtaina *et al.* 2008, Ixtaina *et al.* 2011).

En Argentina se iniciaron cultivos de chía en Salta y Tucumán hacia los '90 en búsqueda de nuevas alternativas productivas. Debido al gran interés generado y a la insuficiente información disponible, desde 2008 se han desarrollado proyectos sobre manejo del cultivo (fechas/densidad de siembra, plagas, enfermedades, malezas). Sin embargo, no existen estudios referidos al manejo post-cosecha del grano.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la resistencia al flujo de aire de granos de chía en lecho profundo a fin de establecer la potencia de ventilación necesaria en operaciones de post-cosecha (aireación/secado) bajo diferentes condiciones: velocidad de flujo de aire, profundidad de lecho, humedad del grano, tipo/densidad de empaque, evaluando la influencia de estos parámetros sobre la pérdida de carga unitaria (DPu).

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Se emplearon granos limpios y secos de chía de producción argentina provistos por INTI (Partido de 9 de Julio, Provincia de Buenos Aires, Argentina). La muestra original fue dividida en tres sub-muestras por medio de un cuarteador, y éstas se acondicionaron a humedades de 8,7, 11,56 y 15,03% bs (base seca), y se conservaron bajo refrigeración hasta su uso.

Equipo piloto

Se utilizó un equipo (**Figura 1**) diseñado para estudios de la resistencia al flujo de aire de materiales particulados en la Facultad de Ingeniería de la UNICEN (Pagano *et al.* 1998). La planta piloto consta de un silo cilíndrico vertical de 0,26 m de diámetro y 1 m de altura construido en chapa galvanizada, equipado con sistema de impulsión de aire e instrumentos para la medición de la caída de presión diferencial (Dwyer-Series modelo 2000 Magnehelic, exactitud/precisión: $\pm 2\%$ de escala, rangos: 0–6 mmca, 0–25 mmca, 0–80 mmca, 0–25 cmca, menor division: 0,2; 0,5; 2,0; y 0,5 respectivamente).

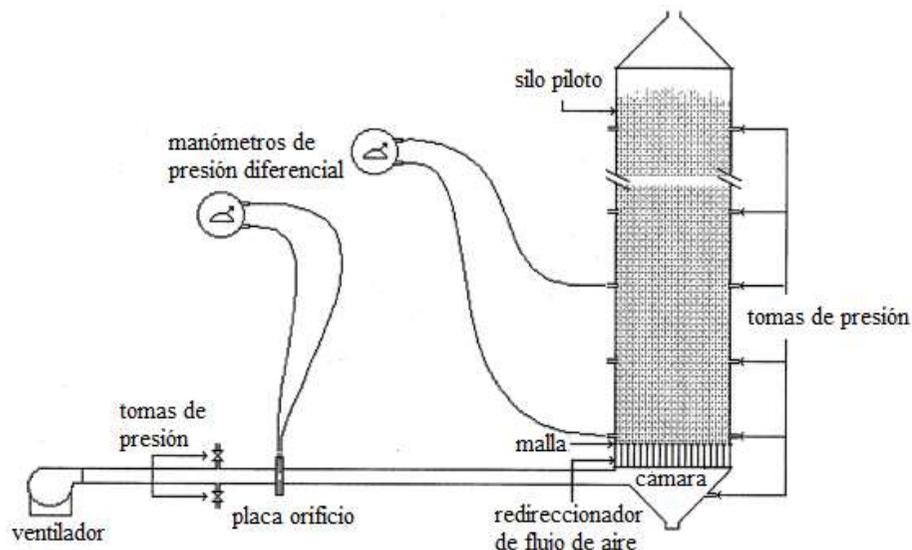


Figura 1: Esquema del equipo experimental empleado para el estudio de la resistencia al flujo de aire de granos de chí.

Diseño experimental

El estudio experimental se llevó a cabo en la planta piloto de la Facultad de Ingeniería – UNICEN, trabajando sobre un diseño experimental factorial considerando los factores velocidad de flujo de aire (V : rango $0,036-0,178 \text{ m}^3/\text{s m}^2$), profundidad del lecho (H : $0,14$ y $0,44 \text{ m}$), humedad del grano (M : $8,7$, $11,56$ y $15,03\%$ b.s.) y tipo de empaque (T : "flojo" y "denso"), por triplicado.

Determinación de humedad

El contenido de humedad de los granos se evaluó según AOAC (1995) por triplicado.

Determinación de peso hectolítrico

El peso hectolítrico (que representa una medida de la densidad aparente, ρ_{aparente}) (Mora, 1997) de los granos acondicionados a cada nivel de humedad se determinó mediante balanza Schopper de acuerdo al método 55-10 de AACC (AACC, 1995) por triplicado.

Determinación de la densidad real del grano

La densidad real del grano (ρ_{real}) acondicionado a los distintos niveles de humedad se evaluó mediante picnometría líquida con tolueno a temperatura ambiente por triplicado.

Método de llenado del silo

El silo piloto fue cargado desde el tope empleando dos métodos para obtener empaques "flojos" y "densos" con diferentes densidades (rango $360,7-437,2 \text{ kg/m}^3$). El empaque "flojo" se logró por el método de Shedd (1951, 1953) realizando la carga de los granos mediante un embudo que se fue desplazando lentamente desde el fondo del silo permitiendo que el material granular se deslice conformando el lecho sin caída libre. El empaque "denso" se obtuvo cargando los granos en forma de lluvia desde el tope del silo (1 m de altura). Luego el lecho fue enrasando eliminando el talud natural de los granos.

Porosidad del lecho

La porosidad del lecho (ε) de granos se determinó mediante la siguiente **Ec. (1)** (Mohsenin, 1970) a partir de la densidad real del grano y de la densidad aparente.

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{real}}} \right) \quad (1)$$

Procedimiento experimental

Para cada contenido de humedad del grano y tipo de empaque, la pérdida de carga en el lecho (DP, Pa) se evaluó a profundidades de 0,14 y 0,44 m para velocidades de flujo de aire entre 0,036-0,178 m³/(s·m²) por triplicado. El caudal de flujo de aire se reguló desde una válvula instalada en la cañería. La velocidad de flujo de aire (V) en el lecho se midió en la placa orificio calibrada mediante la **Ec. (2)**.

$$V = \frac{0,265 \cdot \sqrt{\Delta P}}{\text{Área} \cdot 60} \quad (2)$$

donde ΔP : caída de presión del aire al atravesar la placa orificio (mmca); Área: sección transversal del silo (m²).

Modelado de la resistencia al flujo de aire

Las curvas experimentales de pérdida de carga unitaria en el lecho en función de la velocidad de flujo de aire fueron

modeladas mediante las ecuaciones de Shedd (**Ec. 3**) y Hukill-Ives (**Ec. 4**) (Shedd 1953, Pagano *et al.* 1998, ASAE 1999).

$$DP_u = A \cdot V^B \quad (3)$$

$$DP_u = \frac{a \cdot V^2}{\ln(1 + b \cdot V)} \quad (4)$$

Tratamiento estadístico de los datos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) ($\alpha=0,05$) mediante el software SYSTAT V12, a fin de evaluar el efecto de los parámetros velocidad de flujo de aire (V), contenido de humedad del grano (M), profundidad del lecho (H) y tipo de empaque (T) sobre la pérdida de carga unitaria en el lecho (DPu).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del material de estudio

Como resultado de la caracterización de los granos acondicionados a tres niveles de humedad, se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Tabla 1** para las propiedades peso hectolítrico, densidad real, densidad aparente y porosidad.

Tabla 1: Peso hectolítrico, densidad aparente, densidad real y porosidad del lecho de las muestras de chíá empleadas en el estudio.

Contenido de humedad M (% b.s.)	Peso hectolítrico (kg/hL)	Densidad aparente $\rho_{aparente}$ (kg/m ³)	Densidad real ρ_{real} (kg/m ³)	Porosidad ε (%)
8,72 (± 0,06)	64,15 (± 0,37)	641,46 (± 3,67)	907,2 (± 1,3)	29,3 (± 0,30)
11,56 (± 0,07)	57,73 (± 0,13)	577,32 (± 1,27)	931,2 (± 39,0)	37,9 (± 2,47)
15,03 (± 0,13)	55,87 (± 0,23)	558,65 (± 2,30)	868,3 (± 12,8)	35,7 (± 0,68)

Guiotto *et al.* (2011) han reportado correlaciones para la variación de la propiedad densidad real y densidad aparente con el contenido de humedad. En la **Figura 1** se presentan estas predicciones (líneas) comparadas con las determinadas experimentalmente (puntos) en el presente trabajo. Se observa que las tendencias son similares para ambas propiedades.

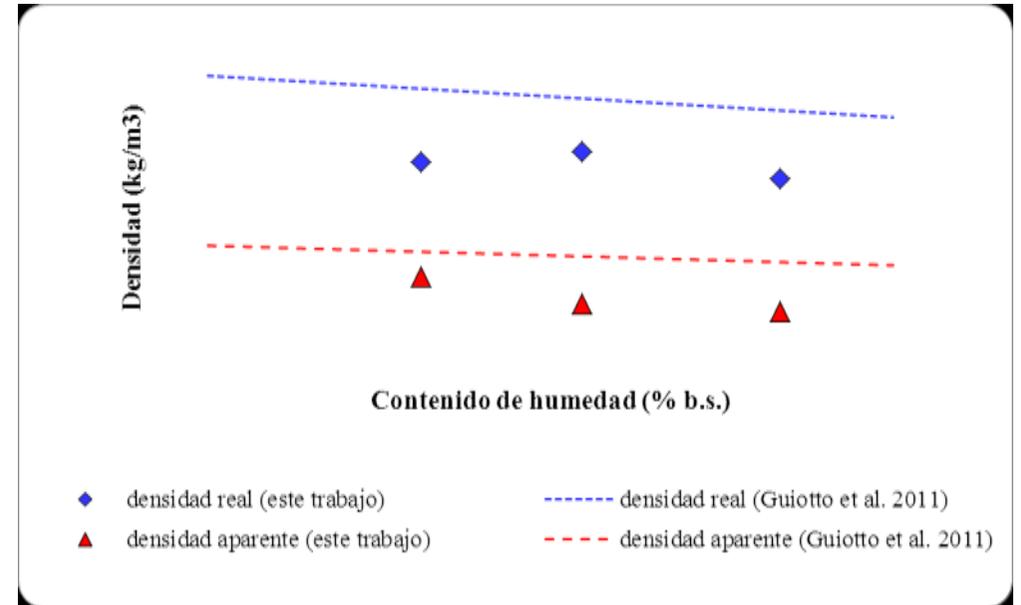


Figura 1: Densidad aparente y densidad real de granos de chíá de las muestras de estudio comparadas con la bibliografía.

Respecto a la porosidad, el promedio de los valores presentados en la **Tabla 1** resultó 34,3% en el rango de estudio, comparable con el valor medio reportado por Guiotto *et al.* (2011) en el rango 4,6-17,7% b.s. (35,3%).

Análisis de los datos de caída de presión en el lecho durante la aireación de los granos

Se obtuvieron experimentalmente 324 datos de pérdida de carga (DP) en el lecho de granos de chíá a diferentes profundidades (0,14 y 0,44 m), en el rango de velocidades de flujo de aire de 0,036 m³/(s·m²) a 0,178 m³/(s·m²), para dos tipos de empaque diferentes ("flojo" y "denso").

A partir de estos resultados se obtuvieron las correspondientes pérdidas de carga unitarias ($DP_u = DP/H$) que se muestran en la **Figura 3** para empaque "flojo" y **Figura 4** para empaque "denso".

La resistencia al flujo de aire resultó entre 490 Pa/m (15,04% bs, 0,14 m, 0,036 $m^3/(s \cdot m^2)$), empaque flojo con 360,7 kg/m^3) y 5250 Pa/m (8,72% bs, 0,14 m, 0,178 $m^3/(s \cdot m^2)$), empaque denso con 437,2 kg/m^3).

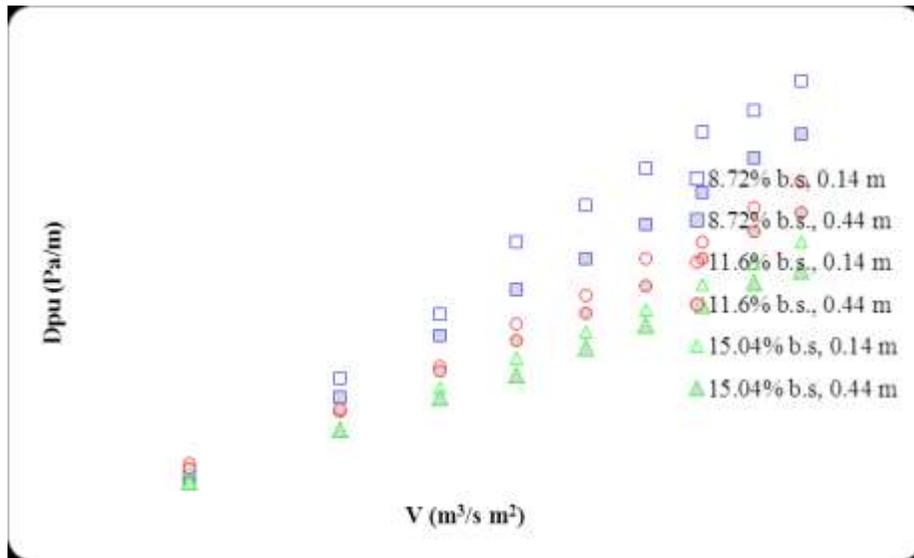


Figura 3: Pérdida de carga unitaria en el lecho de granos de chíá con empaque "flojo" en el rango de velocidad de flujo de aire de de 0,036 a 0,178 $m^3/(s \cdot m^2)$.

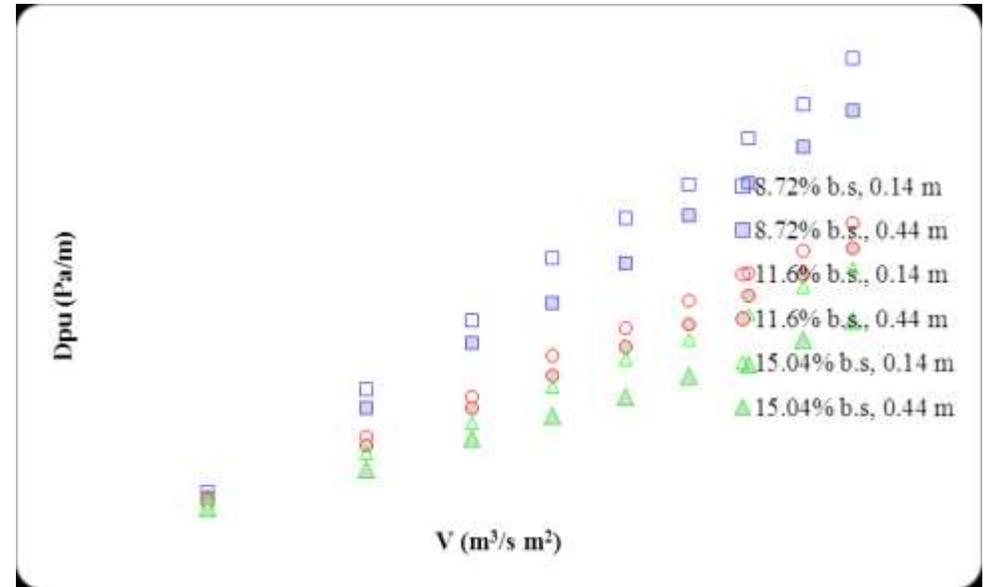


Figura 4: Pérdida de carga unitaria en el lecho de granos de chíá con empaque "denso" en el rango de velocidad de flujo de aire de de 0,036 a 0,178 $m^3/(s \cdot m^2)$.

El análisis de la varianza permitió establecer que existe un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de los factores V, M, H y T (en este orden) sobre DP_u , así como de las interacciones ($M \times V$), ($V \times H$), ($M \times T$), ($M \times H$), ($V \times T$) y ($H \times T$), además de otras, tal como se muestra en la **Tabla 2**.

Dado que la velocidad de flujo de aire resultó ser el parámetro con mayor influencia sobre la resistencia al flujo de aire de los granos de chíá (seguido por el contenido de humedad, luego por la profundidad de lecho y finalmente por el tipo de empaque), se analizó la funcionalidad entre DP_u y V a través

del ajuste de modelos clásicos de la bibliografía: modelo de Shedd y Hukill-Ives (ASAE, 1999).

Tabla 2: Análisis de la varianza (ANOVA) del efecto de los parámetros M0, V, H y T (y de sus interacciones) sobre la resistencia al flujo de aire (DPu) de granos de chíá.

Factor	grado de libertad	F	p
M	2	9764,92	$7,70 \times 10^{-12}$
V	8	9107,15	$3,88 \times 10^{-12}$
H	1	1502,90	$1,37 \times 10^{-11}$
T	1	614,77	$1,56 \times 10^{-11}$
M×V	16	285,66	$4,42 \times 10^{-12}$
M×H	2	81,67	$1,61 \times 10^{-11}$
M×T	2	376,26	$1,19 \times 10^{-11}$
V×H	8	37,91	$9,73 \times 10^{-12}$
V×T	8	14,04	$1,34 \times 10^{-11}$
H×T	1	23,31	$2,61 \times 10^{-06}$
M×V×H	16	2,44	$2,04 \times 10^{-03}$
M×V×T	16	10,67	$1,06 \times 10^{-11}$
M×H×T	2	29,28	$2,09 \times 10^{-11}$
V×H×T	8	0,72	0,671
M×V×H×T	16	1,67	0,056

La **Tabla 3** muestra los resultados obtenidos en el ajuste de estos modelos en el rango de estudio, para cada una de las profundidades de lecho y densidades de empaque empleadas. Se presentan los valores de las constantes de los modelos junto con los correspondientes criterios estadísticos utilizados para evaluar el grado de ajuste de los datos experimentales (coeficiente cuadrático de correlación R^2 , error estándar de la estimación del parámetro ASE).

Tabla 3: Coeficientes de los modelos de Shedd y Hukill-Ives para granos de chíá.

MODELO DE SHEDD							
Empaque	M (% b.s.)	H (m)	A	ASE(A)	B	ASE(B)	R^2
"flojo"	8.72	0.14	31694	1758	1.138	0,028	0.999
		0.44	28613	1326	1.160	0.024	0.999
	11.60	0.14	22734	1111	1.112	0.025	0.999
		0.44	18649	779	1.048	0.022	0.999
	15.04	0.14	17897	590	1.080	0.017	0.999
		0.44	15295	590	1.041	0.020	0.999
"denso"	8.72	0.14	37576	2043	1.158	0.028	0.999
		0.44	35335	1095	1.184	0.016	0.999
	11.60	0.14	22050	669	1.080	0.016	0.999
		0.44	20599	760	1.088	0.019	0.999
	15.04	0.14	31695	1758	1.137	0.028	0.999
		0.44	28614	1326	1.160	0.024	0.999
MODELO DE HUKILL-IVES							
Empaque	M (% b.s.)	H (m)	a	ASE(a)	b	ASE(b)	R^2
"flojo"	8.72	0.14	53205	15077	2.587	0.857	0.998
		0.44	58421	11335	3.441	0.813	0.999
	11.60	0.14	38727	8336	2.480	0.621	0.999
		0.44	16918	6245	1.073	0.426	0.999
	15.04	0.14	22835	529	1.667	0.368	0.999
		0.44	11129	857	0.836	0.386	0.999
"denso"	8.72	0.14	77824	6411	3.486	0.897	0.999
		0.44	83972	9118	4.400	0.606	0.999
	11.60	0.14	27874	138	1.650	0.338	0.999
		0.44	28858	751	1.884	0.423	0.999
	15.04	0.14	27721	7536	1.934	0.594	0.999
		0.44	6024	5561	0.465	0.444	0.999

Puede notarse en la **Tabla 3** que tanto el modelo de Shedd como el de Hukill-Ives resultaron igualmente apropiados para describir la resistencia al flujo de aire de granos de chíá, obteniéndose coeficientes de correlación mayores que 0,998 en todos los casos.

CONCLUSIONES

Se ha estudiado la resistencia al flujo de aire de granos de chía (*Salvia hispanica* L.) en el rango de velocidad de flujo de aire de 0,036 a 0,178 m³/(s·m²) para contenidos de humedad del grano entre 8,72 y 15,04% b.s. para distintos tipos de empaque, generando información nueva para el diseño de las operaciones de postcosecha (aireación/secado).

La caída de presión resultó entre 490 Pa/m (15,04% bs, 0,14 m, 0,036 m³/(s·m²), empaque flojo con densidad 360,7 kg/m³) y 5250 Pa/m (8,72% bs, 0,14 m, 0,178 m³/(s·m²), empaque denso con densidad 437,2 kg/m³).

Tanto la velocidad del aire, como la humedad del grano y la profundidad del lecho (y sus interacciones) resultaron influyentes sobre la pérdida de carga unitaria.

Los resultados experimentales de resistencia al flujo de aire de granos de chía pudieron ser modelados con precisión por los modelos de Shedd y Hukill-Ives.

BIBLIOGRAFÍA

American Association of Cereal Chemists. 1995. Approved Methods of the AACC, 9th ed. Method 55-10, revised October 1982, reviewed October 1994. The Association: St. Paul, MN.

AOAC. 1995. Official methods of analysis. Washington: Association of Official Analytical Chemistry.

Bushway AA, Belyea PR, Bushway RJ. 1981. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *Journal of Food Science*, 46: 1349-1350.

Capitani MI, Spotorno V, Nolasco SM, Tomás MC. 2012. Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 45: 94-102.

Coates, W., & Ayerza, R. (1996). Production potential of chia in northwestern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 5, 229e233.

Guiotto E, Ixtaina V, Tomas M, Nolasco SM. 2011. Influence of moisture content on physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Trans. ASABE* 54(2): 527-533.

Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorno V, Mateo CM, Maestri DM, Diehl BW, Nolasco SM, Tomás MC. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 166-174.

Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. 2008. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial Crops and Products*, 28(3): 286-293.

Kashaninejad M, Maghsoudlou Y, Khomeiri M, Tabil LG. 2010. Resistance to airflow through bulk pistachio nuts (*Kalleghochi*

variety) as affected by moisture content, airflow rate, bed depth and fill method. *Powder Technology*, 203(2): 359-364.

Kashaninejad M, Tabil LG. 2009. Resistance of bulk pistachio nuts (*Ohadi* variety) to airflow. *Journal of Food Engineering*, 90(1): 104-109.

Kenghe RN, Nimkar PM, Shirkole SS, Shinde KJ. 2012. Airflow resistance in soybean. *International Agrophysics*, 26(2): 137-143.

Mohsenin NN. 1970. *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. New York, N.Y.: Gordon and Breach Science).

Mora J. 1997. *Glosario técnico sobre factores de calidad en granos básicos*. FAO, San José, Costa Rica.

Pagano AM, Crozza DE, Nolasco SM. 1998. Pressure drop through in-bulk flax seeds. *JAOCs*, 75(12): 1741-1747.

Romero-Manilla R, Beltrán-Orozco MC, Salgado Cruz MP. 2006. Evaluación de la calidad de la proteína de las semillas chía (*Salvia hispanica* L.). IV Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica y XV Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, Morelia, Michoacán, México, Abril 2006, 344.

Shedd CK. 1951. Some new data on resistance of grains to airflow, *Agric. Eng.* 32:493-495, 520.

Shedd CK. 1953. Resistance of grains and seeds to airflow, *Ibid.*34:616-619.

Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 61(5): 928e931.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen respectivamente a UNICEN e INTI (9 de Julio) por el financiamiento del proyecto y por facilitar las muestras de estudio para el trabajo.

BIOCOMPATIBLE FOLIC ACID NANOCARRIERS CONSTRUCTION AND BEHAVIOR AT THE AIR- WATER INTERFACE

**Zema P.D., Pérez O.E., Pizones Ruiz-Henestrosa V.M.,
Pilosof A.M.R.**

CONICET – Universidad de Buenos Aires, Argentina.
pzema@di.fcen.uba.ar

Resumen: En las últimas décadas se ha profundizado la búsqueda de alimentos que provean beneficios para la salud, más allá de los nutritivos. El uso de proteínas lácteas como vehículos de ingredientes bioactivos, ha tomado protagonismo. La β -lactoglobulina (β -lg) es la principal proteína del suero lácteo y ha sido ampliamente estudiada por sus propiedades funcionales destacables y su alto valor biológico. El ácido fólico (AF) es una vitamina hidrosoluble requerida para numerosos procesos biológicos fundamentales, y es un componente esencial de la dieta. El objetivo del trabajo fue constituir nano-complejos de β -lg/AF. Los sistemas se estudiaron desde el punto de vista del tamaño de partículas y se llevó a cabo su caracterización interfacial. El tamaño de partícula se determinó por dispersión dinámica de luz, mientras que el monitoreo de la presión superficial (π) se realizó en un tensiómetro de gota. El AF indujo la agregación de la β -lg. La actividad superficial se incrementó levemente a pH 7, mientras que el efecto fue negativo a pH 5, el punto isoeléctrico de la β -lg. Estos resultados guardan una interesante implicancia práctica a la hora de diseñar *carriers* biocompatibles que serán usados como ingredientes en sistemas dispersos.

Palabras clave: β -lactoglobulina, ácido fólico, nano-complejos, interfase aire-agua.

Abstract: There is an increasing interest in the role of food materials in enhancing the nutritional value of foods and in preventing diseases. Milk proteins can bind a variety of molecules and ions at different degrees of affinity and specificity. β -lactoglobulin (β -lg) is the major protein in whey and it is an important protein for food industry because of its high nutritional value, and its functional properties. Folic acid (FA), a water soluble B vitamin is required for several fundamental biological processes, and is an essential component of the diet. The objective of this work was to construct and characterize β -lg/FA nano-complexes and study their functionality at the air-water interface at pH 7 and 5. Size particle distribution of the nano-complexes was determined by dynamic light scattering. Their interactions at the air-water interface were determined by monitoring the dynamics of surface pressure (π) with an automatic drop tensiometer. FA induced β -lg aggregation. The interfacial activity was slightly enhanced at pH 7, while was detrimental at pH 5, β -lg isoelectric point. These results have practical implications as these nano-complexes could be incorporated to different disperse food matrixes.

Keywords: β -lactoglobulin, folic acid, nano-complexes, air-water interface.

INTRODUCTION

There is an increasing interest in the role of food materials in enhancing the nutritional value of foods, in preventing disease, and in slowing the progression of long-term chronic diseases (Morris 2011). Thus, there have been many efforts to develop food systems that can be able to carry bioactive compounds, such as vitamins or minerals. These systems must be designed so that they do not adversely impact the properties of the food product in which they are incorporated, while being able to deliver beneficial components to specific sites within the consumer's body, e.g., mouth, stomach, small intestine or colon (Ubbink et al 2008; Velikov and Pelan 2008; Lesmes and McClements 2009).

Milk proteins can bind a variety of molecules and ions at different degrees of affinity and specificity (Livney 2010), among them, β -lactoglobulin (β -lg), which is the major protein in the whey of ruminant milk. It has been shown to bind small hydrophobic compounds such as fatty acids, retinol and other fat soluble vitamins, isothiocyanates and various polyphenols (Liang and Subirade 2012; von Staszewski et al 2014). However, the location of the binding sites for the different ligands has not been completely clarified (Keppler et al 2014).

On the other hand, Folic acid (FA), is a water soluble B vitamin, required for several fundamental biological processes, and is an essential component of the diet (Madziva et al 2006). Therefore, the FA sources for human beings are the diet and the synthesis of some intestinal bacteria. The FA deficiency is provoked by an inappropriate diet, intestinal absorption limitations, and the interferences generated by some

medicines. Pregnancy constitutes another important reason for folate deficiency, since the growing fetus quickly consume the maternal store of this acid. It was well established that suitable levels of FA before conception and even during first weeks of pregnancy prevented of neural tube defects (NTD), primarily anencephaly and spina bifida (Younis et al 2009). It has also been suggested that FA may be effective in decreasing the risk for cardiovascular diseases (Adank et al 2003), colon cancer (La Vecchia et al 2002), neurological illnesses such as dementia and Alzheimer's disease (Reynolds 2002; Miller 2003).

β -lg/FA complexes has been constructed and their design was reported in a previous research (Pérez et al 2014). In the referenced work the interactions between the protein and FA at different load ratio and their functional implications in terms of colloidal behavior and digestibility were studied. Nevertheless, studies of these nano-complexes behavior in the air-water interface are still lacking.

The composition and structure of adsorbed layer surrounding air bubbles in foams and water droplets in emulsions are fundamental to the stability and behavior 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 (Pérez et al 2008), 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). Therefore, it is important to determine the dynamic surface characteristics of food proteins and proteins+ligand, like FA, films at the A/W interface.

Thus, the objective of this work was to construct and characterize β -lg/FA nano-complexes and study their functionality at the air-water interface at pH 7 and 5.

MATERIALS AND METHODS

Materials

BioPURE β -lactoglobulin was supplied by DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota). Its composition was: protein 97.8% (w/w dry basis) and β -lg making up 93.6% (w/w) of total proteins, 0.3% (w/w) fat, 1.8% (w/w) ash and 5.0% (w/w) moisture. FA was manufactured by DSM Nutritional Products Argentina S.A. and was gently donated by Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). Its purity was 98.8% (w/w, dry basis). Both β -lg and FA were used without further purification.

Single and mixed solutions

β -lg and FA powders were dissolved separately in double distilled water at room temperature, under agitation. Protein

solutions were kept 24 h at 4 °C to achieve complete hydration of the molecules, while FA solutions were prepared freshly on the same day of measurement. Pure solutions of β -lg and FA were prepared as control systems at 1% (w/w) and 0.25 %, respectively. pH was adjusted to 7.0 and 5.0 using 1 M HCl or 1 M NaOH (analytical grade). The β -lg/FA nano-complexes were produced by mixing, under agitation, the solutions at pH 7 to reach the required final concentrations of the protein and vitamin ligand in the bulk solution (1% (w/w) and 0.25 %, respectively). In other set of samples, pH was adjusted to 5.0 and they were centrifuged at 12,857 *g* for 30 min at 25 °C. The measurements were carried out with the supernatant.

Glass materials in contact with the solutions were properly cleaned in order to avoid any contamination by surface-active substances. The absence of these contaminants in the solutions was checked by surface tension measurements before samples preparation.

Particle size determination

The impact of FA in β -lg particle size distribution was determined by dynamic light scattering in a Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments (Worcestershire, UK) provided with a He-Ne laser (633 nm) and a digital correlator, Model ZEN3600. This instrument has a measurement range of 0.6 nm - 6 μ m, according to the manufacturer, and incorporates noninvasive backscattering (NIBS) optics. Solutions were filtered through 0.45 and 0.22 μ m Micron Separation Inc. syringe filters (Westborough, USA). Samples were contained in disposable polystyrene cuvettes and measurements were carried out at a fixed scattering angle of 173°, at a temperature of 25 °C. Data

were collected over 10 sequential readings, and the average hydrodynamic diameter was obtained. The CONTIN method was used to analyze the data for percentile distribution of particle/aggregate sizes. The intensity size distribution obtained is a plot of the relative intensity of light scattered by particles in various size ranges. Through Mie theory, with the use of the input parameter of sample refractive index, it is possible to convert the intensity size distribution to volume size distribution (Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014; Malvern-Instruments). The particle sizes are reported as the average and standard deviation of 10 readings made on two independently prepared samples.

Dynamic interfacial properties

The interactions between β -lg and FA at the air–water interface were determined by monitoring the dynamics of surface pressure (π) of single components and the mixed systems. Time-dependent surface pressure and surface viscoelastic parameters of adsorbed β -lg and mixed systems β -lg/FA at the air–water interface were obtained with an automatic drop tensiometer (PAT-1, SINTERFACE Technologies, Berlin, Germany) as described elsewhere (Mucic et al 2013; Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014; Bellesi et al 2014).

The aqueous solutions of β -lg or β -lg/FA were placed in a 100 μ L glass Hamilton syringe, and a droplet at a constant volume (12 μ l) was formed. The surface tension (γ) was calculated by the computer software through analyzing the profile of the drop and fitting it to the Young-Laplace equation. The surface pressure is $\pi = \gamma_0 - \gamma$, where γ_0 is the surface tension of pure water and γ is the surface tension of protein solutions.

Measurements were developed at a constant temperature at 20 ± 0.2 °C.

The kinetics of adsorption of proteins was determined according to Martinez et al (2009), by analyzing the diffusion rate constant (k_{diff}), adsorption/penetration rate constant (k_{Ads}) and the rearrangement rate constant (k_R). 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 et al 1946):

$$\pi = 2C_0KT \left(\frac{D_{diff}\theta}{3.14} \right)^{1/2} \quad (1)$$

where C_0 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 and the slope of this plot will be the diffusion rate (k_{diff}).

Measurements were performed at least in duplicate.

Statistical analysis

The data was statistically analyzed with Statgraphics Centurion[®] XV software (Statistical Graphics Corp.). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) to identify which groups were significantly different from others ($P < 0.05$). Linear regression analysis was performed using OriginPro[®] 8 (OriginLab Corp.).

RESULTS AND DISCUSSION

Size distribution of pure β -lg and mixed systems

Dynamic light scattering (DLS) is being increasingly used to determine molecular size, hydrodynamic radius and kinetics of aggregation of biopolymers. This technique has been used for studying the aggregation process of several food proteins. However, studies on β -lg aggregation induced by the presence of FA with this technique has been less used (Pérez et al 2014). Particle size distribution for pure β -lg (1% (w/w), pH7, based on the intensity of the scattered light, was trimodal (Fig. 1A). The peak with the smallest size (2.3 nm) would correspond to the monomeric form of the protein (Mehalebi et al 2008) while the others (10.1 and 141.8 nm) correspond to oligomers and larger aggregates, respectively. However, these larger populations were negligible in number, as can be deduced from the volume-size distribution plots (Fig. 1B).

Fig. 1A also shows the results obtained for the mixed systems, in which a trimodal distribution can be observed. The most relevant peak (4.8 nm), may correspond to a β -lg dimer, whose formation could be induced by FA. Similar results were reported in a recent work (Pérez et al 2014), where the formation of β -lg/FA nano-complexes was confirmed by DLS (particle size distribution and ζ -potential), as well as by isothermal titration calorimetry.

At pH 5, the particle size distribution of β -lg was monomodal, reflecting a particle size of 8.7 nm (Figs. 1C, D). When comparing this result with that at pH 7.0, this increase in the value of the size of the protein aggregates would be related to the fact that the protein is in its isoelectric point (between 4.6 and 5.2) (Das and Kinsella 1989; Bromley et al 2005; Haug et al

2009). The addition of FA promotes the formation of larger structures (Figs. 1C, D), with particle sizes that range between 25 and 500 nm, which are evident both in intensity and number distributions.

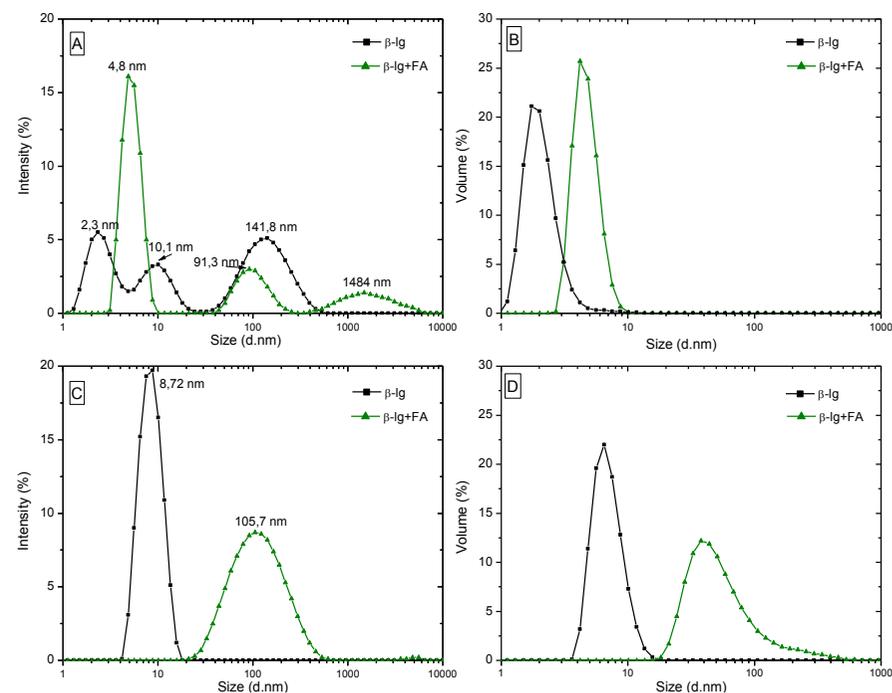


Figure 1: Particle size distribution in intensity and number at pH 7 (A and B, respectively) and at pH 5 (C and D, respectively).

Adsorption dynamics

The surface dynamics properties of the β -lg/FA nano-complexes were studied by monitoring the time evolution of surface pressure at the air-water interface (Fig. 2). To this end an automatic drop tensiometer was used. Firstly, it must be said that the FA molecules do not possess surface activity. On the other hand, previous studies have reported that the protein bulk concentration used here was high enough to allow the protein diffusion, unfolding and rearrangement at the interface (Baeza et al 2005). The values of π increase with the adsorption time and tended to reach a pseudo-equilibrium state at long-term adsorption, under all the experimental conditions, pH 7 and 5 (Figs. 2A, B, respectively). The pseudo-equilibrium state was reached as a consequence of the protein molecular rearrangements that occurred at the air-water interface, a phenomenon that includes the replacing of the less surface active groups by the more hydrophobic ones (Lankveld and Lyklema 1972). The mentioned molecular rearrangements require a certain period of time, which in turn will depend on the molecular flexibility and on the distribution of the hydrophobic residues of the single protein or that from the complexes when the FA was attached to the protein (Liang and Subirade 2010).

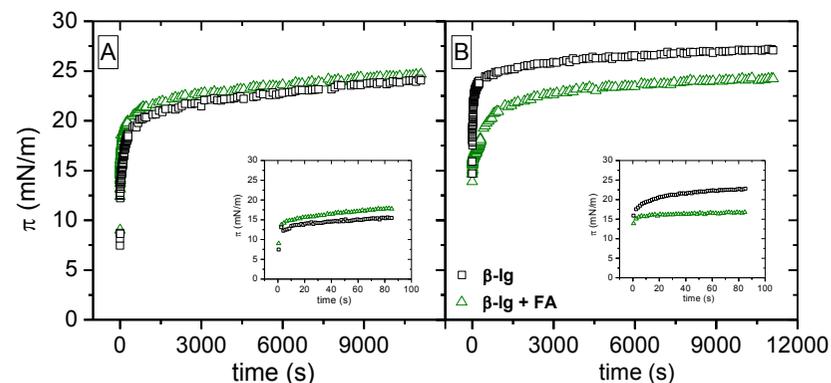


Figure 2: Surface pressure as a function of adsorption time for pure β -lg and β -lg/FA nano-complexes at pH 7 (A) and at pH 5 (B). Inserts correspond to short adsorption times ($t < 100$ s)

At pH7, it can be seen that the effect of the FA complexation did provoke a slight increase in the value of π in comparison with the single protein (Fig. 2A). Since the adsorption process started at π values of 7.5 mN/m, it can be deduced that single protein and nano-complexes were quickly adsorbed to the air-water interface. The final π values (π_f) reached by these components oscillated near 24 mN/m. These values agree with pioneers reports for this protein (Waniska and Kinsella 1985). Qualitative differences could be detected for the adsorption at short times (inner Fig. 2A) where β -lg/FA complexes showed enhanced adsorption behaviour. On the other hand, a remarkable increase in π values was observed in mixed systems at pH 5 (Fig. 2B) in relation to the results at pH 7. The adsorption of protein molecules is increased near the isoelectric point which is attributed to a decrease in the electrostatic repulsions at the interface and to the more compact structure of the protein molecules into the interfacial

film (a more rigid structure would be adopted by the β -lg molecules) (Rade-Kukic et al 2011).

The adsorption process, at pH 5, started at a higher value of π (≈ 12.5 mN/m). The fast increase of π reflects the fact that the protein was able to reach the air-water interface almost instantaneously. Meanwhile, the nano-complexes adsorption described a slower behavior at this pH, and the π -time curve manifested lower values than the same corresponding to the pure protein, i.e. nanocomplexes turned less amphiphilic. This effect was more evident when considering short adsorption times (inner Fig. 2B). The hydrophilic character of the nano-complexes could be increased by the hydrophobically bound FA to the protein, which implies a decrease in the surface activity for this specie (Kezwon and Wojciechowski 2014). A clear decrease in π at long adsorption time was also detected for the nano-complexes, which reached a pseudoequilibrium value of 25 mN/m.

The values for the diffusion rate constant (k_{diff}) can be obtained during the first step of the adsorption process, at low values of π ($\pi < 10$ mN/m) by applying the Ward and Tordai expression (Equation 1), that relates the changes of surface pressure with the square root time. However, the adsorption of these components (β -lg and β -lg/FA) was practically instantaneous, with initial values of $\pi > 10$ mN/m, and it was then approximated k_{diff} from the slope of the first value in the plot of π vs $t^{1/2}$ as indicated by Martinez et al. (2009). The main differences found for the k_{diff} values (Table 1) had correspondence with the pH of the solution and to the protein aggregates properties under these conditions, i.e. the diffusion of a surface active macromolecule depends on its spatial conformation in the aqueous phase. Thus FA complexation did not affect the β -lg diffusion to the air-water interface as single

protein and nano-complexes showed similar k_{diff} values at pH 7. Meanwhile, a decrease for the k_{diff} of the nano-complexes was detected at pH 5, which correlates with the slower adsorption observed at the initial times (Fig. 2B).

At higher adsorption times, after the diffusion step, an energy barrier for the proteins and nano-complexes adsorption became important, which can be attributed to the adsorption, penetration and rearrangements of the macromolecules at the interface (Pérez et al 2008).

In order to determine the magnitude of the adsorption/penetration rate constant (k_{Ads}) and the rearrangement rate constant (k_R) for the adsorbed β -lg and β -lg/FA nano-complexes the approach proposed by Suttiprasit, Krisdasima and McGuire (1992) was used, where a semi-empirical first-order equation is used: $\ln[(\pi_{185}-\pi_t)/(\pi_{185}-\pi_0)] = -k_i t$, where π_{185} , π_0 and π_t are the surface pressures values at 185 min of adsorption time, at time=0 and at any time t , respectively, and k_i is the first order rate constant (Martinez et al 2012). The plot of this equation usually yields two or more linear regions. The initial slope is considered as the first order rate constant of adsorption (k_{Ads}), while the second slope is considered as the first order rate constant of rearrangement (k_R). The application of the first-order equation to the single protein and to the nanocomplexes at pH 7 and 5 can be seen in Figure 3 A and B, respectively.. The corresponding values obtained are summarized in Table 1. No differences in k_{Ads} nor k_R for β -lg and for β -lg/FA nano-complexes were detected at pH 7, indicating that the FA did not interfere after the adsorption equilibrium was reached and the adsorbed components could experience their own organization at the air-water interface.

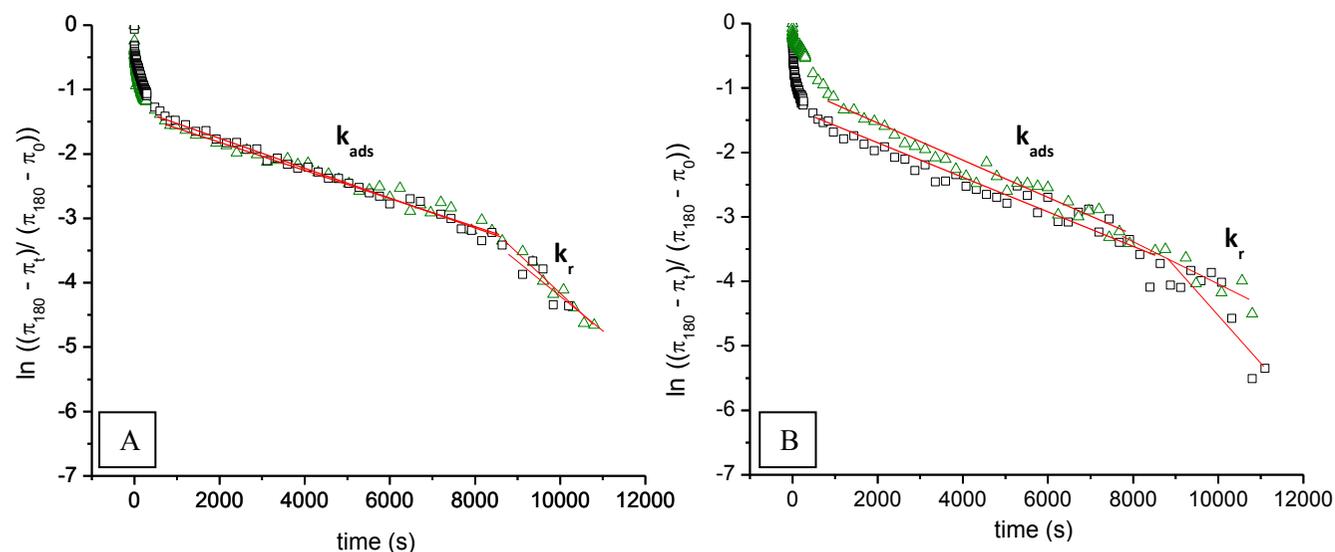


Fig. 3. Time-dependent surface pressure of pure β -lg (\square) and β -lg/FA nano-complexes (Δ) adsorbed films according to the rate of adsorption, unfolding and penetration at the air-water interface at pH:(A) 7 and (B) 5.

However, differences were observed between the protein and nano-complexes at pH 5, although they were not significant (Table 1). Both, k_{Ads} and k_R corresponding to the β -lg/FA complexes were remarkably lower than that corresponding to the pure protein. As it does not exist any literature concerning the proteins-FA functionality at the air-water interface, these results are compared with that from previous studies focused on β -lg and polyphenols (von Staszewski et al 2014) and caseins and polyphenols (Sausse et al 2003) interactions. In these works the interaction between the protein and the ligand would occurred in such a way that the hydrophobic domains would not be fully available for the penetration of

the air-water interface. The protein conformational change provokes a decrease in the protein superficial energy. Although under acidic conditions, the protein and FA interaction would reduce the molecular flexibility capacity avoiding the required molecule conformational change to anchor to the interface.

	Sample	k_{diff} ($mN m^{-1} s^{-0.5}$) ^a	$k_{ads} \times 10^4$ (s^{-1}) ^a (LR)	$k_r \times 10^4$ (s^{-1}) ^a (LR)
pH7	β -lg	$10.20 \pm 0.93a$	2.39 ± 0.01 (0.950)a	4.99 ± 0.73 (0.782)a
	β -lg + FA	$11.25 \pm 0.41a$	2.42 ± 0.33 (0.968)a	5.79 ± 0.58 (0.805)a
pH5	β -lg	$20.98 \pm 0.13a$	2.54 ± 0.02 (0.962)a	6.40 ± 1.80 (0.757)a
	β -lg + FA	$18.24 \pm 1.25a$	3.20 ± 0.46 (0.967)a	3.44 ± 0.88 (0.712)a

^a Mean \pm standard deviation. LR: Linear regression coefficient. Different letters between samples of the same pH indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 1: Rate constants of diffusion (k_{diff}), adsorption (k_{ads}) and rearrangement (k_r) for pure β -lg and β -lg/FA nano-complexes at pH 7 and pH 5.

CONCLUSIONS

The findings of the present study demonstrate that β -lg can form nano-complexes with FA under specific conditions, which alters both FA and β -lg physicochemical properties. The nature of β -lg/FA interactions is believed to be mainly hydrophobic. The main changes were detected at pH 5, close to the protein pI, in which a remarkable decrease in the ζ values were registered during the dynamics of adsorption. The rate constants that characterize the diffusion and the rearrangement processes also decrease for nano-complexes at this pH value. The explanation for this finding would be the greater molecular aggregation that occurs close to the protein pI jointly with the FA interaction, as determined by DLS measurements. More studies at molecular level are being conducted to figure out this phenomenon.

From a technological point of view, β -lg/FA nano-complexes could offer improved techno-functional properties, e.g. solubilization of FA and stabilization of β -lg in a wider range of pH.

REFERENCES

- Adank C, Green TJ, Skeaff CM, Briars B (2003) Weekly high-dose folic Acid supplementation is effective in lowering serum homocysteine concentrations in women. *Ann Nutr Metab* 47:55–59. doi: 69278
- Baeza RI, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR (2005) Interactions between β -lactoglobulin and polysaccharides at the air-water interface and the influence on foam properties. In: Dickinson E (ed) *Food Colloids. Interactions, microstructure and processing*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp 301–316
- Bellesi FA, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Pilosof AMR (2014) Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids* 36:115–122. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.010
- Bromley EH, Krebs MRH, Donald AM (2005) Aggregation across the length-scales in beta-lactoglobulin. *Faraday Discuss* 128:13–27.
- Das KP, Kinsella JE (1989) pH DEPENDENT EMULSIFYING PROPERTIES OF B-LACTOGLOBULIN. *Journal of Dispersion Science and Technology* 10:77–102. doi: 10.1080/01932698908943160
- Haug IJ, Skar HM, Vegarud GE, et al (2009) Electrostatic effects on β -lactoglobulin transitions during heat denaturation as studied by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocolloids* 23:2287–2293. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.06.006
- Keppler JK, Sönnichsen FD, Lorenzen P-C, Schwarz K (2014) Differences in heat stability and ligand binding among β -

- lactoglobulin genetic variants A, B and C using ¹H NMR and fluorescence quenching. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1844:1083–1093. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.02.007
- Kezwon A, Wojciechowski K (2014) Interaction of Quillaja bark saponins with food-relevant proteins. *Advances in Colloid and Interface Science* 209:185–195. doi: 10.1016/j.cis.2014.04.005
- La Vecchia C, Negri E, Pelucchi C, Franceschi S (2002) Dietary folate and colorectal cancer. *Int J Cancer* 102:545–547. doi: 10.1002/ijc.10720
- Lankveld JMG, Lyklema J (1972) Adsorption of polyvinyl alcohol on the paraffin–water interface. I. Interfacial tension as a function of time and concentration. *Journal of Colloid and Interface Science* 41:454–465. doi: 10.1016/0021-9797(72)90369-4
- Lesmes U, McClements DJ (2009) Structure–function relationships to guide rational design and fabrication of particulate food delivery systems. *Trends in Food Science & Technology* 20:448–457. doi: 10.1016/j.tifs.2009.05.006
- Liang L, Subirade M (2012) Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin–ligand complexes using fluorescence quenching. *Food Chemistry* 132:2023–2029. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.043
- Liang L, Subirade M (2010) β -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological Implication. *J Phys Chem B* 114:6707–6712. doi: 10.1021/jp101096r
- Livney YD (2010) Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15:73–83. doi: 10.1016/j.cocis.2009.11.002
- Madziva H, Kailasapathy K, Phillips M (2006) Evaluation of alginate–pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT - Food Science and Technology* 39:146–151. doi: 10.1016/j.lwt.2004.12.015
- Malvern-Instrumentswww.malvern.com.
- Martinez MJ, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR (2009) Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71:230–237. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.02.006
- Martinez MJ, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Carrera Sánchez C, et al (2012) Interfacial and foaming interactions between casein glycomacropeptide (CMP) and propylene glycol alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 95:214–221. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.02.045
- Mehalebi S, Nicolai T, Durand D (2008) Light scattering study of heat-denatured globular protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules* 43:129–135. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.04.002
- Miller AL (2003) The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Alternative Medicine Review* 8:7–19.
- Morris VJ (2011) Emerging roles of engineered nanomaterials in the food industry. *Trends in Biotechnology* 29:509–516. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.04.010
- Mucic N, Kovalchuk NM, Aksenenko EV, et al (2013) Adsorption layer properties of alkyltrimethylammonium bromides at interfaces between water and different alkanes. *Journal of Colloid and Interface Science* 410:181–187. doi: 10.1016/j.jcis.2013.07.044
- 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. doi: 10.1006/jcis.1995.9961

- Pérez OE, David-Birman T, Kesselman E, et al (2014) Milk protein–vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids* 38:40–47. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.010
- Pérez OE, Sánchez CC, Pilosof AMR, Rodríguez Patino JM (2008) Dynamics of adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the air–water interface. *Food Hydrocolloids* 22:387–402. doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.12.005
- Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Martínez MJ, Carrera Sánchez C, et al (2014) Mixed soy globulins and β -lactoglobulin systems behaviour in aqueous solutions and at the air–water interface. *Food Hydrocolloids* 35:106–114. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.04.021
- Rade-Kukic K, Schmitt C, Rawel HM (2011) Formation of conjugates between β -lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids* 25:694–706. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.018
- Reynolds EH (2002) Folic acid, ageing, depression, and dementia. *BMJ* 324:1512–1515.
- Sausse P, Aguié-Béghin V, Douillard R (2003) Effects of Epigallocatechin Gallate on β -Casein Adsorption at the Air/Water Interface. *Langmuir* 19:737–743. doi: 10.1021/la026304b
- Suttiprasit P, Krisdhasima V, McGuire J (1992) The surface activity of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin: I. Surface tension measurements with single-component and mixed solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* 154:316–326. doi: 10.1016/0021-9797(92)90146-D
- Ubbink J, Burbidge A, Mezzenga R (2008) Food structure and functionality: a soft matter perspective. *Soft Matter* 4:1569–1581. doi: 10.1039/B802183J
- Velikov KP, Pelan E (2008) Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter* 4:1964–1980. doi: 10.1039/B804863K
- Von Staszewski M, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Pilosof AMR (2014) Green tea polyphenols- β -lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. *Food Hydrocolloids* 35:505–511. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.07.008
- Waniska RD, Kinsella JE (1985) Surface properties of β -lactoglobulin: Adsorption and rearrangement during film formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33:1143–1148.
- Wollenweber C, Makievski AV, Miller R, Daniels R (2000) Adsorption of hydroxypropyl methylcellulose at the liquid/liquid interface and the effect on emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 172:91–101. doi: 10.1016/S0927-7757(00)00569-0
- Younis IR, Stamatakis MK, Callery PS, Meyer-Stout PJ (2009) Influence of pH on the dissolution of folic acid supplements. *International Journal of Pharmaceutics* 367:97–102. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.028

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina, and University of Buenos Aires.

INTERFACIAL RHEOLOGY AND FOAMING PROPERTIES OF β -LACTOGLOBULIN / FOLIC ACID NANO-COMPLEXES.

**Zema P.D., Pérez O.E., Pizones Ruiz-Henestrosa V.M.,
Pilosof A.M.R.**

CONICET – Universidad de Buenos Aires, Argentina.
pzema@di.fcen.uba.ar

Resumen: Las propiedades dilatacionales superficiales de las películas proteicas adsorbidas en la interfase aire-agua, juegan un papel importante en la formación y estabilidad de dispersiones alimentarias. La β -lactoglobulina (β -lg) es la proteína mayoritaria del suero lácteo y posee buenas propiedades espumantes y emulsificantes. El ácido fólico (AF) es una vitamina hidrosoluble del grupo B, clave en la prevención de enfermedades. En este trabajo se estudiaron las propiedades reológicas dilatacionales de las películas interfaciales formadas por los nano-complejos de β -lg/AF, a pH 5 y 7. Se analizaron también las propiedades de formación y estabilidad de las espumas generadas por el método de batido desde soluciones preparadas con estos componentes (1% (p/p) de β -lg y 0,25% (p/p) de AF), a temperatura ambiente. Los parámetros reológicos interfaciales (módulo dilatacional superficial y ángulo de fase) se obtuvieron usando un tensiómetro interfacial con el método de la gota pendiente, sometiendo a deformaciones sinusoidales. A pH 7 se logró una mejor capacidad espumante y estabilidad de las espumas formadas por los nano-complejos, lo cual está relacionado con el importante aumento que se observó del módulo dilatacional superficial. El carácter sólido disminuyó a

pH 5 en comparación con la proteína sola, pero no se manifestaron diferencias estadísticamente significativas en las propiedades de espumado.

Palabras clave: β -lactoglobulina, ácido fólico, nano-complejos, reología, espumas.

Abstract: Surface dilatational properties of the protein films adsorbed at the air-water interface, play an important role in formation and stability of alimentary dispersions. β -lactoglobulin (β -lg) is the major protein in whey and it has excellent foaming and emulsifying properties. Folic acid (FA) is a water-soluble B vitamin, and it is key component in prevention of many diseases. Dilatational rheology properties of the interfacial films constituted by nano-complexes at pH 7 and 5 were studied. Foam formation and stability was studied over solutions of these components (1% (w/w) β -lg and 0.25% (w/w) FA), at room temperature. Interfacial rheology parameters (surface dilatational modulus and loss angle) were obtained using an interfacial tensiometer, by subjecting a pendant drop to sinusoidal deformations. At pH 7, an enhanced foam overrun and stability was obtained with the nano-complex solutions. This fact is related to the notable increase of the surface dilatational modulus. Surface elasticity was reduced at pH 5, in comparison with the pure protein, but no significant differences were found in foaming properties.

Keywords: β -lactoglobulin, folic acid, nano-complexes, rheology, foams.

INTRODUCTION

The growing concern for the promotion of health and prevention of disease through improved nutrition has led to numerous attempts to develop food-grade delivery systems to encapsulate, protect and deliver bioactive components. Milk proteins are natural vehicles, which evolved to deliver essential micronutrients from mother to the newborn. Among them, β -lactoglobulin (β -lg) is the major protein in the whey of the ruminant milk. It is a globular protein with a radius of about 2 nm and a molar mass of 18.2 kg mol⁻¹. It contains two disulfide bridges and one free thiol (Hambling et al 1992). The whey protein β -lg is an important protein for food industry because of its high nutritional value, its use as foaming-, emulsifying-, or gelling-agent, and its diverse ligand binding abilities.

On the other hand, Folic acid (FA), or its equivalent term, folates, are a group of bioactive compounds referring to all derivatives of tetrahydrofolic-acid, a water soluble B vitamin. FA is required for several fundamental biological processes, including nucleotide biosynthesis and amino acid metabolism and is an essential component of the diet (Madziva et al 2006). World Health Organization (WHO, 2006) established the recommended daily amounts (RDA) of 400 dietary folate equivalents (DFE) for adults, 600 DFE for pregnant women and 500 DFE for nursing mothers. Many experts believe that the neural tube defects (NTD) prevention is only possible by the assurance of adequate levels of this compound in those women with reproductive potentiality, which can be achieved by food fortification. Thus, the fortification should be part of

the integral preconception consumption care (Evans and Weisman 2010).

Food dispersions like emulsions and foams are two-phase systems in which one of the phases (oil or gas or both) is dispersed into an aqueous continuous phase. Because oil/water and air/water interfaces are high-energy interfaces, emulsions and foams collapse as soon as they are created unless an emulsifier or foaming agent (i.e. proteins, surface-active polysaccharides and lipids) is added to the system (Damodaran 2005). More specifically foam or emulsion formation/stabilization is possible since during the adsorption process of biopolymers, the surface or interfacial tension of fluid–fluid interfaces decreases (Rodríguez Patino et al 1999), which is also an important factor to optimize the input of energy involved in the emulsification or in the foaming process (Walstra 1993).

In addition to lowering the interfacial tension, biopolymers can form viscoelastic films around the oil droplets or air bubbles via non-covalent intermolecular interactions and covalent disulfide cross-linking, which are important factors for the stability of colloidal dispersions. The viscoelastic properties of biopolymer adsorbed films have often been correlated with functionality (Rodríguez Patino et al 2008) and these properties can be characterized by interfacial rheology.

β -lg-FA complexes have been constructed and their design was reported in a previous research (Pérez et al 2014). In the referenced work the interactions between the protein and FA at different load ratio and their functional implications in terms of colloidal behavior and digestibility were studied. Nevertheless, studies about how these nano-complexes behave in air-water interfaces are still pending.

Thus, the aim of this work was to study the dilatational rheology properties of the interfacial films constituted by nano-complexes and its influence in the foams formation and stability.

MATERIALS AND METHODS

Materials

BioPURE β -lactoglobulin was supplied by DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota). Its composition was: protein 97.8% (w/w dry basis) and β -lg making up 93.6% (w/w) of total proteins, 0.3% (w/w) fat, 1.8% (w/w) ash and 5.0% (w/w) moisture. FA was manufactured by DSM Nutritional Products Argentina S.A. and was gently donated by Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). Its purity was 98.8% (w/w, dry basis). Both β -lg and FA were used without further purification.

Single and mixed solutions

β -lg and FA powders were dissolved separately in double distilled water at room temperature, under agitation. Protein solutions were kept 24 h at 4 °C to achieve complete hydration of the molecules, while FA solutions were prepared freshly on the same day of measurement. Pure solutions of β -lg and FA were prepared as control systems at 1% (w/w) and 0.25 %, respectively. pH was adjusted to 7.0 and 5.0 using 1 M HCl or 1 M NaOH (analytical grade). The β -lg/FA nano-complexes were produced by mixing under agitation the solutions at pH 7 to reach the required final concentrations of the protein and vitamin ligand in the bulk solution (1% (w/w)

and 0.25 %, respectively). In other set of samples, pH was adjusted to 5.0 and they were centrifuged at 12,857 x g for 30 min at 25 °C. The measurements were carried out with the supernatant.

Glass materials in contact with the solutions were properly cleaned in order to avoid any contamination by surface-active substances. The absence of these contaminants in the solutions was checked by surface tension measurements before samples preparation.

Dynamic interfacial properties

The interactions between β -lg and FA at the air–water interface were determined with an automatic drop tensiometer (PAT-1, SINTERFACE Technologies, Berlin, Germany) as described elsewhere (Mucic et al 2013; Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014; Bellesi et al 2014).

The aqueous solutions of β -lg or β -lg/FA were placed in a 100 μ L glass Hamilton syringe, and a droplet at a constant volume (12 μ l) was formed at the tip of it. The droplet was formed into a rectangular glass cuvette (5 mL) which was partially filled with water to generate a constant humidity environment. Measurements were carried out for approximately 180 min, where the image of the drop was continuously taken for from a CCD camera and digitized.

The rheological parameters, were obtained by inducing sinusoidal area perturbations by automatically increasing and decreasing the drop volume at an amplitude of 3% and an angular frequency of 0.05 Hz. The amplitude of the oscillation was previously determined to guarantee that the surface viscoelastic parameters were independent of the amplitude. Data obtained were analyzed by applying the Fourier

transformation, obtaining the corresponding dilatational parameters of the interfacial layer over time (Berthold et al 2007; Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014; Bellesi et al 2014).

Foaming properties

Foam formation: Mixed systems or control β -lg solutions (30 mL) were foamed at 25 °C in a graduated tube (3 cm diameter) for 3 min with a stirrer (Griffin & George, Ltd., Great Britain) at 2500 rpm. Foam overrun (FO) was calculated as:

$$FO(\%) = \frac{V_f - V_0}{V_0} 100 \quad (1)$$

where V_f is the foam volume reached after 3 min of whipping [mL]; and V_0 is the initial volume of the protein solution [mL] (Martinez et al 2005). The data reported are means of at least two replicates.

Foam drainage and collapse: The volume of liquid drained to the bottom of the tubes and foam height (collapse) were visually recorded over time. Foam volume was determined over time as the difference of these two parameters. The following empirical mathematical model was applied to fit the drainage over time (Carp et al 1997):

$$v(t) = \frac{Vt^n}{c + t^n} \quad (2)$$

where $v(t)$ is the drained volume at time t [mL]; V is the maximum drained volume [mL]; n is a constant related to the sigmoid shape of the curves; and c is a constant related to

drainage half time by $c^{1/n}$ [min]. The rate constant for drainage (K_{dr} [ml min⁻¹]) was calculated according to Carp et al. (1997):

$$K_{dr} = \frac{n}{Vc^{1/n}} \quad (3)$$

The data reported are means of at least two replicates. The fitting of the experimental data was performed with GraphPad Prism© 5 (GraphPad Software, Inc) and the goodness of the fit was evaluated by the R^2 parameter.

Statistical analysis

The data was statistically analyzed with Statgraphics Plus 5.1 software (Statistical Graphics Corp). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) to identify which groups were significantly different from others ($P < 0.05$). Linear regression analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc).

RESULTS AND DISCUSSION

Viscoelastic properties of β -lg/FA nano-complexes

Time evolution of surface dilatational elasticity (E_d) and loss angle (θ) for single β -lg and for the β -lg/FA nano-complexes adsorbed films were obtained at pH 7 and 5, and the results were shown in Fig. 1. It can be deduced from Figs. 1A and B that E_d increased upon time according to the protein or nano-complexes adsorption up to a pseudo-equilibrium value as a general trend, although differences at the different pH solution could be found. Thus at pH 7 (Fig. 1A) the interfacial protein film reached values of $E_d \approx 80$ mN/m, while these

values were 110 mN/m at the steady-state at pH 5 (Fig. 1B). It indicates that protein could form a more structured adsorbed film at pH values around its isoelectric point. Opposite effects were observed with the complexation between the protein and FA, since E_d remarkably increased at pH 7 and it decreased at pH 5. The synergistic effect observed at pH 7 indicates an increase in the number and intensity of the macromolecular interactions between the adsorbed protein molecules at the air-water interface. Even β -lg and FA interaction has a hydrophobic nature; it has been suggested for other protein monolayer systems that the electrostatic and hydrophobic interactions were reasonable (Pitcher III et al 2002), which allowed to obtain more elastic films. This fact would have important implications during the foam formation and its stability (Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014). On the contrary, the nano-complexes formed at pH 5 manifested E_d values similar to those corresponding to the single protein at pH 7, which implies that the phenomena causing the synergism given at this pH is not present under acidic conditions. As a consequence, FA would not contribute to a better viscoelastic film development, maybe because of the structural characteristics of the nano-complexes at pH 5 and the way that they rearrange at the air-water interface.

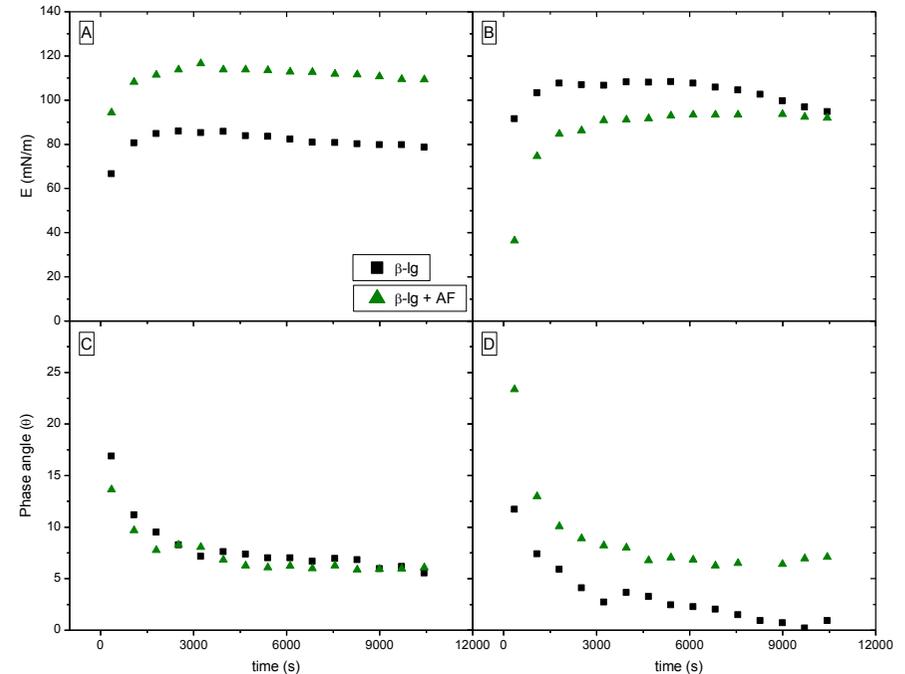


Figure 1: Time evolution of surface dilatational elasticity at pH 7 (A) and 5 (B) and loss angle at pH 7 (C) and 5 (D).

The value of the measured loss angle [$\theta = \tan^{-1}(E_d/E_v)$] was below 45° ; this fact indicates that they all behaved as solid-like materials or a gel structure of the film, even containing just 1% (w/w) β -lg (Dickinson 2012). Time evolution of the loss angle for β -lg and β -lg/FA nano-complexes adsorbed films did not show any noticeable differences at pH 7. The E_d increase with no changes in θ values meant that viscous component of the surface rheological modulus, E_v , decreased concomitantly. The behavior of the nano-complexes was different at pH 5, where the loss angle values resulted higher than that corresponding

to the single protein in accordance with the E_d decrease, showing the monolayer fluidification after FA complexation.

Foaming properties

Foam capacity: The values of FO (Foam Overrun) are shown in Table 1, both at pH 5.0 and 7.0. When mixing these components (β -lactoglobulin + FA) at pH 7.0 a synergistic effect occurred. This fact is related to the rapid adsorption rate of these molecules to the air-water interface as well as their capacity to increase the surface pressure (π) (not shown) (Langevin 2000; Rullier et al 2008; Martínez-Padilla et al 2014), as it affects the ability of the liquid phase to incorporate air for initial bubbles formation (Murray 2007; Marinova et al 2009), although there is not a quantitative relation between these factors (Wierenga and Gruppen 2010). The complexation of FA with the protein at pH 7.0 showed a higher adsorption rate than that for pure protein and it has to be considered that one of the most important factors that affect the foam formation is the adsorption rate, which in turn depends on the protein concentration, molecular weight of the protein, protein structure, and experimental conditions of the aqueous medium, such as pH (Moro et al 2011).

On the other hand, lower values of FO were obtained for the mixture at pH 5.0, which reflects an antagonistic behavior.

	Sample	FO (%)	$c^{1/n}$ (min)	K_{dr} (ml min ⁻¹)
pH7	β -lg	147 ± 19 a	0.239 ± 0.014 a	0.114 ± 0.012 a
	β -lg + FA	190 ± 5 b	0.514 ± 0.021 b	0.047 ± 0.004 b
pH5	β -lg	200 ± 5 a	0.462 ± 0.083 a	0.040 ± 0.013 a
	β -lg + FA	175 ± 12 a	0.599 ± 0.016 a	0.047 ± 0.003 a

Table 1: Parameters describing foam formation and stability of pure β -lg and β -lg/FA nano-complexes. Mean±SD, n=3. Different letters indicate significant differences.

Foam stability: Foam stability was analyzed from the changes of the foam volume with time (Fig. 2), the rate constant of liquid drainage (K_{dr}) and the drainage half time ($c^{1/n}$) (Table 1). Figures 2A and B reflect that the foam drained a lower quantity of liquid when mixing the protein with FA than foams produced with pure protein, especially at pH 7.0, where lower values of the drainage rate constant were also observed (Table 1). This fact indicates that the mixture of these components enhance the drainage stability. The behavior of the mixed system is related to the higher surface activity (not shown) and surface modulus (Fig. 1A) observed at pH 7.0.

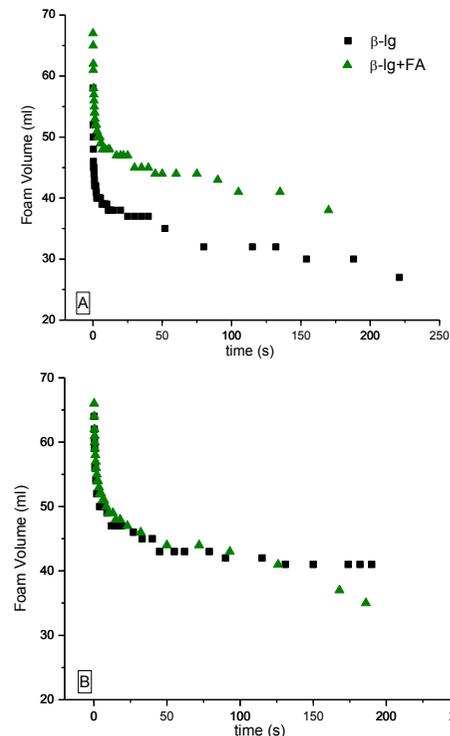


Figure 2: Time evolution of foam volume at pH 7 (A) and 5 (B).

In order to better understand these results, it has to be considered that the initial rheology of the interfacial film is very important for the foam stabilization as the higher the film mechanical strength is, the longer stability could be obtained, by the way that hydrophobic interactions may improve the foam stability through rapid formation of a viscoelastic film (Moro et al 2011). Foam stability is known to be closely linked with the structural changes of the protein, bulk viscosity and the interfacial properties, such as surface tension, surface rheological properties, and surface forces (Martinez et al 2009; Pizones Ruiz-Henestrosa et al 2014). In this way, it has been indicated by other authors (Kloek et al 2001; Baeza et al 2005; Murray 2007) that a correlation between the dilatational elasticity of protein films and the collapse time of foams did exist. The drainage half time ($c^{1/n}$) (Table 1) was also enhanced when mixing these components, which indicates that foam stability is better when the components were both present in the aqueous medium. When considering the surface dilatational viscoelasticity of the different interfacial films (Figure 1), it can be appreciated that the higher the values of E are, the higher the resistance of the foam was, which indicates that the surface elasticity exert a great influence on the foam drainage (Ruíz-Henestrosa et al 2008; Marinova et al 2009), as it is affected by the interactions between these components both in the aqueous solution and at the interface.

CONCLUSIONS

In the present work the effect of pH (5.0 and 7.0) on the surface dilatational parameters and the foaming characteristics (foam capacity and foam stability) of the nano-complexes (β -lg/FA) has been analyzed.

Surface dilatational properties depend on the molecular structure of the adsorbed components and the pH of the aqueous medium. The surface viscoelastic characteristics of the protein films at the air-water interface were practically elastic. E values depend on the interactions between the β -lg/FA nano-complexes adsorbed at the air-water. Maximum values for E over time were observed at pH 7 as well as foaming and foam stability formed with the nano-complexes.

Foam capacity and stability correlates with the surface dynamic properties (surface dilatational rheology) of the nano-complexes adsorbed at the air-water.

This work demonstrates that interactions between these components occur at the air water interface, thus affecting their performance in foams. Direct relationships between foaming capacity and foam stability exist with the surface dilatational modulus of the nano-complexes interfacial film.

REFERENCES

- Baeza R, Carrera Sanchez C, Pilosof AMR, Rodríguez Patino JM (2005) Interactions of polysaccharides with β -lactoglobulin adsorbed films at the air-water interface. *Food Hydrocolloids* 19:239–248. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.06.002
- Bellesi FA, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Pilosof AMR (2014) Behavior of protein interfacial films upon bile salts addition. *Food Hydrocolloids* 36:115–122. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.010
- Berthold A, Schubert H, Brandes N, et al (2007) Behaviour of BSA and of BSA-derivatives at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 301:16–22. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.11.054
- Carp DJ, Bartholomai GB, Pilosof AMR (1997) A Kinetic Model to Describe Liquid Drainage from Soy Protein Foams over an Extensive Protein Concentration Range. *LWT - Food Science and Technology* 30:253–258. doi: 10.1006/fstl.1996.0173
- Damodaran S (2005) Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science* 70:R54–R66. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x
- Dickinson E (2012) Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. *Food Hydrocolloids* 28:224–241. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.12.017
- Evans L, Weisman CS (2010) Folic Acid Supplementation in Younger and Older Nonpregnant Women of Reproductive Age: Findings from the Central Pennsylvania Women's Health Study (CePAWHS). *Women's Health Issues* 20:50–57. doi: 10.1016/j.whi.2009.10.001

- Hambling SG, Mc Alpine AS, Sawyer L (1992) β -lactoglobulin. In: Fox PF (ed) *Advanced dairy chemistry-1: proteins*. Elsevier Applied Science, London, pp 141–190
- Kloek W, van Vliet T, Meinders M (2001) Effect of Bulk and Interfacial Rheological Properties on Bubble Dissolution. *Journal of Colloid and Interface Science* 237:158–166. doi: 10.1006/jcis.2001.7454
- Langevin D (2000) Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties. *Advances in Colloid and Interface Science* 88:209–222. doi: 10.1016/S0001-8686(00)00045-2
- Madziva H, Kailasapathy K, Phillips M (2006) Evaluation of alginate–pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT - Food Science and Technology* 39:146–151. doi: 10.1016/j.lwt.2004.12.015
- Marinova KG, Basheva ES, Nenova B, et al (2009) Physico-chemical factors controlling the foamability and foam stability of milk proteins: Sodium caseinate and whey protein concentrates. *Food Hydrocolloids* 23:1864–1876. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.03.003
- Martinez KD, Baeza RI, Millán F, Pilosof AMR (2005) Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids* 19:361–369. doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.10.002
- Martinez MJ, Sánchez CC, Patino JMR, Pilosof AMR (2009) Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 71:230–237. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.02.006
- Martínez-Padilla LP, García-Mena V, Casas-Alencáster NB, Sosa-Herrera MG (2014) Foaming properties of skim milk powder fortified with milk proteins. *International Dairy Journal* 36:21–28. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.11.011
- Moro A, Báez GD, Busti PA, et al (2011) Effects of heat-treated β -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids* 25:1009–1015. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.021
- Mucic N, Kovalchuk NM, Aksenenko EV, et al (2013) Adsorption layer properties of alkyltrimethylammonium bromides at interfaces between water and different alkanes. *Journal of Colloid and Interface Science* 410:181–187. doi: 10.1016/j.jcis.2013.07.044
- Murray BS (2007) Stabilization of bubbles and foams. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12:232–241. doi: 10.1016/j.cocis.2007.07.009
- Pérez OE, David-Birman T, Kesselman E, et al (2014) Milk protein–vitamin interactions: Formation of beta-lactoglobulin/folic acid nano-complexes and their impact on in vitro gastro-duodenal proteolysis. *Food Hydrocolloids* 38:40–47. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.010
- Pitcher III WH, Keller SL, Huestis WH (2002) Interaction of nominally soluble proteins with phospholipid monolayers at the air–water interface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1564:107–113. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00405-4
- Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Martinez MJ, Carrera Sánchez C, et al (2014) Mixed soy globulins and β -lactoglobulin systems behaviour in aqueous solutions and at the air–water interface. *Food Hydrocolloids* 35:106–114. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.04.021
- Rodríguez Patino JM, Carrera Sánchez C, Rodríguez Niño MR (2008) Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations. *Advances in Colloid and Interface Science* 140:95–113. doi: 10.1016/j.cis.2007.12.007

Rodríguez Patino JM, Rodríguez Niño MR, Sánchez CC (1999) Adsorption of whey protein isolate at the oil-water interface as a function of processing conditions: a rheokinetic study. *J Agric Food Chem* 47:2241–2248.

Ruíz-Henestrosa VP, Sánchez CC, Rodríguez Patino JM (2008) Adsorption and Foaming Characteristics of Soy Globulins and Tween 20 Mixed Systems. *Ind Eng Chem Res* 47:2876–2885. doi: 10.1021/ie071518f

Rullier B, Novales B, Axelos MAV (2008) Effect of protein aggregates on foaming properties of β -lactoglobulin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 330:96–102. doi: 10.1016/j.colsurfa.2008.07.040

Walstra P (1993) Principles of emulsion formation. *Chemical Engineering Science* 48:333–349. doi: 10.1016/0009-2509(93)80021-H

Wierenga PA, Gruppen H (2010) New views on foams from protein solutions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15:365–373. doi: 10.1016/j.cocis.2010.05.017

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina, and University of Buenos Aires.